

Sensibilidade de Embriões do Pinheiro-Brasileiro (*Araucaria angustifolia*) à Desidratação e Baixa Temperatura*

Antonio Carlos de Souza Medeiros¹

Christina Walters²

Lisa Hill²

RESUMO

O comportamento “recalcitrante” das sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni.) Otto Kuntze (pinheiro-brasileiro) limita a conservação *ex-situ* dos recursos genéticos dessa importante espécie, em bancos de sementes. A interação entre o conteúdo de água e temperatura sobre a sobrevivência do embrião foi estudada como ponto de partida para o desenvolvimento de um protocolo para o armazenamento dessa espécie. O objetivo principal deste estudo foi verificar se embriões de *Araucaria angustifolia* sobreviveriam à secagem ultra-rápida, utilizando o método “flash-drying”, e adicionalmente, expondo os embriões à baixas temperaturas. Os embriões foram extraídos das sementes e submetidos à secagem ultra-rápida a teores de 0,29 g de água/g de matéria seca, e em seguida expostos a 0° C, -5° C e -18° C por 4 horas. A taxa de secagem foi calculada a partir do processo de secagem e expressa em (g de água / g matéria seca)/ hora. Outros autores vêm estudando os efeitos da dessecação na viabilidade em sementes inteiras. Para que fosse possível comparar o teor de água de sementes inteiras, adotado por outro autor, com o de embriões, sementes de *A. angustifolia* foram expostas a 25° C e 25 %UR e deixadas a secar. Foram obtidos o peso fresco de sementes inteiras e de seus embriões, também expressos em g de água /

* Pesquisa patrocinada pelo CNPq, Embrapa e NCGRP

¹ Engenheiro-Agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. medeiros@cnpf.embrapa.br

² Bióloga, USDA-ARS, National Center for Genetic Resources Preservation - NCGRP, Fort Collins CO - U.S.A.

g matéria seca. O aumento na rapidez de desidratação melhorou a taxa de sobrevivência dos embriões a 25°C e 0°C. A sobrevivência de embriões desidratados a 0,29 g/g e expostos a 25°C (25,0% de sobrevivência) e 0°C (37,5% de sobrevivência), sugere que a criopreservação de embriões após terem sido submetidos à secagem ultra-rápida do método "flash-drying" e utilizando-se técnicas de congelamento ultra-rápido, talvez seja um método de conservação a longo prazo para essa importante espécie e abre uma promissora linha de pesquisa permitindo a eventual conservação a médio e longo prazo de sementes de outras espécies classificadas como recalcitrantes. Sugere-se novos estudos para aprimorar a técnica e o desenvolvimento de protocolo para o desenvolvimento de embriões de *A. angustifolia* que sobreviverem.

Palavras-chave: sementes, germoplasma, secagem, conservação

Sensitivity of Brazilian-pine (*Araucária angustifolia*) Embryos to Desiccation and Temperature.

ABSTRACT

The "recalcitrant" behavior of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze seeds (Brazilian pine) limits the conservation of genetic resources of this important species in *ex situ* genebanks. As initial steps in developing storage protocols, we studied the interaction of water content and temperature on embryo survival. Embryos were excised from seeds and "flash-dried" to water contents as low as 0.29 g water/g dry mass and then exposed to 0°C, -5°C and -18°C for 4 h. Drying rate was calculated from drying time courses and expressed as (g water / g dry weight) / hour. Other authors have studied the effects of desiccation of whole seed of *A. angustifolia* on viability. In order to compare moisture content of whole seeds to that of embryonic axes, seeds of *A. angustifolia* were placed on the bench (25°C and 25%RH) and left to dry. Fresh weight of intact seeds and embryos excised from these seeds were also measured. Water contents were calculated and expressed on dry weight basis as g water / g dw. Increasing drying rate improved

survival at lower water contents. Further, survival of embryos dried up to 0.29 g/g and exposure to 25° C (25% survival) and 0° C (37.5% survival) suggests that cryopreservation using ultra-rapid cooling techniques may provide a method for long-term conservation of this important species. We suggest new studies towards technical approaches.

Keywords: seeds, germplasm, Brazilian pine, desiccation, genetic conservation

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze destaca-se entre as espécies ameaçadas da Floresta de Araucárias. É uma espécie considerada pela Embrapa, como prioritária para conservação *ex-situ*. (MEDEIROS et al., 1998). A habilidade em conservar por longo prazo esse importante recurso genético na forma *ex-situ*, em bancos de sementes, está limitada pelo comportamento recalcitrante de suas sementes. A interação entre o teor de água e a temperatura de armazenamento, na sobrevivência do embrião, foi estudada como ponto de partida para o desenvolvimento de um protocolo para o armazenamento a longo prazo dessa espécie. O objetivo deste estudo foi verificar se embriões de *Araucaria angustifolia* poderiam sobreviver à desidratação ultra-rápida (método "flash-drying") e, adicionalmente, expô-los a baixas temperaturas e também observar a sua sobrevivência.

As sementes foram coletadas de 12 árvores em 4 municípios da região metropolitana de Curitiba e armazenadas em câmara a 5° C e 95% UR. Os experimentos foram conduzidos à partir de outubro de 2001 nos laboratórios da USDA-ARS National Center for Genetic Resources Preservation, Fort Collins, Colorado, U.S.A. Eixos embrionários foram extraídos e submetidos à desidratação ultra-rápida pelo método "flash-drying" utilizando-se jatos de nitrogênio gasoso por 0 a 3,17h. Em seguida, os eixos embrionários foram submetidos a temperatura ambiente (25° C) ou expostos por 4h a 0° C, -5° C e -18° C. Após desidratação e exposição às baixas temperaturas os embriões foram lentamente hidratados, plantados em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e colocados para germinar a 25° C em presença de luz fluorescente. A viabilidade dos embriões foi avaliada após 14 dias, considerando-se viáveis os embriões que se desenvolveram e produziram raiz. A taxa de desidratação foi calculada à partir dos períodos de desidratação e expressos em (g água / g matéria seca) / hora. Outros autores têm estudado os efeitos da desidratação na viabilidade de sementes

inteiras de *A. angustifolia*. Para a comparação do teor de água de sementes inteiras com os eixos embrionários, foi necessário secar as sementes de *A. angustifolia* a 25° C e 25% umidade relativa do ar. Determinou-se o peso de sementes frescas e de eixos embrionários das mesmas. O teor de água foi calculado na base seca e expresso em g água / g matéria seca.

O teor médio de água observado nos eixos embrionários recém extraídos foi de $1,45 \pm 0,44$ g água / g matéria seca. A Fig. 1 mostra a perda de água durante o processo de desidratação ultra-rápida verificado nos eixos embrionários recém extraídos de *A. angustifolia*. O conteúdo de água foi reduzido a 0,29 g água / g matéria seca em apenas 3 horas e 17 minutos.

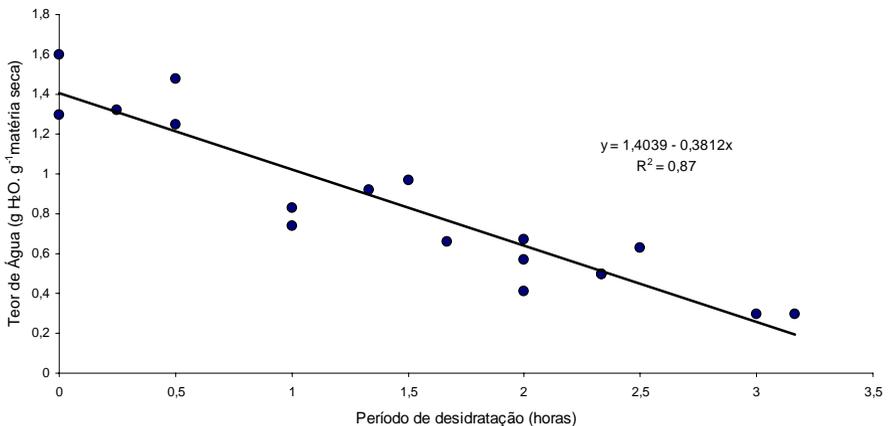


Figura 1. Desidratação ultra-rápida dos eixos embrionários de *Araucaria angustifolia*

Os eixos embrionários submetidos à desidratação ultra-rápida sobreviveram à perda de água tão baixa quanto 0,5 g/g a 25° C. Sobrevivência semelhante foi observada para embriões expostos a 0° C. Embriões se deterioraram progressivamente conforme mais baixas foram as temperaturas adotadas.

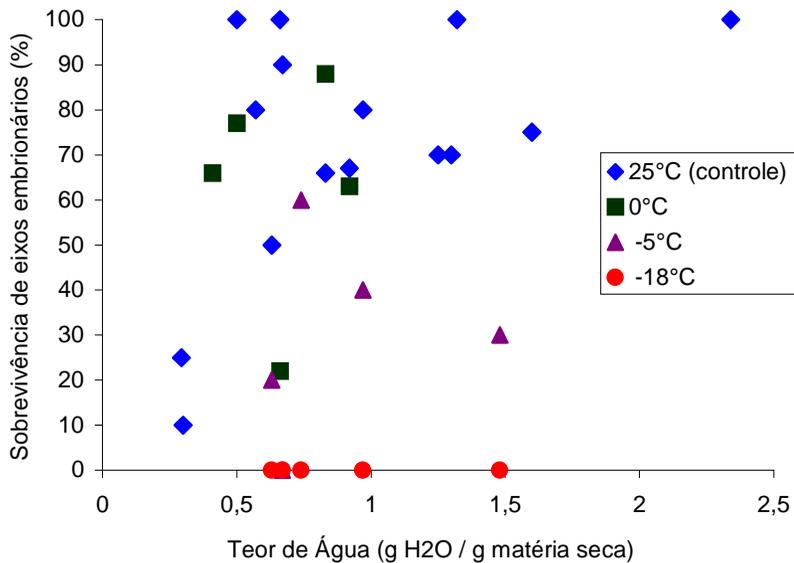


Figura 2. Sobrevivência de eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* submetidos à desidratação ultra-rápida e a diferentes temperaturas.

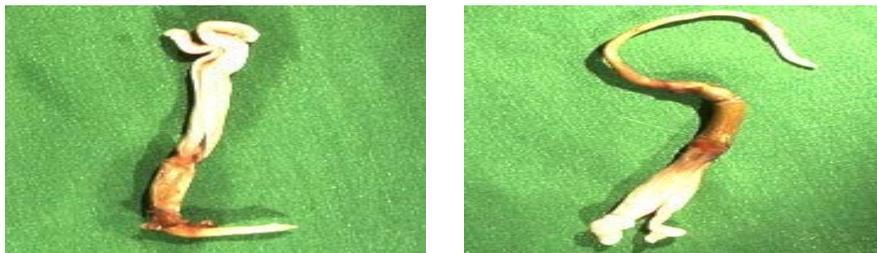


Figura 3. Eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* que sobreviveram à secagem ultra-rápida (3,17h), correspondendo ao conteúdo de água de 0,29 g água / g ms, e posteriormente expostos a 25°C (esquerda, com 25% de viabilidade) e 0°C (direita, com 37,5% de viabilidade).

De acordo com a Figura 4, o teor de água encontrado nos eixos embrionários foi mais elevado que o apresentado em sementes inteiras (endosperma + embrião). Essa curva de desidratação foi utilizada para converter os dados de Tompsett (1984) em unidades semelhantes de teor de água empregada neste trabalho.

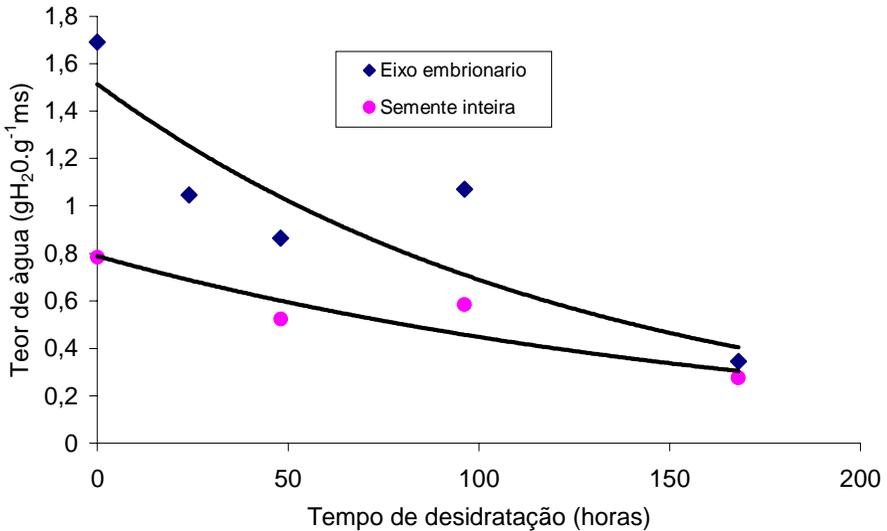


Figura 4. Comparação do processo de desidratação entre sementes inteiras e eixos embrionários de *A. angustifolia*, a 25° C e 25% umidade relativa do ar

Na Figura 5 estão os dados referentes ao conteúdo de água publicados em Tompsett (1984), que foram convertidos à mesma unidade de comparação (g água / g de matéria seca) para os eixos embrionários, utilizando-se as curvas de secagem da Figura 4.

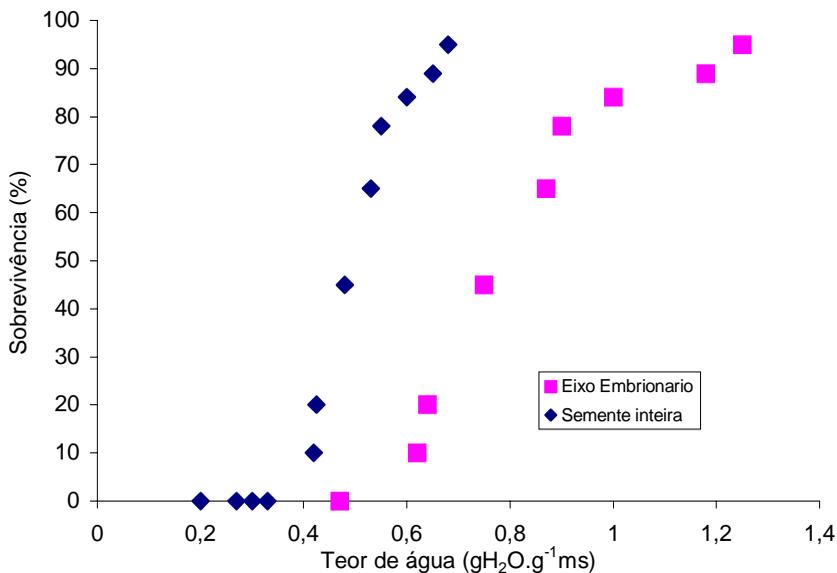
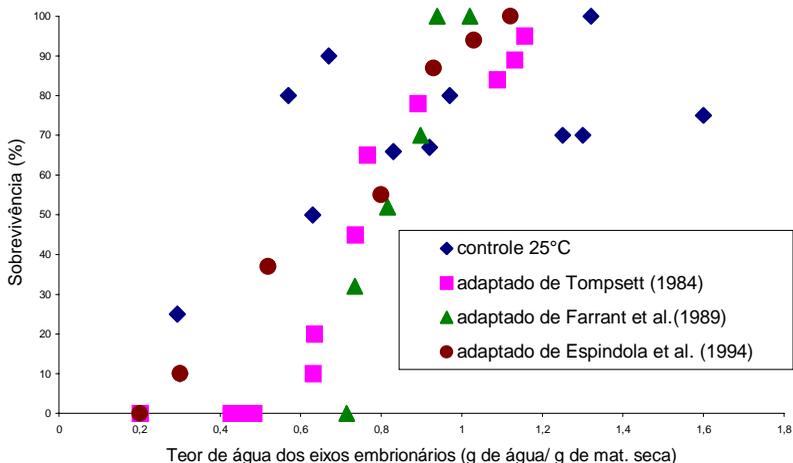


Figura 5. Dados retirados da Fig.4 (Tompsett, 1984) com sementes inteiras de *A. angustifolia* para estimar o teor de água dos eixos embrionários.



Controle 25°C: Taxa de Desidratação = - 0,38g H₂O/g matéria seca/h
 Adaptado de Salmen-Espindola et al. (1994): Taxa de Desidratação = - 0,15386 g H₂O/g matéria seca/h
 Adaptado de Tompsett (1984): Taxa de Desidratação = - 3,125 . 10⁻⁴ g H₂O/g matéria seca/h
 Adaptado de Farrant et al. (1989): Taxa de Desidratação = - 3,78739 . 10⁻⁴ g H₂O/g matéria seca/h

Figura 6. Relações entre viabilidade e o teor de água de eixos embrionários de *Araucaria angustifolia*, expressos em g H₂O / g matéria seca.

Os dados da Figura 6 referem-se ao teor de água de eixos embrionários. O conteúdo de água foi reduzido a 0,29 g água / g matéria seca em 3,17h, correspondendo à Taxa de Desidratação de aproximadamente – 0,38g H₂O / g matéria seca) / h. Pode-se observar que os processos de desidratação adotados por Salmen-Espindola et al. (1994) e também neste trabalho foram relativamente rápidos (> 0,1 g H₂O / g ms / h), quando comparados àqueles adotados por Tompsett (1984) e Farrant et al. (1989), onde a taxa de desidratação foi lenta (< 0,0003 g H₂O / g ms / h). Essa lentidão na desidratação ocorreu devido ao trabalho com sementes inteiras, adotado por esses autores. Nesta pesquisa observou-se que a desidratação ultra-rápida foi responsável pela sobrevivência dos eixos embrionários. Aumentando-se a velocidade de desidratação pelo método “flash-drying” elevou-se a sobrevivência dos embriões de *A. angustifolia* em baixos teores de água. De acordo com Pammenter et al. (2002), os embriões que foram desidratados de forma ultra-rápida, passaram diretamente, sem interrupção, de valores elevados de água à desidratação. Pammenter et al. (2002) explicam que esse processo é tão rápido, que os danos causados pelos processos deletérios não têm tempo de se acumular.

Este método adotado para *Araucaria angustifolia*, difundido por Medeiros e Walters (2002) abre uma promissora linha de pesquisa permitindo a eventual conservação a médio e longo prazo de sementes classificadas como recalcitrantes.

Observou-se que o aumento da velocidade de secagem teve efeito positivo sobre a sobrevivência de embriões. Eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* que sobreviveram à secagem ultra-rápida (3,17h), correspondendo ao conteúdo de água de 0,29g água / g matéria seca, e posteriormente expostos a 25° C (25,0% de viabilidade) e 0° C (37,5% de viabilidade).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ESALMEN-ESPINDOLA, L.; NOIN, M.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. **Seed Science Research**, v. 4, n. 2, p. 193-201, 1994.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Germination associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds: a study on three unrelated species. **Planta**, v. 178, n. 2, p. 189-198, 1989.

MEDEIROS, A. C. de S.; PROBERT, R. J.; SADER, R.; SMITH, R. D. The moisture relations of seed longevity in *Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl. **Seed Science and Technology**, v. 26, p. 289-298, 1998.

MEDEIROS, A. C. de S.; WALTERS, C.; HILL, L. Sensitivity of *Araucaria angustifolia* embryos to low water contents and temperature. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEED BIOLOGY, 7., 2002, Salamanca. **Workshop...** [S.l.]: International Society for Seed Science, 2002. p. 138.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; WESLEY-SMITH, J.; WILLIGEN, C. V. Experimental aspects of drying and recovery. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. London: CABI Publ., 2002. p. 93-110.

PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *Landolphia kirkii*. **Plant Physiology**, v. 96, n. 4, p. 1093-1098, 1991.

TOMPSETT, P.B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Biology**, v. 105, n. 3, p. 581-586, 1984.