

AVALIAÇÃO DO GRAU DE UMIDADE DE SEMENTES DE PINHÃO-MANSO PARA ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO.

Antonieta Nassif Salomão (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, antoniet@cenargen.embrapa.br), Izulme Rita Imaculada Santos (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, izulme@cenargen.embrapa.br), Rosângela Caldas Mundim (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, rosa@cenargen.embrapa.br), Valquíria de Brito dos Santos (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, valquiriasantos@hotmail.com.br),

Palavras Chave: *Jatropha curcas* L., criopreservação, regeneração *in vitro*.

1 - INTRODUÇÃO

A criopreservação é utilizada como método para a conservação de espécies que possuem sementes de comportamento intermediário ou recalcitrante. Sementes de comportamento ortodoxo, contendo alto teor lipídico, são mais propensas a perda de viabilidade durante a conservação a -20°C. A criopreservação se mostra como alternativa segura para a conservação dessa categoria de sementes (SANTOS e SALOMÃO, 2007).

O processo de criopreservação envolve algumas etapas e cada uma delas pode causar injúrias e estresses que ao se acumularem levam à perda de viabilidade de estruturas reprodutivas e vegetativas (BERJAK et al., 2011). A primeira etapa do processo de criopreservação é o ajuste do teor de água do material a ser congelado em nitrogênio líquido (NL), de modo a evitar danos por excessiva desidratação ou hidratação.

Sementes de pinhão-mansó com distintos graus de umidade foram congeladas a -196°C (NL) e seus eixos embrionários foram regenerados *in vitro*, com o objetivo de estabelecer protocolo de criopreservação para germoplasma dessa espécie.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

As sementes testadas nesse trabalho foram colhidas no início de 2011 no BAG de pinhão-mansó da Embrapa Agroenergia.

O grau de umidade das sementes foi determinado para a testemunha e após cada tratamento pelo método de estufa (BRASIL, 2009). Os tratamentos foram:

- Testemunha: (T) e (T + NL);
- Desidratação sobre sílica gel / 24h: (D₁) e (D₁ + NL);
- Armazenamento a 10°C / 1 mês: (A) e (A + NL);
- Desidratação sobre sílica gel por 1h de sementes armazenadas a 10°C / mês: (D₂) e (D₂ + NL);
- Hidratação sobre água a 25°C por 7 h de sementes armazenadas a 10°C / mês: (H) e (H + NL).

Após cada tratamento, as sementes foram congeladas (congelamento ultra-rápido: 263°C.min⁻¹) por imersão direta em NL e o descongelamento foi lento à temperatura ambiente. As sementes não congeladas e descongeladas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio à concentração de 2,3% por 10 min. Em seguida foram dispostas sobre papel por 30 min. seguindo-se com escarificação do tegumento com lixa. Foram lavadas com detergente neutro e, novamente, imersas em solução de hipoclorito de sódio à concentração de 2,3% por 10 min. Em capela de fluxo laminar, as sementes foram enxaguadas

com água esterilizadas e colocadas para embeber por 24 h. para amolecimento do tegumento. Os eixos embrionários (e.e.) foram excisados, cultivados *in vitro* contendo o meio de cultura WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981) e colocados em câmara de crescimento à temperatura de 25°C.

As avaliações do material foram feitas a cada três dias até o 15º dias (1ª contagem) e a cada 10 dias até o 4º mês (última contagem). Nas avaliações foi considerada como plântula normal aquela em que as folhas cotiledonares estavam clorofiladas e o sistema radicular desenvolvido com geotropismo negativo.

Os valores de plântulas normais das duas contagens foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação das médias de Bonferroni (P > 0,05).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ajuste do teor de água das sementes de pinhão-mansó mostrou-se complexo, devido ao rápido poder de perder de água do material. Em 24 h de desidratação houve uma redução de ca. 60% do teor de água das sementes, passando de 8,05% para 2,95% de umidade e em 1 h a perda foi de ca. 12% para sementes com 7,12% de umidade. Durante o armazenamento a 10°C, ainda que as sementes estivessem embaladas, houve uma redução do valor inicial de umidade de 8,05% para 7,12%. Em contraste, a absorção de umidade pelas sementes foi mais lenta, uma vez que após 7 h de hidratação, o valor de umidade passou de 7,12% para 8,70% (Tabela 1).

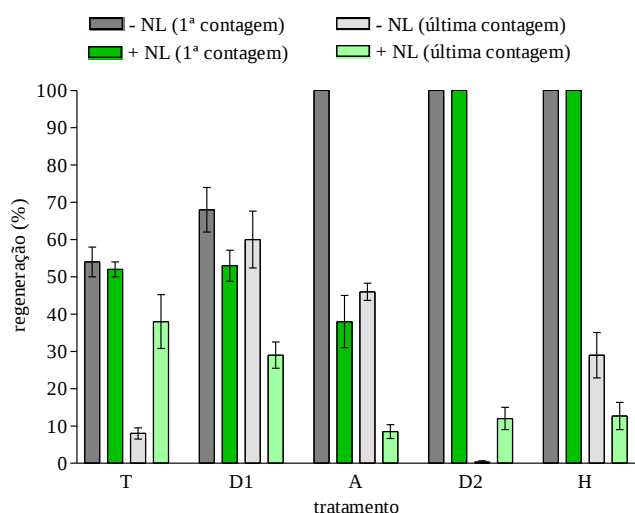
Tabela 1. Grau de umidade de sementes de *Jatropha curcas* procedente do BAG da Embrapa Agroenergia.

Tratamento	Umidade (%)
Testemunha (T)	8,05
Desidratação / 24h (D ₁)	2,95
Armazenamento a 10°C / 1 mês (A)	7,12
Desidratação / 1 h (D ₂)	6,30
Hidratação / 7 h (H)	8,70

Durante as avaliações do material, iniciadas três dias após cultivo, em todos os tratamentos havia plântulas normais. A avaliação do efeito do teor de água das sementes sobre a regeneração dos e.e. ficou comprometida devido à contaminação bacteriana do material. Entretanto, independente do grau de umidade das sementes e do processo de congelamento, não foi observada injúria aparente nas plântulas. As maiores porcentagens de plântulas normais até o 15º dia de cultivo foram obtidas para A, D₂, D₂ + NL, H e H + NL (Figura 1). Ao se comparar as porcentagens de plântulas normais da última contagem com aquelas da primeira contagem não houve diferença significativa (P > 0,05) entre T + NL e D₁. Para os

demais tratamentos, as porcentagens de plântulas normais da última contagem foram significativamente inferiores aos valores da primeira contagem (Figura 1).

Figura 1. Porcentagens de plântulas normais desenvolvidas a partir de eixos embrionários de sementes de *Jatropha curcas* com distintos graus de umidade, submetidas e não submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido.



A redução dos valores de plântulas normais, sobretudo na última contagem, deu-se devido às perdas de material por contaminação bacteriana, a qual intensificou-se após seis dias de cultivo. Aos 15 dias, as maiores porcentagens de contaminação foram observadas nos tratamentos T, T + NL, D₁, D₁ + NL e A + NL (Tabela 2). Aos quatro meses de cultivo *in vitro*, as porcentagens de contaminação foram expressivas em todos os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 2. Porcentagens de plântulas de *Jatropha curcas* contaminadas na primeira contagem, após 15 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Contaminação na 1ª contagem (%)	
	- NL	+ NL
Testemunha (T)	46	48
Desidratação / 24h (D ₁)	32	47
Armazenamento a 10°C / 1 mês (A)	0	62
Desidratação / 1 h (D ₂)	0	0
Hidratação / 7 h (H)	0	0

Tabela 3. Porcentagens de plântulas de *Jatropha curcas* contaminadas na última contagem, após quatro meses de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Contaminação na última contagem (%)	
	- NL	+ NL
Testemunha (T)	92	62
Desidratação / 24h (D ₁)	40	71
Armazenamento a 10°C / 1 mês (A)	54	91
Desidratação / 1 h (D ₂)	99	88
Hidratação / 7 h (H)	71	88

4 - CONCLUSÕES

Os teores de umidade das sementes não induziram danos aparentes nas plântulas obtidas antes e após congelamento.

A qualidade sanitária das sementes interferiu negativamente sobre a regeneração dos e.e..

5 - AGRADECIMENTOS

À Dr. Bruno Galvéas Laviola responsável pelo BAG de pinhão-manso da Embrapa Agroenergia pelo fornecimento de sementes.

A FINEP e CNPq pelo financiamento da pesquisa (projeto BRJATROPHA).

6 - REFERÊNCIAS

- ¹SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. Criopreservação de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília - DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.545 – 574.
- ²BERJAK, P.; BARTELS, P.; BENSON, E. E.; HARDING, K.; MYCOCK, D. J.; PAMMENTER, N. W.; WESLEY-SMITH, J. Cryoconservation of South African plant genetic diversity. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 47, p. 65-81. 2011.
- ³BRASIL. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Regras para análise de sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV. 2009. 395 p.
- ⁴LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of Annual Meetings of International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421-427, 1981.