

Desidratação ultra-rápida de embriões

Antonio Carlos de Souza Medeiros⁽¹⁾, Daniela Cleide Azevedo de Abreu⁽²⁾

⁽¹⁾Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, Km 111, Caixa Postal 319, CEP 83411-000, Colombo-PR. E-mail: medeiros@cnpf.embrapa.br

⁽²⁾Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Campus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/nº., CEP 14884-900, Jaboticabal-SP. E-mail: daniela@cnpf.embrapa.br

Resumo – Sementes de diversas espécies arbóreas das florestas úmidas brasileiras, grande parte delas ameaçadas de extinção, apresentam características recalcitrantes, significando que não toleram desidratação, não sendo possível o seu armazenamento pelos métodos tradicionais realizados com sementes ortodoxas. Dessa forma, o comportamento “recalcitrante” das sementes limita a conservação *ex-situ* dos recursos genéticos, especialmente dessas espécies florestais em bancos de sementes. Esse fato estimula pesquisadores a buscarem novas tecnologias visando a conservação genética dessas espécies. Nesse sentido, a técnica denominada “*flash-drying*” ou desidratação ultra-rápida de embriões mostra-se promissora para resolver ou amenizar o problema de conservação de espécies brasileiras com sementes recalcitrantes. Este trabalho tem como objetivo reunir informações e divulgar a técnica de desidratação ultra-rápida ou “*flash-drying*”, tornando-a amplamente acessível aos profissionais da área.

Termos para indexação: Desidratação ultra-rápida, secagem, armazenamento, sementes recalcitrantes.

Flash-drying for embryos desiccation

Abstract – Seeds of several tree species from Brazilian wet forest are in dangerous situation and show recalcitrant characteristics. Therefore, it is not possible to store them by traditional methods adopted with orthodox seeds and it limits their genetic resources *ex-situ* conservation in seed banks. This situation encourages researches to find news technologies in order to store these species in genebanks. Therein, flash-drying method for embryos desiccation shows to be a promising technique in order to resolve seed conservation of Brazilian endogenous tree species in genebanks. This paper has an objective of to become known the flash-drying technique and to be accessible to seed physiologists.

Index terms: Flash-drying, desiccation, seed storage, recalcitrant seeds

Introdução

São frequentes as discussões a respeito das crises de extinção de determinadas espécies florestais. O resultado dessas discussões aponta o homem como agente causador da perda de diversidade, através da super-exploração deliberada de recursos genéticos florestais. É fato que a imbuia [*Ocotea porosa* (Nees et Mart. ex Nees) L. Barroso] vem desaparecendo da Floresta Ombrófila Mista pois é muito procurada para a fabricação de móveis, esquadrias, laminação e instrumentos musicais. Outras espécies importantes também vêm sendo super-exploradas pelo homem, como a canela-sassafrás [*Ocotea odorifera* (Vellozo) Rochwer], rara na sua região de origem devido à extração de safrol e também por causa do elevado valor de sua madeira. A mesma erosão genética acontece com muitas outras

espécies de outros biomas, cujas sementes, por coincidência, apresentam características recalcitrantes, como palmito (*Euterpe edulis*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), castanheira (*Bertholletia excelsa*) e canjerana (*Cabralea canjerana*). Essa característica fisiológica significa que as sementes não toleram desidratação, não sendo possível o seu armazenamento pelos métodos tradicionais realizados com sementes ortodoxas (MEDEIROS et al., 1998). Dessa forma, o comportamento “recalcitrante” das sementes limita a conservação *ex-situ* dos recursos genéticos, especialmente dessas espécies florestais em bancos de sementes (TOMPSETT, 1984; FARRANT, 1989). Esse fato estimula pesquisadores a buscarem novas tecnologias visando à conservação genética dessas espécies. Nesse sentido, a técnica denominada *flash-drying* ou desidratação ultra-rápida de embriões mostra-

se promissora para resolver ou amenizar o problema de conservação de espécies brasileiras com sementes recalcitrantes.

Berjak e Pammenter foram pioneiros no trabalho com desidratação ultra-rápida. Esse método permite que a retirada de água do eixo embrionário ocorra de forma muito rápida, sem tempo suficiente para que os processos

degenerativos letais aconteçam (BERJAK et al., 1990; PAMMENTER et al., 1991; BERJAK et al., 1992; PAMMENTER et al., 1998; PAMMENTER; BERJAK, 1999; BERJAK et al., 1999; PAMMENTER et al., 2002). Na Tabela 1 são apresentados os teores de água dos embriões de diferentes espécies e os respectivos tempos de desidratação.

Tabela 1. Efeito da desidratação ultra-rápida (*flash-drying*) em embriões de diferentes espécies.

Espécies	Teores de água dos embriões Base seca		Tempo de desidratação (minutos)	Referência
	Antes do <i>flash-drying</i>	Após o <i>flash-drying</i>		
<i>Landolphia kirkii</i>	1,5 g/g	0,4 g/g	60	Berjak et al., 1992
<i>Camellia sinensis</i>	1,5 a 3,0 g/g	0,5 g/g	30	Berjak et al., 1993; Walters et al., 2001.
<i>Landolphia kirkii</i>	1,5 g/g	0,32 g/g	30	Pammenter et al., 1991
<i>Araucaria angustifolia</i>	1,45 ± 0,44 g/g	0,29 g/g	197	Medeiros e Walters, 2002; Medeiros et al., 2004

O objetivo desse trabalho é reunir informações e divulgar a técnica de desidratação ultra-rápida ou *flash-drying*, tornando-a amplamente acessível aos profissionais da área. Com isso, abre-se uma promissora linha de pesquisa permitindo a eventual conservação a médio e longo prazo de sementes de espécies recalcitrantes, principalmente aquelas ameaçadas de extinção.

Desenvolvimento do protocolo de desidratação ultra-rápida em *Araucaria angustifolia*

Mais recentemente, a interação entre o conteúdo de água e temperatura sobre a sobrevivência do embrião de *Araucaria angustifolia* foi estudada por Medeiros et al. (2004) como ponto de partida para o desenvolvimento de um protocolo para o armazenamento dessa espécie, empregando a técnica *flash-drying*. Nessa pesquisa, cujo objetivo principal foi verificar se embriões de *Araucaria angustifolia* sobreviveriam à desidratação ultra-rápida, a experiência com o método foi bem sucedida.

As sementes de *A. angustifolia* foram extraídas manualmente dos frutos e a seguir realizados cortes longitudinais com o auxílio de guilhotina no protocarpó (pinhão), para a excisão do embrião. Os embriões foram

extraídos manualmente com o auxílio de bisturi e agulha histológica. Após a retirada, determinou-se o teor de água inicial em uma amostra, enquanto o restante foi imerso em solução anti-oxidante para a continuidade dos estudos.

Sementes de *Araucaria angustifolia* foram coletadas de 12 árvores em quatro municípios da região metropolitana de Curitiba, embaladas em plástico e armazenadas em câmara com temperatura de 5 °C e 95 % UR. Os embriões foram extraídos e submetidos à desidratação ultra-rápida pelo método *flash-drying*, utilizando-se jatos de nitrogênio gasoso por 0 a 3,17 h. No impedimento do uso de gás de nitrogênio, é igualmente viável a adoção de ar comprimido em cilindros.

Embriões desidratados foram lentamente hidratados por 30 minutos em placa de Petri com diâmetro de 9,0 mm, sobre duas folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada e deionizada. Após a hidratação, os embriões foram plantados em meio de cultura MS, meia força, conforme Murashige e Skoog (1962) e colocados para germinar a 25 °C na presença de luz fluorescente. A viabilidade dos embriões foi avaliada após 14 dias, considerando-se viáveis aqueles que se desenvolveram e produziram raiz e plúmula.

A taxa de desidratação foi calculada a partir dos períodos de desidratação e expressos em (gramas de

água / gramas de matéria seca) / hora. O conteúdo de água foi calculado na base seca e expresso em gramas de água / grama de matéria seca.

Determinação dos teores de água

O teor de água foi determinado gravimetricamente, conforme Vertucci e Roos (1990). Podem ser adotadas três repetições de 20 embriões cada, colocados em recipientes de alumínio e submetidos à temperatura de 95 °C durante cinco dias. Como os embriões são bastante sensíveis e para muitas espécies eles são de dimensões diminutas, podem ser confeccionados pequenos cartuchos com pedaços retangulares de papel de alumínio enrolados em um lápis comum. Dobra-se uma das extremidades para formar um tipo de “copinho” onde são colocados os embriões. Os procedimentos seguintes visando à determinação dos teores de água seguem as normas existentes nas regras para análise de sementes (BRASIL, 1992) e os resultados expressos em grama de água por grama de matéria seca (base seca).

Imersão em solução anti-oxidante

Para evitar a oxidação dos embriões excisados, recomenda-se que estes sejam imediatamente imersos em solução anti-oxidante (10 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico e 5 mg L⁻¹ de ácido cítrico), conforme CHIN et al. (1988), permanecendo embebidos até o momento da instalação dos experimentos.

Avaliação da qualidade fisiológica inicial dos embriões

A assepsia é fundamental na condução do teste de germinação de embriões em meio de cultura. Os embriões precisam ser manuseados em capela de fluxo laminar, livre de contaminação, com o máximo cuidado para evitá-la. Nessa capela, os embriões são colocados em placas de Petri esterilizadas, sobre papel de filtro umedecido com água destilada e autoclavada, para que a reidratação ocorra lentamente. A seguir, para a assepsia, os embriões são transferidos para copos de Beacker contendo solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1,0 %, com duas gotas de detergente

neutro, onde permanecem embebidos durante 10 minutos. Em seguida, são lavados em água destilada e autoclavada, por oito vezes e colocados para germinar em placa de Petri contendo meio de cultura MS Murashige e Skoog (1962) (este meio de cultura foi determinado para os embriões de *Araucaria angustifolia*. Para outras espécies, devem ser avaliados outros meios de cultura, como MS, MS + carvão, WPM, WPM + carvão e outros onde o embrião da espécie a ser estudada melhor se desenvolva), modificado pela metade da concentração e com adição de 5 mL L⁻¹ de PPM (*Plant Preservative Mixture*®: *Plant Cell Technology, Inc.*). É importante a condução de ensaios preliminares a fim de que seja definido o meio de cultura mais apropriado para a espécie. Bons resultados são obtidos quando emprega-se clorofenicol, na forma de comprimido de 500 mg do produto comercial (Neo Fenicol, da NEO QUÍMICA), diluído em 20 mL de água destilada e deionizada, para formação da solução estoque. Para uso no meio de cultura, toma-se 4 mL dessa solução estoque e dilui-se em 16 mL de água, de onde são retirados 4 mL L⁻¹ para misturar no meio de cultura preparado. É importante que, uma vez plantados em placa de Petri, estas sejam deixadas em descanso por 48 horas no interior de uma caixa de papelão fechada e já no ambiente esterilizado da sala de cultura, ou seja, sob temperatura de 25 °C. Passadas as 48 horas, as placas devem ser transferidas da caixa escura para as prateleiras da sala de cultura sob iluminação fluorescente constante. Cada tratamento deve ser representado por seis a dez repetições formadas por 10 placas de Petri contendo um embrião em cada placa.

Durante o período de duração do teste de viabilidade, avaliações semanais devem ser realizadas, até a contagem final, devendo ser definidas em ensaios preliminares. São considerados germinados os embriões que emitirem raiz primária de determinado comprimento, obtendo-se a porcentagem total de embriões viáveis.

Os embriões podem ser avaliados, também, por um índice de qualidade correspondente ao aspecto morfológico apresentado pelos mesmos. Para o caso das pesquisas com *Araucaria angustifolia*, foram atribuídas notas variando de zero a oito, definidas em ensaios preliminares e especificadas na Tabela 2.

Tabela 2. Escala de notas adotadas na avaliação da qualidade dos embriões de *A. angustifolia*.

Nota	Característica morfológica do embrião
0	Morto.
1	Arqueado para fora do meio de cultura, porém, sem raiz e sem plúmula.
2	Arqueado para fora do meio de cultura, porém, sem raiz com plúmula.
3	Arqueado para fora do meio de cultura, com raiz curta, porém, sem plúmula.
4	Arqueado para fora do meio de cultura, com raiz e plúmula curtas.
5	Arqueado para fora do meio de cultura, com raiz longa, porém, sem plúmula.
6	Arqueado para fora do meio de cultura, com raiz curta e plúmula desenvolvida.
7	Arqueado para fora do meio de cultura, com raiz longa e plúmula curta.
8	Arqueado para fora do meio de cultura, com raiz e plúmula desenvolvidas.

Considerando outras espécies, deve ser definida a escala específica de notas para a avaliação da qualidade dos embriões, com base nas suas características morfológicas.

Avaliação da Integridade do sistema de membranas

Pode-se avaliar a integridade do sistema de membranas pela medição da condutividade elétrica da água de embebição dos embriões, de acordo com Espindola et al. (1994).

Para outras espécies, pode-se adotar uma modificação do protocolo empregado para os embriões de *Araucaria angustifolia*. Nesse caso, foram utilizados 10 embriões em 75 mL de água destilada e deionizada por 24 horas na temperatura de 25 °C, em aparelho condutímetro CONSORT C830.

Teste de tetrazólio

O teste de tetrazólio apresenta-se como excelente ferramenta para a avaliação dos embriões que venham a ser submetidos à desidratação ultra-rápida. Embora constem as instruções do teste de tetrazólio para *Araucaria* spp. nas regras para a análise de sementes (BRASIL, 1992), desenvolveu-se um protocolo específico

para *Araucaria angustifolia*. Adotaram-se a concentração de 0,2 % do sal de tetrazólio e o tempo de coloração de quatro horas, na temperatura de 40 °C, sem pré-condicionamento. Na avaliação do teste de tetrazólio foram considerados germináveis os embriões inteiramente coloridos; embriões com extremidade de cotilédones sem coloração; e embriões com mais de 50 % dos cotilédones coloridos, permitindo-se o aparecimento de pequenas manchas esparsas, desde que a radícula não tenha sido afetada.

Desidratação ultra-rápida de embriões

O método de desidratação ultra-rápida consiste na passagem de um fluxo de gás de nitrogênio (Figura 1) através da massa de embriões, conforme Pammenter et al. (1991).

Nesse método, os embriões excisados são uniformemente espalhados sobre uma tela metálica de malha fina no interior de caixas de plástico do tipo gerbox (Figura 1) e expostos a esse forte fluxo de gás por diferentes períodos, desde o tempo zero (Testemunha, sem exposição) até o momento em que percam sua viabilidade. No caso de embriões de *Araucaria angustifolia*, este fato aconteceu com 3,17 horas (MEDEIROS et al., 2002). Caso os embriões percam a viabilidade ainda com valores elevados de água, significa



Figura 1. Detalhes da caixa do tipo gerbox com o aparato para a desidratação ultra-rápida

que a desidratação não ocorreu de forma ultra-rápida, ou seja, aconteceram processos degenerativos letais ao embrião. Esse fato pode ser observado pelo teste de tetrazólio e confirmado pelo teste de condutividade elétrica.

A curva de desidratação foi observada em intervalos determinados por meio de ensaios preliminares. Deve-se destacar que no início do processo de desidratação ultra-rápida o tempo de exposição deve ser menor, variando entre 3 a 5 minutos. A desidratação se processa com maior rapidez nos níveis mais altos de água e torna-se mais difícil à medida em que o embrião vai ficando mais seco. Como o teor de água dos embriões de *Araucaria angustifolia* é muito alto, em torno de 52 % (base úmida), depara-se com uma parte da “água livre” que é facilmente removida por esse fluxo de gás de nitrogênio.

Para que esse método pudesse ser empregado, foi desenvolvido no Banco de Sementes Florestais da *Embrapa Florestas* – BASEMFLOR® (responsável pela produção, análise, treinamento e desenvolvimento de pesquisas em sementes florestais nativas), um aparato próprio para a desidratação ultra-rápida, baseado em equipamento utilizado no NCGRP, USA, mostrado na Figura 2.

Cada período de exposição dos embriões nos diferentes tratamentos de desidratação conferiu um determinado teor de água específico para os mesmos.

A partir dos dados obtidos pela desidratação torna-se possível a elaboração de uma curva de desidratação, que pode ser implementada com auxílio de *softwares* gráficos, dentre eles o *Sigma Plot*.

Delineamento Experimental

Aos interessados na aplicação dessa metodologia, recomenda-se que os experimentos sejam instalados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado. Os valores de porcentagem devem ser transformados em arc seno $\sqrt{\text{ÖP}/100}$ e a comparação entre as médias realizada pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. As curvas de desidratação e os experimentos de armazenamento podem ser estudadas por meio de regressão polinomial e os gráficos elaborados com auxílio de *software* gráfico.



Figura 2. Aparato desenvolvido no BASEMFLOR® para a operação de secagem ultra-rápida em eixos embrionários.

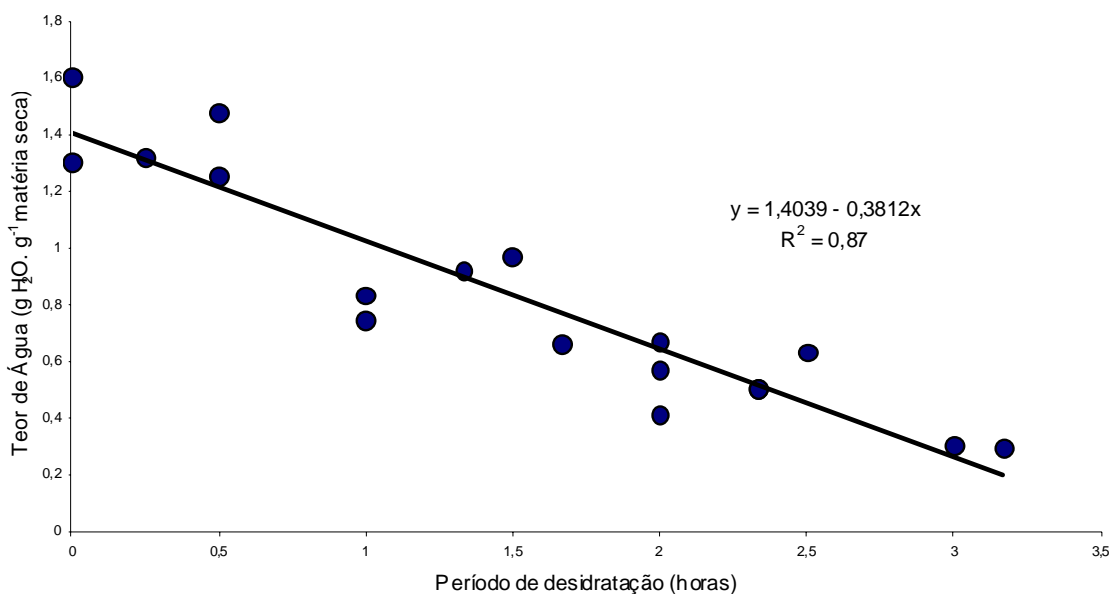


Figura 3. Desidratação ultra-rápida obtida em eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (MEDEIROS et al. 2004).

Considerações finais

O método mostrou-se eficaz para a operação de desidratação ultra-rápida (*flash-drying*) de eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* (Figura 3), conseguindo-se sobrevivência de embriões desidratados a baixos teores de água (Figura 4).

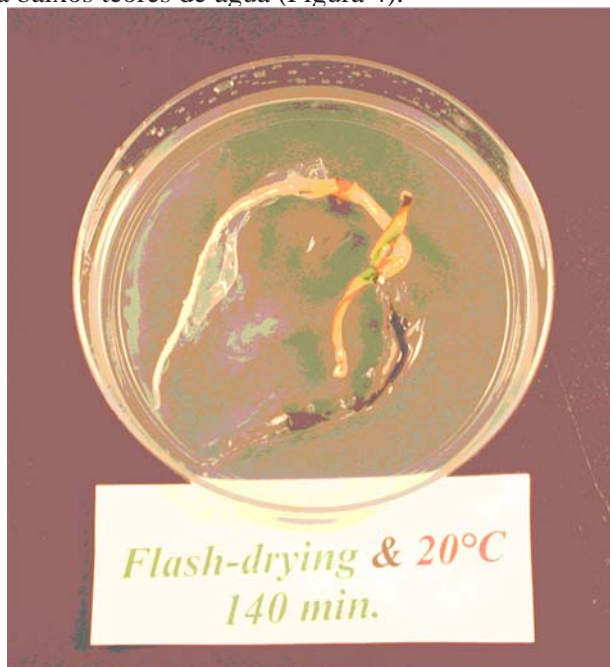


Figura 4. Eixo embrionário de *Araucaria angustifolia* exposto à desidratação ultra-rápida, por 140 minutos, e colocado para germinar em meio de cultura. “Nota 7: Arqueado para fora do meio de cultura, com raiz longa e plúmula curta”.

Vislumbra-se, dessa forma, a possibilidade para conservação a longo prazo não só dessa importante espécie, como também para outras espécies florestais com características recalcitrantes, ameaçadas de extinção. Uma vez desidratado, o embrião encontra-se disponível para o desenvolvimento de estudos de armazenamento, envolvendo, à partir desse ponto, a pesquisa de diferentes condições de conservação, inclusive por criopreservação.

Posteriormente, o aparato para a condução dos estudos de desidratação ultra-rápida foi aperfeiçoado, de forma a permitir que o controle do fluxo de gás de nitrogênio pudesse ser melhor controlado. Foi então desenvolvido o sistema constante nas Figuras 5 e 6.



Figura 5. Aparato para a desidratação ultra-rápida desenvolvida no Laboratório de Análise de Sementes do BASEMFLORE – Embrapa Florestas.



Figura 6. Detalhes do aparato para a desidratação ultra-rápida desenvolvida no Laboratório de Análise de Sementes do BASEMFLOR – Embrapa Florestas.

Referências

- BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; MYCOCK, D. J.; PAMMENTER, N. W. Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation-sensitivity. **Seed Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 297-310, 1990.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W. Homoiohydrous (recalcitrant) seeds: development status, desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. **Planta**, v. 186, n. 2, p. 249-261, 1992.
- BERJAK, P.; VERTUCCI, C. W.; PAMMENTER, N. W. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. **Seed Science Research**, n. 3, p. 155-166, 1993.
- BERJAK, P.; WALKER, M.; WATT, M. P.; MYCOCK, D. J. Experimental parameters underlying failure or success in germplasm cryopreservation: a case study on zygotic axes of *Quercus robur* L. **Cryo-Letters**, v. 20, p. 251-262, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. 365 p.
- CHIN, H. F.; KRISHNAPILLA, B.; ALANG, Z. C. Media for embryo culture of some tropical recalcitrant species. **Pertanika**, Selangor, v. 11, n. 3, p. 357-363, 1988.
- ESPINDOLA, L. S.; 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. 176, 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. Sensitivity of *Araucaria angustifolia* embryos to low water contents and temperature. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEED BIOLOGY, 7., 2002, Salamanca. [Workshop...] Salamanca: International Society for Seed Science. p. 138.
- MEDEIROS, A. C. de S.; WALTERS, C.; HILL, L. Sensibilidade de embriões do pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia*) à desidratação e baixa temperatura. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 48, p. 128-137, jan./jul. 2004..
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, 473-497, 1962.
- PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, v. 9, p. 13-37, 1999.
- 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.; GREGGAINS, V.; KIOKO, J. I.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; FINCH-SAVAGE, W. E. Effects of differential drying rates on viability retention of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, v. 8, p. 463-471, 1998.
- PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P. Homeiohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability in *Landolphia kirkii*. **Plant Physiology**, v. 96, p. 1093-1098, 1991.
- TOMPSETT, P. B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Biology**, n. 105, p. 581-586, 1984.
- VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E. Theoretical basis of protocols for seed storage. **Plant Physiology**, v. 94, p. 1019-1023, 1990.
- WALTERS, C.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, n. 11, p. 135-148, 2001.

Recebido em 28 de setembro de 2006 e aprovado 01 de março de 2007