



III CONGRESSO PARANAENSE DE AGROECOLOGIA - III CPA  
III PARANÁ AGROECOLÓGICO  
5 a 9 de novembro 2018  
Foz do Iguaçu-PR, Brasil

## Estudos Preliminares Para a Criopreservação de Sementes de *Araucaria angustifolia*

LEAL, Isaias Luis<sup>1</sup>; BONOME, Lisandro Tomas da Silva<sup>2</sup>; CARVALHO, José Henrique<sup>1</sup>; ROSA, Alan Rherison Silva<sup>1</sup>

1 Discente de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Laranjeiras do Sul, PR, isaiasleal\_10@hotmail.com; josehenriquecarvalho1958@gmail.com; alanrherison@hotmail.com; 2 Prof. Adjunto do curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Laranjeiras do Sul, PR, lisandrobonome@gmail.com

Seção Temática: Manejo de Agroecossistemas Sustentáveis

### Introdução

Pertencente ao bioma Mata Atlântica, a *Araucaria angustifolia*, é uma árvore característica da tipologia Floresta Ombrófila Mista, e suas sementes, além de servirem de alimento à fauna silvestre, ocupam seu espaço na culinária humana, se tornando uma estratégia de renda para muitas famílias rurais (ZECHINI et al., 2012).

A principal forma de propagação da espécie é por meio de sementes, que apresentam condições de armazenamento limitada devido sua natureza recalcitrante. Sementes com esse comportamento perdem totalmente a viabilidade em teores de água abaixo dos 37%. Com isso, devem ser armazenadas com alta umidade, o que mantém o seu metabolismo acelerado e contribui com a deterioração (GARCIA et al., 2014). O congelamento é uma alternativa para a conservação de sementes de espécies recalcitrantes, porém, devido ao seu elevado grau de umidade torna-se necessária uma desidratação prévia das sementes, evitando a formação de cristais de gelo no interior das células e consequentemente sua morte (STEGANI et al., 2017).

Uma das técnicas para desidratar as sementes recalcitrantes é por osmose com soluções crioprotetoras (VOLK; WALTERS, 2006). No entanto, os crioprotetores podem ser tóxicos ou causar estresse osmótico, levando as células a morte. A aclimação das sementes aos estresses osmótico e de baixa temperatura e a aplicação de ácido abscísico (ABA) exógeno também podem se constituir numa importante ferramenta para o sucesso do congelamento de sementes recalcitrantes, visto que estas práticas induzem a expressão de genes para a produção de proteínas de defesas aos estresses (SERAPHIN; FRESCHI, 2008).

Diante disso, o objetivo do trabalho foi verificar o efeito da aplicação exógena de ácido abscísico, aclimação e da crioproteção no congelamento de sementes de *A. angustifolia*, visando estabelecer um protocolo para a espécie.

### Metodologia

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* Laranjeiras do Sul-PR. Selecionou-se sementes que não apresentavam início de germinação, miúdas, menor que 3,5 cm, chochas e atacadas pela larva *Cyda araucariaceae*.

Foram conduzidos dois bioensaios. Em ambos retirou-se o tegumento das sementes deixando somente as amêndoas, as quais foram dispostas em papel de germinação umedecido em três



vezes a sua massa com solução de 5 mg L<sup>-1</sup> de ABA e aclimatadas sucessivamente em 25, 20, 15 e 10°C por 24 h, cada temperatura em BOD. Após a aclimação, as sementes foram imersas em solução PVS2 (0,4 M de sacarose, 30% (v/v) de glicerol, 15% (v/v) de etilenoglicol e 15% (v/v) de dimetilsulfóxido) por 36 horas. A solução foi aerada com uma bomba de aquário ligada a uma pedra porosa. Concluído o tempo de imersão, as amêndoas foram lavadas em água corrente por 30 segundos e secas em papel germitest. Após, no bioensaio I foram congeladas em ultrafreezer com temperatura de -86°C, por 9 horas e no bioensaio II congeladas em freezer a -20 °C, por 15 dias. Ao término do período de congelamento, as amêndoas foram acondicionadas em plástico zipado e colocadas em banho maria a 40°C por 1h para o descongelamento. Em seguida, para o bioensaio I, foi realizado o teste de tetrazólio, e para o bioensaio II, o teste de emergência em bandejas.

O delineamento experimental utilizado para o bioensaio I foi o inteiramente casualizado com 3 tratamentos e quatro repetições de 25 sementes: T1-Testemunha; T2- Aplicação exógena de 5 mg L<sup>-1</sup> de ABA e aclimação sucessiva em 25, 20, 15 e 10°C por 24 h + imersão em PVS2 por 36 horas; T3- Aplicação exógena de 5 mg L<sup>-1</sup> de ABA e aclimação sucessiva em 25, 20, 15 e 10°C por 24 h + imersão em PVS2 por 36 horas + Congelamento em ultrafreezer -86°C (9 horas). O bioensaio II, foi semelhante ao I, com exceção ao tratamento (T3), em que as amêndoas foram congeladas em freezer - 20°C (15 dias). Os dados foram avaliados pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa SISVAR.

## Resultados e discussões

O grau de umidade inicial das amêndoas de *A. angustifolia* dos bioensaios I e II foi de 51,28%. No bioensaio I, o tratamento com ABA + aclimação + PVS2 reduziu a viabilidade das sementes em 15 pontos percentual, indicando que o pré-tratamento realizado antes do congelamento foi prejudicial as sementes. A redução na viabilidade das sementes provavelmente ocorreu devido a utilização da solução de PVS2 que pode ter reduzido demasiadamente a umidade das sementes ou ter sido fitotóxica ao embrião.

Quando as sementes foram congeladas em ultrafreezer, obteve-se 19% de embriões coloridos de vermelho, indicando viabilidade pelo teste de tetrazólio. Embora este valor seja 60 pontos percentual menor do que o observado na testemunha, é um resultado muito promissor levando em consideração o comportamento recalcitrante das sementes de *A. angustifolia*.

TABELA 1. Bioensaio I - Percentual de embriões viáveis pelo teste de tetrazólio nos diferentes tratamentos e bioensaio II percentual de plântulas emergidas nos diferentes tratamentos.

Bioensaio I		Bioensaio II	
Tratamento	Viabilidade pelo teste de tetrazólio (%)	Tratamento	Emergência de plântulas (%)
Testemunha	79 A	Testemunha	94 A
ABA+ Aclimação+ PVS2	64 B	ABA+Aclimação+ PVS2	23 B
ABA+Aclimação+PVS2+ultrafreezer	19 C	ABA+Aclimação+PVS2+ freezer	0 C
CV (%)	25,60	CV (%)	6,62

Médias com a mesma letra maiúscula entre colunas não diferem entre si, por Tukey (5%)



III CONGRESSO PARANAENSE DE AGROECOLOGIA - III CPA  
III PARANÁ AGROECOLÓGICO  
5 a 9 de novembro 2018  
Foz do Iguaçu-PR, Brasil

Em função dos bons resultados obtidos no bioensaio I, realizou-se o bioensaio II, analisando-se a porcentagem de emergência de plântulas ao invés do teste de tetrazólio. Esse último apresenta subjetividade que provoca variações de resultados entre analistas (KRZYZANOWSKI, 1994).

No bioensaio II observou-se uma porcentagem de emergência de plântulas de 94%, a qual foi reduzida em 71 pontos percentuais quando submetidas aos tratamentos com ABA + aclimatação + PVS2. Quando as sementes foram congeladas em freezer a -20°C ocorreu 100% de mortalidade.

Diversos autores consideram o congelamento lento (como no freezer a -20°C) inapropriado para as sementes recalcitrante e recomendam o congelamento rápido (TAIZ et al., 2017). Sugere-se que a mudança na forma de congelamento das sementes entre os bioensaios I e II seja o responsável pela diferença apresentada na viabilidade das sementes. Entretanto, não se pode descartar a subjetividade do teste de tetrazólio, em que as sementes do bioensaio I podem ter sido consideradas viáveis embora estivessem inviáveis.

### Considerações finais

O pré-tratamento com ABA + Aclimatação + PVS2 é fitotóxico as sementes. Embora os resultados encontrados no presente trabalho sejam promissores não foi possível estabelecer um protocolo eficiente de congelamento para as sementes de *A. angustifolia*.

### Referências

- GARCIA, C.; COELHO, C. M. M.; MARASCHIN, M.; OLIVEIRA, L. M. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze Durante o armazenamento. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 4, p. 857-867, 2014.
- KRZYZANOWSKI, C. F. Relato de testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.1, n.2, p.59-61, 1994.
- STEGANI, V.; ALVES, G. A. C.; BERTONCELLI, D. J.; FARIA, R. T. Criopreservação de sementes de rainha do abismo (*Sinningia leucotricha*). **Revista Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 15-21, 2017.
- SERAPHIN, E. S.; FRESCHI, L. Ácido Abscísico. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Guanabara, RJ: KOOGAN, 2008. Cap. 12. P. 255-269.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6° Ed. Porto Alegre: Artmed. 2017. 858p.
- VOLK, G.M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, v.52, n.1, p.48- 61, 2006.
- ZECHINI, A. A.; SCHUSSLER, G.; SILVA, J. Z.; MATTOS, A. G.; PERONI, N.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. Produção, Comercialização e Identificação de Variedades de Pinhão no Entorno da Floresta Nacional de Três Barras – SC. **Biodiversidade Brasileira Revista Científica**, v. 2, n. 2, p. 74-82, 2012.