

Descongelamento e qualidade fisiológica de sementes de *Anadenanthera colubrina* congeladas em temperatura ultrabaixa

Jasmine Novaes Tavares Freire¹, Sara de Souza Alencar², Taise Oliveira Passos², Janete Rodrigues Matias³, Fabrício Francisco Santos da Silva⁴, Bárbara França Dantas^{5*}

RESUMO - Considerando-se a importância da espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan para a manutenção da biodiversidade do bioma Caatinga, faz-se necessário a conservação desses recursos genéticos através da técnica de crioconservação. Objetivou-se ajustar a técnica de descongelamento de sementes de *A. colubrina*, conservadas em nitrogênio líquido. Foram utilizadas quatro condições de descongelamento rápido e lento, após 72h em nitrogênio líquido (-196°C) e comparadas com sementes recém-colhidas não congeladas. As sementes foram submetidas ao teste de germinação em quatro repetições de 50 sementes, distribuídas em rolo de três folhas de papel *germitest*, que foram umedecidos com água destilada com volume equivalente ao seu peso multiplicado por 2,5. Os rolos de germinação obtidos foram embalados em sacos plásticos e colocados para germinar a 25 °C durante 10 dias. Os métodos de descongelamento resultaram em porcentagens de germinação acima de 90% e o descongelamento lento (8 horas em freezer -20°C, 48h em geladeira 10 °C e 1h em temperatura ambiente) das sementes induziu 97% de germinação e 91,5% de plântulas normais, maior que das sementes recém-colhidas (93,5% e 90%, respectivamente). Conclui-se que o descongelamento lento é o melhor método para manutenção da qualidade fisiológica de sementes crioconservadas de *A. colubrina*.

Termos para indexação: crioconservação, recursos florestais, descongelamento.

Thawing methods and physiological quality of *Anadenanthera colubrina* seeds frozen at ultra-low temperature.

ABSTRACT - Considering the importance of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan for the maintenance of the biodiversity of the Caatinga biome, it is necessary to preserve these genetic resources through cryopreservation technique. The objective of this study was to adjust the thawing technique on *A. colubrina* seeds, conserved in liquid nitrogen. Four fast and slow thawing methods were used on seeds frozen for 72 h in liquid nitrogen (-196 °C) and compared to freshly harvested, not frozen seeds. The seeds were submitted to the germination test in four replicates of 50 seeds, distributed in roll of three sheets of germitest paper, moistened with distilled water with a volume equivalent to 2.5 weight and kept at 25°C for 10 days. All thawing methods resulted in germination percentages above 90% and slow seed thawing (8h in freezer -20 °C, 48h in refrigerator 10 °C and 1h in ambient temperature) induced 97% germination percentage and 91.5% normal seedlings, higher than fresh seeds (93.5 % and 90%, respectively). One can conclude that slow thawing is the best method to maintain physiological quality of cryopreserved *A. colubrina* seeds.

Index terms: cryopreservation, forest resources, thawing.

Introdução

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan, conhecida também como angico-de-carçoço, faz parte da extensa

biodiversidade do bioma Caatinga. Possuem distribuição significativa em todo o território nacional, sendo encontradas em maior quantidade na Caatinga, no Pantanal, na Mata Atlântica e no Cerrado (Santos et al., 2012). São caracterizadas

¹Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, UFBA, 40170-115 – Salvador, BA, Brasil.

²Universidade de Pernambuco, campus Petrolina, UPE, 56328-900 – Petrolina, PE, Brasil.

³Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, 59625-900 - Mossoró, RN, Brasil.

⁴Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, 44036-900 - Feira de Santana, BA.

⁵Embrapa Semiárido, 56302-970 – Petrolina, Pe.

*Autor para correspondência: <barbara.dantas@embrapa.br>

por serem leguminosas de importância socioeconômica (Santos et al., 2008). Isso ocorre devido à sua alta tolerância à seca e seu ótimo aproveitamento de forragem, além disso, essa espécie é comumente usada pela indústria madeireira e em procedimentos fitoterápicos (Weber et al., 2011).

A redução da riqueza da vegetação brasileira pode ocorrer ao longo dos anos, devido intervenções do homem e/ou por oscilações e desequilíbrios da própria natureza (Santos et al., 2012). Devido a sua vasta biodiversidade, a fim de conservar a multiplicidade da flora do bioma Caatinga, pesquisas voltadas para a conservação dos recursos genéticos e do vigor dessas espécies nativas vêm sendo cada vez mais desenvolvidas. Dentro dessas pesquisas podemos citar a técnica da criopreservação, que consiste no armazenamento de sistemas orgânicos em nitrogênio líquido (-196 °C) ou em sua fase de vapor a -150 °C (Almeida et al., 2001) que pode ser feito por tempo indeterminado, pois possibilita uma diminuição significativa das atividades bioquímicas e fisiológicas, paralisando o processo de deterioração da semente (Stawood e Bass., 1981).

Para garantir o sucesso da técnica da criopreservação, faz-se necessário analisar aspectos fisiológicos e anatômicos, como por exemplo, teor de umidade e condições físicas das sementes, respectivamente (Almeida et al., 2001). O teor de água das sementes é o fator mais significativo dentro do processo de criopreservação, pois quanto maior o teor de umidade, maior a chance de morte da semente durante os processos de congelamento e descongelamento (Cunha., 1996).

O presente trabalho tem como objetivo ajustar a técnica de descongelamento das sementes de *A. colubrina* criopreservadas, testando diferentes condições desse processo de forma lenta e rápida, respectivamente, tendo como parâmetro seus respectivos percentuais de germinação.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Análises de Sementes da Embrapa Semiárido - LASESA, localizado no município de Petrolina-PE. Foram utilizadas sementes de *A. colubrina* coletadas em Jutai – PE em julho de 2017 (8°34'01.00"S, 40°12'32.00"O, 409 m alt.)

Para o criopreservação, 200 sementes com teor de água de 7,4% foram colocadas em tubos cilíndricos, os quais foram colocados em um botijão de nitrogênio líquido (-196 °C) durante 72 horas (Salomão et al., 2002). Utilizaram-se cinco condições de descongelamento rápido e lento. Sendo elas: 5A- 5 horas em temperatura média ambiente de 27 °C; 1F3G1A - 1 hora em freezer a -20 °C, 3 horas em geladeira a 8 °C e 1 hora em

temperatura ambiente; 4G1A – 4 h horas em geladeira, 1 hora em temperatura ambiente; 8F48G1A - 8 horas em freezer; 48 horas em geladeira, 1 hora em temperatura ambiente e NC-sementes recém-colhidas não congeladas.

Após o período de criopreservação, as sementes foram submetidas ao teste de germinação utilizando quatro repetições de 50 sementes, distribuídas em rolos de três folhas de papel *germitest*, umedecidos com água destilada em volume equivalente ao seu peso multiplicado por 2,5 (Brasil, 2009). Os rolos de germinação foram mantidos em germinador tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) a 25 °C durante 10 dias. As contagens do teste de germinação foram realizadas aos 4 e 10 dias após a semeadura (Brasil, 2013). Com base nos dados coletados nas contagens, foi possível calcular as porcentagens de emissão de radículas com comprimento de pelo menos 2mm, plântulas normais, plântulas anormais, sementes mortas e duras (não germinadas) (Lobo et al., 2014).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado pela equação a seguir (Maguire., 1962):

$$IVG = \sum_{i=1}^k \frac{Ni}{ti}$$

em que: k = último dia de observação; N = Número de sementes germinadas na i -ésima observação ; t_i = tempo entre o início do experimento e a i -ésima observação (dia).

Na última contagem do teste germinação (aos 10 dias) foram coletadas dez plântulas normais de cada repetição para avaliação do crescimento inicial (Nakagawa, 1999), medindo-se o comprimento da raiz principal (CR) e da parte aérea (CPA) de 10 plântulas normais com auxílio de uma régua. Posteriormente as 10 plântulas foram separadas em parte aérea e sistema radicular e cada parte pesada individualmente (PMFPA e PMFR, respectivamente) e acondicionada em sacos de papel e levadas para secagem em estufa com temperatura regulada a 65 °C durante 72 horas para obtenção dos dados de matéria seca do sistema radicular (PMSR) e da parte aérea (PMSPA).

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e Komolgorov-Smirnov, visando analisar a normalidade da distribuição dos dados e ao teste de Levene para analisar a homocedasticidade. Quando os dados se apresentaram normais e suas variâncias homogêneas, foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e posteriormente ao teste de Tukey (5%) para comparação de médias.

Resultados e Discussão

Os métodos de descongelamento testados não afetaram a porcentagem ou velocidade de germinação das sementes ou

a formação de plântulas normais de *A. colubrina* (Tabela 1), resultando em valores acima de 85% de plântulas normais em todos os tratamentos.

No entanto, o desenvolvimento das plântulas foi influenciado pelo método de descongelamento. As duas metodologias de descongelamento gradativo e rápido (1F3G1A e 4G1A) das sementes permitiram desenvolvimento de plântulas semelhante (CPA, PMFPA, PMFR, PMSPA, PMSR) ou maior (CR) do que aquelas oriundas de sementes recém-colhidas e não congeladas (Tabela 2). Sugere-se, assim, que sementes descongeladas mais rapidamente são menos propícias ao recongelamento e, conseqüentemente, à vitrificação de seus componentes genéticos e metabólicos (Villamil e Ruiz, 1997).

Além disso, a elevação gradual da temperatura interna da semente garantem menos danos físicos e metabólicos às suas células (Stawood e Bass, 1981), corroborando também com os resultados obtidos e afirmando a capacidade adaptativa das sementes de *A. colubrina* às diferentes metodologias de descongelamento utilizadas (Tabelas 1, 2).

Em pesquisa realizada avaliando a influência do congelamento de sementes de *A. colubrina* com diferentes teores de água, verificou-se que as sementes mais hidratadas apresentaram maiores danos na sua qualidade fisiológica, em função do congelamento (Santos et al., 2012), devido à formação, formação de cristais de gelo (vitrificação), que são letais às células da semente com alto teor de água (Molina et al., 2006). Assim, há um limite máximo do teor de umidade

Tabela 1. Germinação e teor de água de sementes de angico-de-carço (*Anadenanthera colubrina*) submetidas a diferentes tratamentos de descongelamento, após a crioconservação.

Tratamento	ER 4 (%)	ER 10 (%)	IVG (%)	PN (%)	PA (%)	D (%)	M (%)
NC	92,5 A	94,5 A	23,6 A	89,0 A	5,5 A	2,0 A	4,5 A
5A	92,5 A	93,5 A	23,4 A	86,0 A	7,5 A	1,5 A	4,0 A
1F3G1A	93,5 A	93,5 A	23,4 A	88,0 A	5,5 A	3,0 A	3,5 A
4G1A	93,0 A	97,0 A	24,3 A	91,5 A	5,5 A	3,0 A	3,5 A
8F48G1A	96,5 A	93,5 A	23,4 A	90,0 A	3,5 A	2,0 A	1,0 A
CV (%)	2,207	3,282	2,207	4,638	45,756	97,221	84,632

^aEmissão de radículas na primeira e segunda contagem aos 4 e 10 dias respectivamente (ER4, ER10), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), dormentes (D), mortas (M).

NC: recém-colhidas e não congeladas; 5A: 5 horas em temperatura ambiente; 1F3G1A: 1 hora no freezer, 3 horas na geladeira e 1 hora em temperatura ambiente; 4G1A: 4 horas na geladeira, 1 hora em temperatura ambiente; 8F48G1A: 8 horas no freezer, 48 horas na geladeira e 1 hora em temperatura ambiente. Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05. CV: coeficiente de variação.

Tabela 2. Desenvolvimento inicial de plântulas de angico-de-carço (*Anadenanthera colubrina*), cujas sementes foram submetidas a diferentes tratamentos de descongelamento, após a crioconservação.

Tratamento	CPA (cm)	CR (cm)	PMFPA (g)	PMFR (g)	PMSR (g)	PMSPA (g)
NC	8,3 AB	5,9 B	0,441 A	0,242 B	0,124 A	0,128 AB
5A	6,1 AB	7,7 AB	0,501 A	0,230 B	0,116 A	0,148 A
1F3G1A	8,4 AB	8,0 A	0,436 A	0,306 AB	0,121 A	0,144 AB
4G1A	8,9 A	8,3 A	0,670 A	0,180 B	0,119 A	0,154 A
8F48G1A	5,3 B	6,4 AB	0,650 A	0,599 A	0,114 A	0,101 B
CV (%)	19,674	12,778	26,266	49,128	11,936	11,569

Comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), peso da matéria fresca da raiz (PMFR), peso da matéria seca da raiz (PMSR), peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA).

NC: recém-colhidas e não congeladas; 5A: 5 horas em temperatura ambiente; 1F3G1A: 1 hora no freezer, 3 horas na geladeira e 1 hora em temperatura ambiente; 4G1A: 4 horas na geladeira, 1 hora em temperatura ambiente; 8F48G1A: 8 horas no freezer, 48 horas na geladeira e 1 hora em temperatura ambiente. Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05. CV: coeficiente de variação.

de um sistema para que esse sobreviva e consiga aproveitar as vantagens da técnica de criopreservação (Stanwood, 1985).

Testes de diferentes métodos de armazenamento e também de condições ideais de criopreservação de sementes, como nosso trabalho, são importantes para manutenção dos recursos genéticos (Endoh et al., 2018). Sementes de *A. colubrina* podem ser criopreservadas eficientemente e descongeladas facilmente sem perder a qualidade fisiológica, porém ainda são necessários estudos de alguns parâmetros, como por exemplo o métodos de congelamentos e de longevidade de sementes criopreservadas (Nery et al., 2011).

Conclusão

Conclui-se que as sementes de *A. colubrina* respondem positivamente à técnica de criopreservação, e mantém a qualidade fisiológica independentemente da metodologia de descongelamento, sendo, portanto, uma técnica muito eficiente utilizada para a germinação das sementes desta espécie.

Referências

- ALMEIDA, F. A. C.; DE GOUVEIA, J. P. G.; DE MORAIS, A. M.; CARVALHO, J. M. F. C. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.6, n.2, p.295-302, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662002000200019>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instruções para análise de sementes de espécies florestais*. Brasília: MAPA, 2013. 98p. http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/florestal_documento_pdf-ilovepdf-compressed.pdf
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para Análise de Sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p. http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf
- CUNHA, R. DA. Cultura de tecidos na conservação de germoplasma vegetal. In: Puignau, J. P. (ed.) *Conservación de germoplasma vegetal*. Monte Video: IICA, 1996. p.129-138. IICA- PROCISUR, Dialogo, 45.
- ENDOH, K.; MATSUSHITA, M.; KIMURA, M. K.; HANAOKA, S.; KURITA, Y.; HANAWA, E.; KINOSHITA, S.; ABE, N.; YAMADA, H.; UBUKATA, M. Cryopreservation of *Fagus crenata* seeds: estimation of optimum moisture content for maintenance of seed viability by Bayesian modeling. *Canadian Journal of Forest Research*, v. 48, n. 2, p. 192-196, 2018 <http://dx.doi.org/10.1139/cjfr-2017-0286>
- LOBO, G. A.; SANTANA, D. G.; SALOMÃO, A. N.; REHBEIN, L. S.; WIELEWICKI, A. P. A technological approach to the morphofunctional classification of seedlings of 50 Brazilian forest species. *Journal of Seed Science*, v.36, n.1, p.87-93, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S2317-15372014000100011>
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, v.2, n.2, p.176-177, 1962. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>
- MOLINA, T. F.; TILLMANN, M. A. A.; DODE, L. B.; VIÉGAS, J. Criopreservação em sementes de cebola. *Revista Brasileira de Sementes*, v.28, n.3, p.72-81, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222006000300011>
- NAKAGAWA J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: *ABRATES*, 1999. 218p.
- NERY, F. C.; PAIVA, R.; CAMPOS, A. C. A. L.; NOGUEIRA, G. F.; STEIN, V. C.; ALVARENGA, A. A. Cryopreservation of *Anadenanthera colubrina* (VELL.) BRENAN embryonic exes. *Acta Horticulturae*, v.908, p. 227-231, 2011. <http://dx.doi.org/10.17660/actahortic.2011.908.28>
- SALOMÃO, A. N. Tropical seed species response to liquid nitrogen exposure. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.14, n.2, p.133-138, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202002000200008>
- SANTOS, D. R.; COSTA, M. C. S.; MIRANDA, J. R. P.; SANTOS, R. V. Micorriza e rizóbio no crescimento e nutrição em NEP de mudas de angico-vermelho. *Revista Caatinga*, v.21, n.1, p.76-82, 2008. <https://www.redalyc.org/html/2371/237117576011/>
- SANTOS, R. S.; RAMOS, D. L. D.; MATIAS, J. R.; SILVA, T. C. F.; DANTAS, B. *Heríngiana Brasília*, v.6, n.1, p.80-81, 2012. <http://revistas.jardimbotanico.ibict.br/index.php/heringiana/article/view/44>
- STAWOOD, P.; BASS, L. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Science and Technology*, v. 9, p. 423-437, 1981.
- WEBER, C. R.; SOARES, C. M.; LOPES, A. B.; SILVA, T. S.; NASCIMENTO, M. S.; XIMENES, E. C. *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.92, n.4, p.235-244, 2011. <http://rbfarma.org.br/files/rbf-2011-92-4-1-235-244.pdf>