

Descongelamento de sementes crioconservadas de *Handroanthus spongiosus* (Rizzini) S. Grose.

Sara de Souza Alencar¹, Jasmine Novaes Tavares Freire², Raquel Araujo Gomes³, Jailton de Jesus Silva⁴, Marcelo do Nascimento Araujo⁵, Bárbara França Dantas^{6*}

RESUMO - O armazenamento apropriado das sementes é primordial para a manutenção da viabilidade e qualidade fisiológica das sementes. Crioconservação, é o armazenamento das sementes em temperaturas ultra-baixas impedindo a deterioração biológica do material por longos períodos de tempo. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes métodos de descongelamento na germinação de sementes de *H. spongiosus* crioconservadas. As sementes foram congeladas em nitrogênio líquido (-196 °C) durante 72 horas. Após esse período foram submetidas a descongelamento lento ou rápido: 5 horas em temperatura média ambiente de 27 °C; 1 hora em freezer a -20 °C, 3 horas em geladeira a 8 °C e 1 hora em temperatura ambiente; 4h horas em geladeira, 1 hora em temperatura ambiente; 8 horas em freezer; 48 horas em geladeira, 1 hora em temperatura ambiente e comparadas com as sementes recém-colhidas não congeladas. Para o teste de germinação, foi utilizado papel germitest umedecido com água destilada, e colocados para germinar a 25 °C. Foram realizadas três contagens da germinação aos 4, 7 e 14 dias após a semeadura. O descongelamento durante 4h horas em geladeira e 1 hora em temperatura ambiente manteve a qualidade fisiológica das sementes de *H. spongiosus*.

Termos para indexação: armazenamento, qualidade fisiológica, Caatinga.

Thawing cryoconserved seeds of *Handroanthus spongiosus* (Rizzini) S. Grose.

ABSTRACT - The proper storage of seeds is essential for the maintenance of the viability and physiological quality of the seeds. Cryopreservation, is the storage of seeds at ultra low temperatures preventing the biological deterioration of the material for long periods of time. The objective of this work was to evaluate different methods of thawing in the germination of cryopreserved *H. spongiosus* seeds. The seeds were frozen in liquid nitrogen (-196 °C) for 72 hours. After this period were submitted to slow or fast defrosting: 5 hours on average ambient temperature of 27 °C; 1 hour in a freezer at -20 °C, 3 hours in a refrigerator at 8 °C and 1 hour at room temperature; 4 hours in refrigerator, 1 hour at room temperature; 8 hours in freezer; 48 hours in the refrigerator, 1 hour at room temperature and compared to freshly harvested, non-frozen seeds. For the germination test, germitest paper moistened with distilled water was used, and placed to germinate at 25 °C. Three germination counts were performed at 4, 7 and 14 days after sowing. Defrosting for 4 hours in the refrigerator and 1 hour at room temperature maintained the physiological quality of the seeds of *H. spongiosus*, allowing similar germination, but faster than that of freshly harvested seeds.

Index terms: storage, physiological quality, Caatinga.

Introdução

O armazenamento apropriado é primordial para a preservação da viabilidade, além da manutenção da qualidade fisiológica das sementes. Em sementes florestais, a qualidade fisiológica tem grande influência na produção de mudas de

qualidade para projetos de restauração ambiental (Bispo et al., 2017). A manutenção desses aspectos estão diretamente ligados com a umidade relativa e temperatura do local de armazenamento, pois o alto teor de água na semente junto com temperaturas elevadas podem aumentar a velocidade de deterioração (Azevedo et al., 2003). Por isso, a importância

¹Universidade de Pernambuco, campus Petrolina, UPE, 56328-900 – Petrolina, PE.

²Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, UFBA, 40170-115 – Salvador, BA.

³Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF, 56304-917 – Petrolina, PE.

⁴Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, 44036-900 - Feira de Santana, BA; Faculdade Maurício de Nassau - Campus Petrolina; Uninassau, 56308-170 – Petrolina, PE.

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

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

de saber armazenar as sementes corretamente, uma vez que esse processo determinará a velocidade com que as sementes vão perder sua qualidade. Entre os diversos tipos de armazenamento existe a crioconservação.

As sementes são classificadas em grupos distintos com relação ao comportamento no armazenamento. As sementes ortodoxas se mantêm viáveis após dessecção até um teor de água em torno de 5% e podem ser armazenadas sob baixas temperaturas por um longo período. As sementes recalcitrantes são sensíveis à dessecção e sobrevivem com baixos níveis de umidade, o que impede o seu armazenamento por longo prazo. Além destes grupos há um terceiro, no qual as sementes apresentam um comportamento de armazenamento intermediário ao ortodoxo e ao recalcitrante (Angelovici et al., 2010).

A crioconservação de sementes consiste em armazenar sementes ortodoxas em nitrogênio líquido a -196 °C ou em sua fase de vapor a aproximadamente -150 °C, o que possibilita o armazenamento por um tempo considerado indeterminado (Wetzel et al., 2003). Nessas temperaturas não há água no estado líquido na semente, a difusão é demorada e há baixa energia molecular. Essas condições inibem os processos metabólicos e consequentemente diminuem a deterioração das sementes (Almeida et al., 2002). No entanto, a etapa de descongelamento das sementes crioconservadas tem interferência na qualidade fisiológica, sendo a velocidade com que é realizado, a principal influência na viabilidade e vigor da semente (Silverio et al., 1999).

Handroanthus spongiosus Rizzini, conhecida popularmente como ipê-cascudo ou sete-cascas é uma espécie arbórea endêmica da Caatinga e ameaçada de extinção. A temperatura ideal para a germinação das sementes é 25 °C, no entanto a germinação dessa espécie ocorre de 15 a 45 °C. Além disso, as sementes de *H. spongiosus* germinam em até -0,8 MPa em solução de polietileno glicol e -0,6 MPa ($\simeq 16 \text{ dS.m}^{-1}$) em solução de NaCl (Ferreira et al., 2017a). Além dessas, quase não há informações sobre a germinação da espécie, principalmente no que se refere à conservação das sementes. Portanto, saber uma maneira eficaz de armazená-la é de extrema importância para garantir a sobrevivência da espécie (Amorim et al., 2017). O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes métodos de descongelamento na germinação de sementes de *H. spongiosus* após a crioconservação.

Material e Métodos

As sementes foram coletadas em Cristália, no distrito de Jutaí ($40^{\circ} 22' 10.089'' \text{ W}$, $8^{\circ} 48' 7.793'' \text{ S}$), e o experimento foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Sementes da

Embrapa Semiárido (LASESA) no município de Petrolina, Pernambuco, Brasil.

Aproximadamente 500 sementes (5 g) com teor de água de 5,8%, foram acondicionadas em criotubos e estes imersos diretamente em nitrogênio líquido (-196 °C). As sementes foram mantidas em temperatura ultra-baixa durante 72 horas (Salomão, 2002) e após esse período foram descongeladas de acordo com os seguintes tratamentos: 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 - 4h horas em geladeira, 1 hora em temperatura ambiente; 8F48G1A - 8 horas em freezer, 48 horas em geladeira e 1 hora em temperatura ambiente. As sementes descongeladas foram comparadas quanto a sua qualidade fisiológica com as sementes recém-colhidas não congeladas (NC).

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. Utilizou-se 3 folhas de papel *germitest* umedecidos com volume de água igual à massa do papel seco multiplicada por 2,5. Os rolos de germinação obtidos foram embalados em sacos plásticos e colocados para germinar a 25 °C em germinador tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*). As contagens do teste foram realizadas aos 4, 7 e 14 dias após a semeadura. Com base nos dados coletados nas contagens, foi possível calcular as porcentagens de emissão de radículas com comprimento de pelo menos 2 mm, plântulas normais, plântulas anormais e sementes mortas (Lobo et al., 2014).

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

$$IVG = \sum_{i=0}^n \frac{n_i}{t_i}$$

em que: t_i = tempo em dias em que as contagens de sementes germinadas são realizadas à partir do início do teste de germinação; n_i = número (não acumulado) de sementes germinadas contadas no tempo (t_i).

Na última contagem do teste germinação (aos 14 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) com auxílio de uma régua. Posteriormente essas plântulas foram acondicionadas em sacos papel e levadas para secagem em estufa a 65 °C durante 72 horas para obtenção dos dados de matéria seca do sistema radicular (PMSR) e da parte aérea (PMSP).

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilks

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 (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tukey (5%) para comparação de médias. Os dados que não apresentaram normalidade foram submetidos ao teste não-paramétrico de Mann-Whitney U (5%) para comparação das médias dos diferentes métodos de descongelamento das sementes com as médias das sementes recém-colhidas e não congeladas.

Resultados e Discussão

O descongelamento das sementes de *H. spongiosus* diretamente na temperatura ambiente (aproximadamente 27 °C) induziu uma deterioração das sementes, reduzindo a sua qualidade fisiológica (germinação e vigor) e o crescimento inicial das plântulas (Tabelas 1, 2). Por outro lado, as metodologias de descongelamento com aumento gradativo da temperatura foram as que possibilitaram maior porcentagem de emissão de radícula (aos 7 e 14 dias), menor porcentagem de sementes mortas e porcentagem de plântulas normais semelhantes às sementes recém-colhidas (Tabela 1).

As sementes descongeladas durante 4 horas na geladeira a 8 °C e 1 hora em temperatura ambiente (4G1A) apresentaram qualidade fisiológica semelhante ou superior

às sementes recém-colhidas (NC), com porcentagem e velocidade de emissão de radículas (93,5% e 3,5 plântulas. dia⁻¹, respectivamente) mais altas que as sementes recém-colhidas e não congeladas (78,5% e 3,3 plântulas. dia⁻¹, respectivamente) (Tabela 1).

Sementes crioconservadas submetidas ao descongelamento gradativo se desenvolvem melhor, pois essa prática evita a destruição dos tecidos e células evitando assim a morte celular. Isso ocorre devido ao danos causados pela baixa temperatura às sementes afetando diretamente o seu vigor (Stanwood e Bass, 1981). Essa resposta, no entanto, varia de acordo com a espécie e o tempo de armazenamento (Chandell et al. 1995).

Tais resultados se assemelham com os obtidos em sementes de algodão, pinhão-manso e cebola em que descongelamento lento permite com que as sementes apresentem maior qualidade fisiológica em relação ao descongelamento rápido (Coelho, 2006; Molina et al. 2006; Goldfarb, 2010). Por outro lado, sementes de *Amburana cearensis* apresentaram violento rompimento dos tecidos das sementes ("explosão das sementes") ao serem descongeladas durante 60 minutos em geladeira antes de serem colocadas para germinar (Araujo et al., 2017). Além disso, sementes de cebolas crioconservadas com crioprotetor e descongeladas em temperatura ambiente apresentaram menor qualidade fisiológica que aquelas descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C (Molina et al., 2006).

Tabela 1. Emissão de radículas (ER), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA) e mortas (M) e Comprimento da parte aérea (CPA) de sementes de ipê-cascudo (*Handroanthus spongiosus* Rizzini) submetidas a diferentes tratamentos de descongelamento após a crioconservação.

Tratamento	ER 4 dias (%)	ER 7 dias (%)	ER 14 dias (%)	PN (%)	PA (%)	M (%)	CPA (cm)
5A ^a	72,0 A	79,0 B	80,0 B	21,0 C	56,0 A	13,0 A	2,3 AB
1F3G1A	80,5 A	86,0 AB	86,0 AB	58,0 AB	27,0 AB	3,0 B	2,1 B
4G1A	86,5 A	93,5 A	93,5 A	66,0 AB	25,0 AB	2,5 B	2,1 AB
8F48G1A	84,0 A	86,0 AB	88,0 AB	39,5 BC	48,5 A	8,0 AB	2,5 A
NC	75,5 A	78,5 B	78,5 B	73,5 A	5,0 B	13,5 A	2,4 AB
CV (%)	8,983	6,811	6,79	27,343	49,632	48,947	8,1606
KS (P)	0,158 (0,20)	0,167 (0,147)	0,187 (0,065)	0,019 (-0,068)	0,189 (0,059)	0,143 (-0,2)	0,157 (-0,2)
L (P)	1,688 (0,205)	0,43 (-0,785)	1,073 (0,404)	4,027 (0,021)	2,121 (0,129)	0,153 (0,958)	0,149 (0,931)

^a5A: 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; NC recém-colhidas e não congeladas. Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05. CV: coeficiente de variação; KS: estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov; L: estatística do teste de Levene.

Tabela 2. Comprimento da raiz (CR), peso da matéria seca da raiz (PMSR), peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA) de sementes de ipê-cascudo (*Handroanthus spongiosus* Rizzini) submetidas a diferentes tratamentos de descongelamento após a crioconservação.

Tratamento	PMSPA (g)	CR (cm)	PMSR (g)	IVG (plântulas.dia ⁻¹)
5A ^a	0,008 *	0,7 *	0,017	2,401*
1F3G1A	0,021	0,9 *	0,036	3,382
4G1A	0,059	1,4 *	0,011	3,508 *
8F48G1A	0,027	1,3 *	0,021	3,423
NC	0,055	2,5	0,011	3,263
CV (%)	52,94	31,525	102,447	3,048
KW (P)	9,961 (0,041)	14,014 (0,007)	1,943 (0,746)	14,085 (0,007)

^a5A = 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; NC recém-colhidas e não congeladas. Médias seguidas por asteriscos na coluna diferem estatisticamente das sementes NC pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney U a 0,05. CV: coeficiente de variação; KW: estatística do teste de Kruskall-Wallis.

Conclusão

As sementes de *H. spongiosus* devem ser submetidas ao descongelamento gradativo (4 horas em geladeira e 1 hora em ambiente) após período de criopreservação, para manutenção da sua viabilidade e qualidade fisiológica.

Referências

- ALMEIDA, F.A.C.; MORAIS, A.M.; JULITA M. F. C. CARVALHO, J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.6, n.2, p.295-302, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662002000200019>
- ANGELOVICI, R.; GALILI, G.; FERNIE, A. R.; FAIT, A. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science*, v.15, n.4, p.211-218. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.003>
- ARAUJO, M. N.; FERRAZ, M.; AMÉRICO, F. K. A.; SILVA, F. F. S.; DANTAS, B. F.; CRUZ, C. P. Seed quality of Amburana cearensis (Allemão) A.C. Sm. (Fabaceae) is influenced by storage condition. *Journal of Seed Science*, v. 39, n. 4, pp.401-409. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v39n4179328>
- AZEVEDO, M.R.Q.A.; GOUVEIA, J.P.G.; TROVÃO, D.M.M.; QUEIROGA, V.P. Influência das embalagens e condições de armazenamento no vigor de sementes de gergelim. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.7, n.3, p.519-524, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662003000300019>
- BISPO, J. S.; COSTA, D. C. C.; GOMES, S. E. V.; OLIVEIRA, G. M.; MATIAS, J. R.; RIBEIRO, R. C.; DANTAS, B. F. Size and vigor of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan seeds harvested in Caatinga areas. *Journal of Seed Science*, v.39, n.4, p.363-373, 2017. <https://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v39n4173727>
- COELHO, R. R. P. *Protocolo de crioconservação de sementes de algodão (Gossypium hirsutum L. raça Latifolium Hutch.) cultivares BRS 200 marrom e BRS verde*. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 89pp, 2006. <http://tede.biblioteca.ufpb.br:8080/handle/tede/8139>
- DINIZ, P.S.C.; MATA, M.E.R.M.C.; BRAGA, M.E.D. Influência das técnicas de descongelamento na qualidade fisiológica de sementes de milho crioconservadas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.1, n.1, p.1-12, 1999. <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev11/Art111.pdf>
- FERREIRA, J.V.A.; MEIADO, M.V.; SIQUEIRA FILHO, J.A. Efeito dos estresses hídrico, salino e térmico na germinação de Sementes de *Handroanthus spongiosus* (Rizzini) S. Grose (Bignoniaceae). *Gaia Scientia*, v.11, n.4, p.57-64, 2017. <https://doi.org/10.22478/ufpb.1981-1268.2017v11n4.35470>
- GOLDFARB, M.; DUARTE, M.E.M.; MATA, M.E.R.M.C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas*L.) Euphorbiaceae. *Revista Biotemas*, v.23, n.1, p.27-33, 2010. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n1p27>
- 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. Crioconservação 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: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.
- 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>
- STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen., v.9, p.423-437, 1981.