

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS

CAROLINA DE FARIA CABRAL PAES PEREIRA E BARROS

**Criopreservação de sementes de espécies florestais do bioma
Pantanal**

CÁCERES
MATO GROSSO-BRASIL
MARÇO DE 2018

CAROLINA DE FARIA CABRAL PAES PEREIRA E BARROS

**Criopreservação de sementes de espécies florestais do bioma
Pantanal**

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Biotecnologia e Recursos Genéticos Vegetais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador Prof. Dr. Petterson Baptista da Luz

Co-orientador: Prof. Dr. Severino de Paiva Sobrinho

CÁCERES
MATO GROSSO–BRASIL
MARÇO DE 2018

Walter Clayton de Oliveira CRB 1/2049

B277c BARROS, Carolina De Faria Cabral Paes Pereira e.
Criopreservação de Sementes de Espécies Florestais do Bioma
Pantanal / Carolina De Faria Cabral Paes Pereira e Barros – Alta
Floresta/ Cáceres/ Tangará da Serra, 2018.
47 f.; 30 cm.(ilustrações) Il. color. (sim)

Trabalho de Conclusão de Curso
(Dissertação/Mestrado) – Curso de Pós-graduação *Stricto Sensu*
(Mestrado Acadêmico) Genética e Melhoramento de Plantas,
Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Multicampi,
Universidade do Estado de Mato Grosso, 2018.

Orientador: Petterson Baptista da Luz
Coorientador: Severino de Paiva Sobrinho

1. Armazenamento. 2. Germinação. 3. Vigor. 4. Crioprotetor. I.
Carolina De Faria Cabral Paes Pereira e Barros.
II. Criopreservação de Sementes de Espécies Florestais do Bioma
Pantanal

CDU 631.53.01

Criopreservação de sementes de espécies florestais do bioma Pantanal

CAROLINA DE FARIA CABRAL PAES PEREIRA E BARROS


Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 23 de março de 2018.

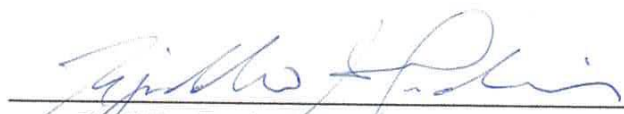
Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Peterson Baptista da Luz

(Dr. em Agronomia /Produção e Tecnologia de Sementes) – UNEMAT (Orientador)


Prof. Dr. Severino de Paiva Sobrinho

(Dr. em Agricultura Tropical) - UNEMAT


Prof. Dr. Reginaldo Antônio Medeiros

(Dr. em Ciências Florestal) – IFMT

Dedico

A minha mãe Suelena Luzia e avó Laudelina de Faria Cabral Paes, pelo amor, carinho, compreensão, incentivo, confiança e fé dedicados a mim.
Aos pais Américo Vitalino pelo apoio, amor e carinho e, João Roberto Barros (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

- Á Deus, pela vida, saúde, força e fé!
- À Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas - PGMP pela oportunidade da realização do curso.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso - FAPEMAT pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsa.
- Ao Professor Doutor Petterson Baptista da Luz pela confiança depositada em mim para a execução dos trabalhos desenvolvidos, pela amizade, dedicação, apoio e orientação em todos os momentos requisitados, em especial durante o desenvolvimento dos experimentos para a elaboração da dissertação, e pela oportunidade de participar das atividades do laboratório.
- Ao Professor Doutor Severino de Paiva Sobrinho pela co-orientação, amizade e disponibilidade em transmitir o seu conhecimento, seja durante as análises para a elaboração da dissertação, nas conversas descontraídas ou durante a execução das atividades do laboratório.
- Ao Professor Doutor Reginaldo Antônio Medeiros, pela disponibilidade em colaborar para a melhoria da qualidade desse trabalho.
- Ao Professor Doutor Nilo Sander pela valiosa amizade, conselhos, incentivo e sobretudo auxílio durante as análises para a elaboração da dissertação.
- A todos os professores do PGMP, em especial ao professor Doutor Marco A. A. Barelli, pelos conselhos, ensinamentos e oportunidades dadas para o meu crescimento e amadurecimento profissional.
- Aos colegas da turma de mestrado, em especial a Thallita, Michele, Isabela, Lidiane e Roberta por todos os momentos de estudo, alegrias, sonhos, e angustias compartilhadas.
- As amigas Vanessa, Jéssica, Ana e Luana, que levo para a vida, pelos momentos de carinho, descontração, companheirismo e incentivo durante todo o curso.

- Aos companheiros e amigos do Laboratório de Sementes e Plantas Ornamentais da UNEMAT-*Campus* Cáceres, Carolina de Medeiros, Vinicius dos Anjos, Ronaldo Kuntz, Ariane de Faria e Marcos A. da Silva Jr., por todo o auxílio, amizade e dedicação ao trabalho, mesmo em momentos difíceis.

- Aos prestadores de serviço e servidores da UNEMAT, em especial ao Luiz, Greice, Rosi, Cleiton, Edicleverson, Raquel, Mayara e Marta pela dedicação ao trabalho e contribuir para que a minha pesquisa e de todos vinculados ao *Campus* de Cáceres, mesmo que com alguns percalços, fossem possíveis de serem executadas.

- Enfim, a todos aqueles que não mencionei, mas que de alguma forma contribuíram para a conclusão dessa etapa.

BIOGRAFIA

Carolina de Faria Cabral Paes Pereira e Barros, filha de João Roberto Barros e Suelena Luzia de Faria Cabral Paes, nasceu em Cáceres – MT, onde realizou toda a sua formação até o momento. No ano de 2009 se formou no Curso Técnico em Florestas pela Escola Agrotécnica Federal de Cáceres e em 2010 ingressou no Curso Bacharelado em Engenharia Florestal pelo Instituto Federal de Mato Grosso - IFMT, sendo diplomada no ano de 2015. Em fevereiro de 2016 iniciou o curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas na UNEMAT, vinculada a linha de pesquisa de Biotecnologia e Recursos Genéticos Vegetais, desenvolveu e participou de projetos com vistas a conservação e armazenamento de sementes florestais do bioma Pantanal, no Laboratório de Sementes e Plantas Ornamentais do Curso de Agronomia da UNEMAT- *Campus Cáceres*.

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| AGRADECIMENTOS | V |
| BIOGRAFIA | VII |
| RESUMO | IX |
| ABSTRACT | X |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. O BIOMA PANTANAL..... | 3 |
| 2.2. CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES EM ESTUDO..... | 4 |
| 2.2.1. <i>Aroeira- Myracrodruon urundeuva</i> Allem. | 4 |
| 2.2.2. <i>Canafístula- Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert | 6 |
| 2.2.3. <i>Gonçalo Alves-Astronium fraxinifolium</i> Schott..... | 8 |
| 2.2.4. <i>Ipê amarelo- Handroanthus chrysotrichus-</i> (Cham.) Standl. | 10 |
| 2.2.5. <i>Ipê roxo- Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos | 11 |
| 2.3. CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS | 13 |
| 2.4. CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA | 13 |
| 2.4.1. <i>Criopreservação</i> | 14 |
| 2.4.2. <i>Métodos de Criopreservação-Clássico e Contemporâneo</i> | 16 |
| 2.4.3. <i>Crioproteção</i> | 18 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1. OBTENÇÃO DAS SEMENTES..... | 20 |
| 3.2. GRAU DE UMIDADE | 20 |
| 3.3. TRATAMENTOS | 21 |
| 3.4. TESTES..... | 22 |
| 3.4.1. <i>Germinação</i> | 22 |
| 3.4.2. <i>Emergência a Campo</i> | 23 |
| 3.4.3. <i>Variáveis Analisadas</i> | 23 |
| 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 24 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 4.1. GRAU DE UMIDADE..... | 24 |
| 4.2. TESTES DE GERMINAÇÃO E VIGOR | 26 |
| 5. CONCLUSÕES | 36 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 37 |

RESUMO

RESUMO BARROS, Carolina de Faria Cabral Paes Pereira; M. Sc.; UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO; março de 2018. **Criopreservação de sementes de espécies florestais do bioma Pantanal**. Orientador: Petterson Baptista da Luz. Professor Conselheiro: Severino de Paiva Sobrinho.

A biodiversidade que compõe a flora brasileira possui atualmente cerca de 45.800 espécies classificadas entre exóticas e nativas, distribuídas em seis biomas distintos. Entretanto, mesmo com tamanha riqueza e diversidade de espécies, a região pantaneira vem sofrendo com as mudanças abruptas nos padrões da composição e abundância das espécies, bem como nos processos ecológicos das comunidades. Para tanto, existe uma preocupação no meio científico, para o desenvolvimento de estudos e ações que visem a conservação dos recursos genéticos vegetais nos biomas brasileiros, como o estabelecimento de bancos de germoplasma e banco de sementes. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho utilizar técnicas da biotecnologia moderna como uma alternativa para o desenvolvimento de protocolos de conservação para sementes de espécies florestais que ocorrem de maneira natural no bioma Pantanal, em temperaturas ultrabaixas. O experimento foi distribuído em delineamento inteiramente casualizado, com 2.200 sementes para cada espécie, compondo 10 tratamentos, sendo a TP - Testemunha Padrão com dosagem 0 de crioprotetor e sem imersão em nitrogênio líquido (NL₂), a Testemunha (T.) com dosagem 0 de crioprotetor, com imersão em NL₂ e quatro variações de concentração de sacarose (0,29, 0,58, 0,87 e 1,16M) e DMSO (5, 10, 15 e 20%) em solução. As sementes foram mergulhadas e mantidas nas soluções crioprotetoras pelo período de 3 horas e posteriormente embaladas e armazenadas em NL₂ por 120 horas. Foram avaliados a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência, comprimentos parte aérea e raiz da plântula, massas secas da parte aérea e raiz e massa seca total. A partir dos resultados observados, pode-se afirmar que para todas as espécies estudadas o armazenamento das sementes em NL₂ sem o uso de soluções crioprotetoras é viável.

Palavras - chave: Armazenamento, germinação, vigor, crioprotetor

ABSTRACT

BARROS, Carolina de Faria Cabral Paes Pereira; M. Sc.; STATE UNIVERSITY OF MATO GROSSO; march 2018. **Cryopreservation of seeds of forest species of the Pantanal biome**. Adviser: Petterson Baptista da Luz. Teacher Counsellor: Severino de Paiva Sobrinho.

The biodiversity that makes up the Brazilian flora currently has about 45,800 species classified as exotic and native, distributed in six different biomes. However, even with such richness and diversity of species, the Pantanal region has been suffering from abrupt changes in composition and abundance patterns of the species, as well as in the ecological processes of the communities. Therefore, there is a concern in the scientific environment for the development of studies and actions granted the conservation of plant genetic resources in Brazilian biomes, such as the establishment of germplasm banks and seed banks. Thus, the objective of this work was to use modern biotechnology techniques as an alternative for the development of conservation protocols for seeds of forest species that occur naturally in the Pantanal biome in ultra-low temperatures. The experiment was distributed in a completely randomized design with 2,200 seeds for each species, comprising 10 treatments, the TP - Standard Witness with cryoprotectant dosage 0 and without immersion in liquid nitrogen (NL2), the Witness (T.) with dosage 0 (0.29, 0.58, 0.87 and 1.16M) and DMSO (5, 10, 15 and 20%) in solution. The seeds were immersed and maintained in the cryoprotective solutions for 3 hours and then packed and stored in NL2 for 120 hours. The percentage of germination, germination speed index, emergency percentage, emergence speed index, shoot length and seedling root length, dry shoot and root mass and total dry mass were evaluated. From the observed results, it can be affirmed that for all the studied species the storage of the seeds in NL2 without the use of cryoprotectant solutions is viable.

Key words: Storage, germination, vigor, cryoprotectant.

-

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade que compõe a flora brasileira possui atualmente cerca de 45.800 espécies classificadas entre exóticas e nativas, distribuídas nos biomas: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampas (Forzza, 2014). Localizado na Bacia do Alto Paraguai, o Pantanal estende-se no Brasil pelos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e é citado por Costa et al. (2009) como responsável pela conexão e transição entre as Florestas Tropicais Úmidas, Cerrados, Chacos Bolivianos e as Florestas Meridionais.

A região do Pantanal guarda riquezas naturais de valor inestimável, podendo ser encontrada ao longo da sua extensão territorial espécies de grande valor ecológico, como a aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allem.), o angico-branco (*Albizia niopoides* Spruce Burkart), o cambará (*Vochysia divergens* Pohl) e as piúvas (*Handroanthus* sp.). Contudo, com as expansões das fronteiras agrícola, pecuária e florestal, instalação de usinas hidrelétricas e minérios, a região pantaneira vem sofrendo com a fragmentação florestal, o empobrecimento do solo, a perda da diversidade biológica e recursos genéticos vegetais (RGV), entre outros fatores que geram situações de conflito na utilização dos seus recursos naturais, levando ao longo do tempo a mudanças abruptas nos padrões da composição e abundância das espécies, logo, nos processos ecológicos das comunidades (Leite e Moura, 2012).

Existe uma preocupação no meio científico para o desenvolvimento de estudos e ações que visem a conservação dos RGV nos biomas brasileiros, como o estabelecimento de bancos de germoplasma (BG), banco de sementes (BS) e coleções de campo (Costa, 2009).

Wetzel et al. (2003) afirmam que o armazenamento e conservação de sementes ou de qualquer que seja o RGV de interesse é uma forma de assegurar a diversidade genética possibilitando, posteriormente, destinar o material conservado para o intercâmbio de germoplasma para a pesquisa em programas de melhoramento genético, recuperação de áreas degradadas, reflorestamento ou mesmo plantios comerciais, garantindo a variabilidade genética vegetal e a perpetuação das espécies.

A semente pode ser classificada como a parte do RGV pela qual a planta sobrevive o máximo de tempo com o mínimo de atividade fisiológica (Wetzel et al., 2003), assim, quando se tem por objetivo conservar um RGV, por meio do

armazenamento de sementes deve-se atentar, sobretudo, nas características fisiológicas que podem afetar a longevidade da espécie de interesse, como quando são submetidas a baixos níveis de umidade e a temperaturas ultrabaixas.

Os métodos de conservação dentro (*in situ*) ou fora (*ex situ*) dos locais de origem ou ocorrência natural das espécies têm sido utilizados para conservar os RGV, entretanto, tais métodos apresentam certas especificidades podendo limitar o sucesso da conservação em um BAG (Bancos Ativos de Germoplasma), como em casos de coleção a campo ou *on farm*, e ameaçar a segurança dos RGV conservados nesses caminhos (Nick et al., 2010; Engelmann, 2011). Dentre as técnicas utilizadas para a conservação a criopreservação é considerada a mais adequada para a conservação de germoplasma vegetal *ex situ*, por permitir o armazenamento de materiais biológicos, em nitrogênio líquido (NL₂) a -196°C ou a nitrogênio (N) a vapor -150°C, por longos períodos de tempo, mantendo sua estabilidade genética e causando o mínimo de danos fisiológicos ao material, utilizando pouco espaço e exigindo mínima manutenção (Wetzel et al., 2003; Engelmann, 2011). Estudos realizados com estruturas inteiras ou parte do germoplasma de maçã (*Malus spp.*) (Santos, 2000), piúva roxa (*Handroanthus impetiginosus*) e mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) (Nogueira, 2010) apresentaram resultados positivos para o uso de técnicas da criopreservação não havendo anormalidades no desenvolvimento das plântulas.

Na criopreservação, é preciso preparar a estrutura do tecido vegetal a ser conservado, diminuindo o teor de água do material na tentativa de evitar a formação de cristais de gelo no interior das células. Para tanto, a aplicação de substâncias ou fármacos que minimizam os danos de origem química e/ou mecânica causadas pelo congelamento, torna-se imprescindível para muitas espécies (Gonzalez, 2004). As soluções mais utilizadas são à base de dimetilsulfoxido (DMSO), glicerol, etileno glicol, metanol, propileno glicol e sacarose (Santos e Salomão, 2010). Entretanto, os crioprotetores podem tornar-se tóxicos, levando as células vegetais à morte (Sakai, 1995).

Para Santos e Salomão (2010) faz-se necessário o estudo para o entendimento e adaptação dos protocolos utilizando técnicas da criopreservação, já que em determinados casos o armazenamento de sementes em BAGs, utilizando baixas temperaturas pode acarretar danos fisiológicos nas sementes, tornando-as inviáveis. Assim, objetivou-se com este trabalho utilizar técnicas da biotecnologia moderna como uma alternativa para o desenvolvimento de protocolos de conservação

para sementes de espécies florestais que ocorrem de maneira natural no bioma Pantanal, em temperaturas ultrabaixas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O bioma Pantanal

Localizado na Bacia do Alto Paraguai, o Pantanal é caracterizado por sua importância estratégica na administração dos recursos hídricos entre o Brasil, Bolívia e Paraguai, assumindo o papel de ser uma das maiores extensões com áreas alagáveis de pouca declividade da América Latina (Ribeiro et al., 2017) e a maior área úmida do mundo, sendo reconhecido como Patrimônio Nacional pela Constituição Brasileira de 1988, além de, abrigar sítios considerados de importância internacional pela Convenção de Áreas Úmidas – RAMSAR (Harris, 2005).

A hidrografia do Pantanal é considerada complexa por ser composta por vários rios e apresentar nascentes em biomas distintos, onde há a colonização de áreas com espécies de ocorrência do entorno, aonde os rios e a vegetação ribeirinha atuam como corredores ecológicos, induzindo a dispersão de material reprodutivo. De modo que o ciclo hidrológico e a dinâmica da hidrografia, com períodos de secas e de cheias, contribuem de maneira direta para a alta biodiversidade e funcionamento ecológico desse bioma (Harris et al., 2005).

A fauna e flora do Pantanal no território brasileiro são muito dependentes das regiões adjacentes, sobretudo, do Cerrado (Harris et al., 2005). Fonseca et al. (2004) afirmam que as diferentes províncias fitogeográficas do Pantanal são compostas por cerca de 70% de Cerrado, 21% de floresta Amazônica e 9% de Chaco. Dentre as espécies que ocupam o Pantanal formando fitofisionomias uniformes e densas, são citados os cambarazais (*Vochysia divergens* Pohl), os buritizais (*Mauritia vinifera* Mart.) e os piuvais (*Handroanthus* sp.) (Silva et al., 2000). Essa diversidade de espécies, ambientes e o nível de ameaças ambientais sofridas, o incluiu como uma das áreas de Reserva da Biosfera, declaradas pela UNESCO em 2000 (Harris et al., 2005).

A ocupação de áreas e exploração dos recursos naturais em território pantaneiro é comumente compreendida após a chegada dos bandeirantes no século

XVII, em busca de pedras e metais preciosos. E, o uso e a ocupação do solo do Pantanal e em áreas de transição continuaram e se expandiram com a pecuária extensiva, atividades mineradoras e, mais recentemente, a instalação de usinas hidrelétricas, contribuindo para a degradação do solo, sobretudo, erosão e compactação, contaminação de bacias com rejeitos de diferentes origens, além das queimadas e desmatamentos para composição de pastagens, monocultivos agrícolas e/ou florestais (Santos, 2012).

A conservação e a manutenção da flora e da fauna originais preocupam as autoridades brasileiras e a comunidade científica nacional e internacional (Odalía-Rímoli et al., 2000). Por trás da homogeneidade visual das paisagens criadas, esconde-se outro fator: a redução da base genética das populações e com ela o aumento da vulnerabilidade genética vegetal e animal.

A fim de reduzir os impactos da antropização, ações como a criação e implantação de planos de recuperação de áreas degradadas associados à ecologia da restauração, vêm sendo consideradas, bem como, a composição de BAGs para o armazenamento a longo prazo de diversos RGV. Buscando, dessa maneira, a conservação e a garantia da variabilidade genética dos recursos de interesse (Groom et al., 2006).

2.2. Características das espécies em estudo

2.2.1. Aroeira- *Myracrodruon urundeuva* Allem.

A *M. urundeuva*, com sinonímia *Astronium urundeuva* é popularmente conhecida como aroeira ou aroeira preta (Figura 1-A). É uma espécie arbórea, decídua e heliófila da família das Anacardiaceae (Lorenzi e Renzi, 2008). Ainda de acordo com os autores, a *M. urundeuva* ocorre naturalmente em quase todo o território brasileiro, com maior frequência de populações nas regiões próximas ao Oeste e Norte do país, em florestas estacionais semidecíduais com características de cerrado e cerradão. A classificação da *M. urundeuva* segundo o grupo ecológico, é a secundária tardia, mas de acordo com Kageyama et al. (1994) em áreas antropizadas exerce o papel de pioneira.

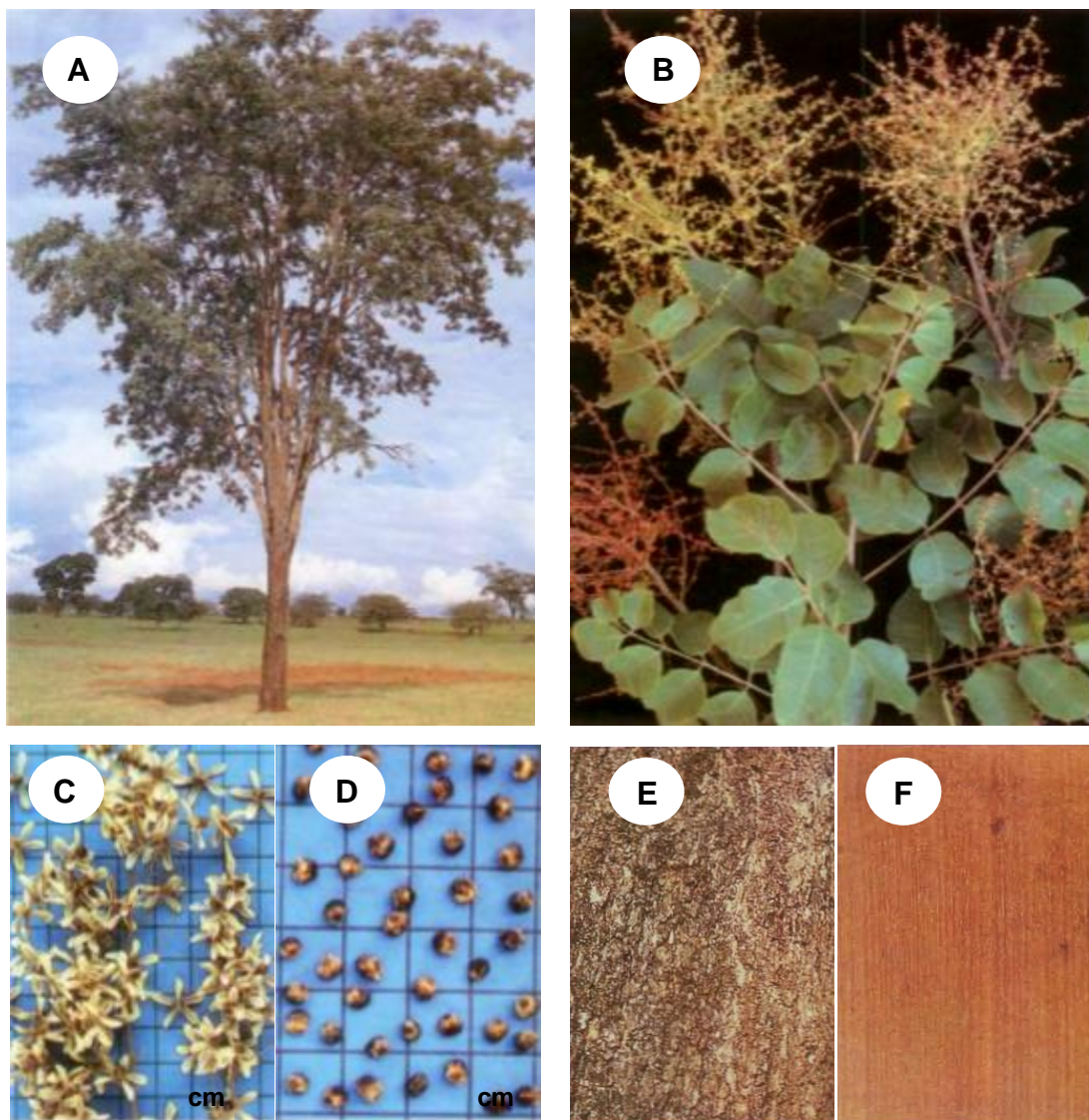


Figura 1 - A-F: A espécie *M. urundeuva*. Allem.: A- árvore na fase adulta; B- inflorescência com coloração castanho-avermelhada; C-Frutos em forma de drupa globular ou ovoide com cálice persistente; D- Sementes globosas dispersas pelo vento; e E-F- Casca externa castanho-escura, e casca interna avermelhada. Fonte: Lorenzi e Renzi (2008).

As características da madeira de *M. urundeuva* estão registradas no Instituto de Pesquisa Tecnológicas (IPT) de São Paulo, e estão inclusas no grupo das madeiras com durabilidade secular, (Figura 1-E e F). Canuto (2009), cita em seu trabalho que enquanto um centímetro quadrado de concreto é capaz de suportar uma carga equivalente a 250 kgf, a *M. urundeuva* pode tolerar cerca de 696 kgf. A *M. urundeuva* possui um alto valor econômico, pois, além de resistente, apresenta colocação que lhe agrega valor no setor de movelaria. Sua madeira serrada e/ou roliça pode ser utilizada para diversos fins, como: confecção de esteios, postes, mourões, móveis de

luxo e adornos, produção de energia, reflorestamento, apresentando também potencial para o paisagismo (MMA-Brasil, 2007). As possibilidades de uso da *M. urundeuva* contribuíram para que ela esteja, atualmente, na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção, categoria vulnerável.

Quanto a biologia reprodutiva, Andrade et al. (2000) identificam em seus trabalhos a *M. urundeuva*, como uma espécie dioica, apresentando alta sincronia no florescimento, entre os meses de julho a setembro e frutificação com maturação dos frutos de setembro a outubro. Os frutos, como mostrado na Figura 1-D, são formados por uma drupa globular ou ovoide com cálice persistente, considerado uma semente de frutos (Figueirôa et al., 2004). Como uma árvore de grande porte a *M. urundeuva* abriga uma série de organismos florais e faunísticos sob o seu dossel e é considerado uma espécie chave no ecossistema.

Suas sementes (Figura 1-C), são classificadas como ortodoxas, com forma globosa e superfície rugosa, são dispersas pelo vento, podendo ser desidratadas a níveis de 5 a 7% de umidade e conservadas, apresentando boa longevidade (Medeiros, 1996). Devido a tolerância a dessecação das sementes, o autor ainda cita a criopreservação como um método de conservação e armazenamento promissor para essa espécie, recomendando a desidratação prévia da semente a 6% de umidade. Contudo, não foram estabelecidos, ainda, padrões específicos e precisos para o armazenamento das sementes a longo prazo.

2.2.2. Canafístula- *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

A canafístula ou angico amarelo é classificada por Donadio e Demattê (2000) como uma espécie nativa heliófila, caducifólia, rústica, de crescimento rápido, pertencente à família Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae, (Figura 2-A). Pode ser encontrada com frequência em florestas estacionais semidecíduais dos Estados da Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso. Atingi alturas de até 40 metros e diâmetros de 120 centímetros na sua maturidade (Lorenzi e Renzi, 2008). Quanto a sua classificação nos grupos sucessionais, mesmo que considerada no contexto ecológico como secundária assume características de pioneira oportunista apresentando, geralmente, populações com poucos indivíduos, porém, de grande porte ocupando boa parte do dossel dominante em florestas primárias (Bertolini et al., 2015).

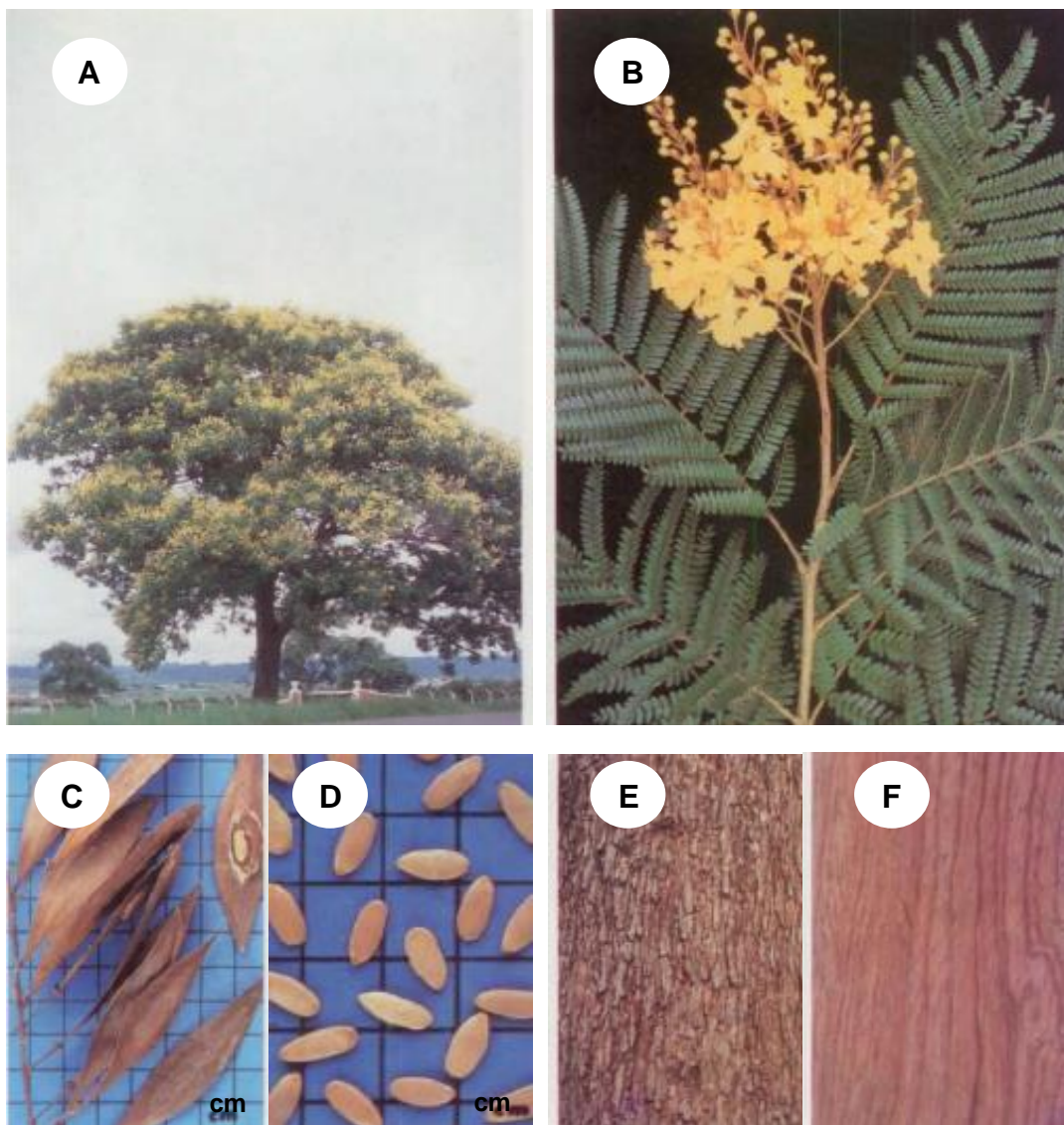


Figura 2 - A-F: A espécie *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert: A- árvore na fase adulta; B- inflorescência com coloração amarela; C-Frutos tipo vagem; D- Sementes glabras; e E-F- Casca externa róseo-clara, e casca interna róseo-castanha com veios marrom escuro. Fonte: Lorenzi e Renzi(2008).

A copa da *P. dubium*, é caracterizada como umbeliforme, com folhas que podem variar de semidecíduais para decíduas, alternas e compostas bipinadas (Figura 2-B). As inflorescências (Figura 2- B) possuem o formato de panículas terminais, racemosas, de cor amarela, castanho esverdeada clara ou alaranjada (Silva, 2007). O fruto da *P. dubium* (Figura 2- C) é um legume do tipo vagem, indeiscente com superfície glabra, apresenta coloração castanho-escuro, geralmente no fruto é encontrado de uma a duas sementes glabras (Figura 2- D) com coloração amarela clara (Lorenzi e Renzi, 2008).

A madeira da *P. dubium* (Figura 2- E e F) tem colocação róseo-clara com o cerne apresentando alternâncias irregulares de colorido róseo-acastanhado e de bege rosado-escuro, frequentemente com veios escuros irregulares. Além de possuir alta aplicabilidade nos diversos setores da indústria madeireira, a *P. dubium* apresenta elevados níveis de sobrevivência, crescimento e acumulação de biomassa quando comparada a outras espécies nativas, auxiliando com altos níveis de deposição de matéria orgânica sobre o solo, por conseguinte, na ciclagem de nutrientes para a área na qual está inserida (Moraes, 2003).

Quanto a topografia e ao revelo a *P. dubium* prefere regiões de clareiras e borda de populações florestais, apresenta tolerância para variações de luminosidade e temperatura e, devido à sua rusticidade e ao rápido crescimento é também utilizada para composição de reflorestamentos mistos, recuperação de áreas degradadas e paisagismo, contribuindo para o desenvolvimento de espécies de sombra (Lorenzi e Renzi, 2008; Bertolini et al., 2015).

Nas florestas nativas, Aronson et al. (2011), citam a propagação vegetativa, a chuva de sementes e o banco de sementes, como alternativas para garantir a capacidade de resiliência, conservação e a perpetuação dessa espécie.

2.2.3. Gonçalo Alves-*Astronium fraxinifolium* Schott.

O *A. fraxinifolium* (Figura 3-A), também conhecido como gonçalo-alves ou gonçaleiro é uma espécie arbórea da família das Anacardiaceae, classificada como pioneira, típica do Cerrado Central do Brasil. Contudo, não está restrita a esse bioma pois, apresenta ampla distribuição, abrangendo as regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e parte da região Sul do Brasil e a região Amazônica (Cardoso, 2015). De acordo com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, o *A. fraxinifolium* é considerado uma das espécies prioritárias para conservação dos recursos genéticos no Brasil (Leite, 2012).

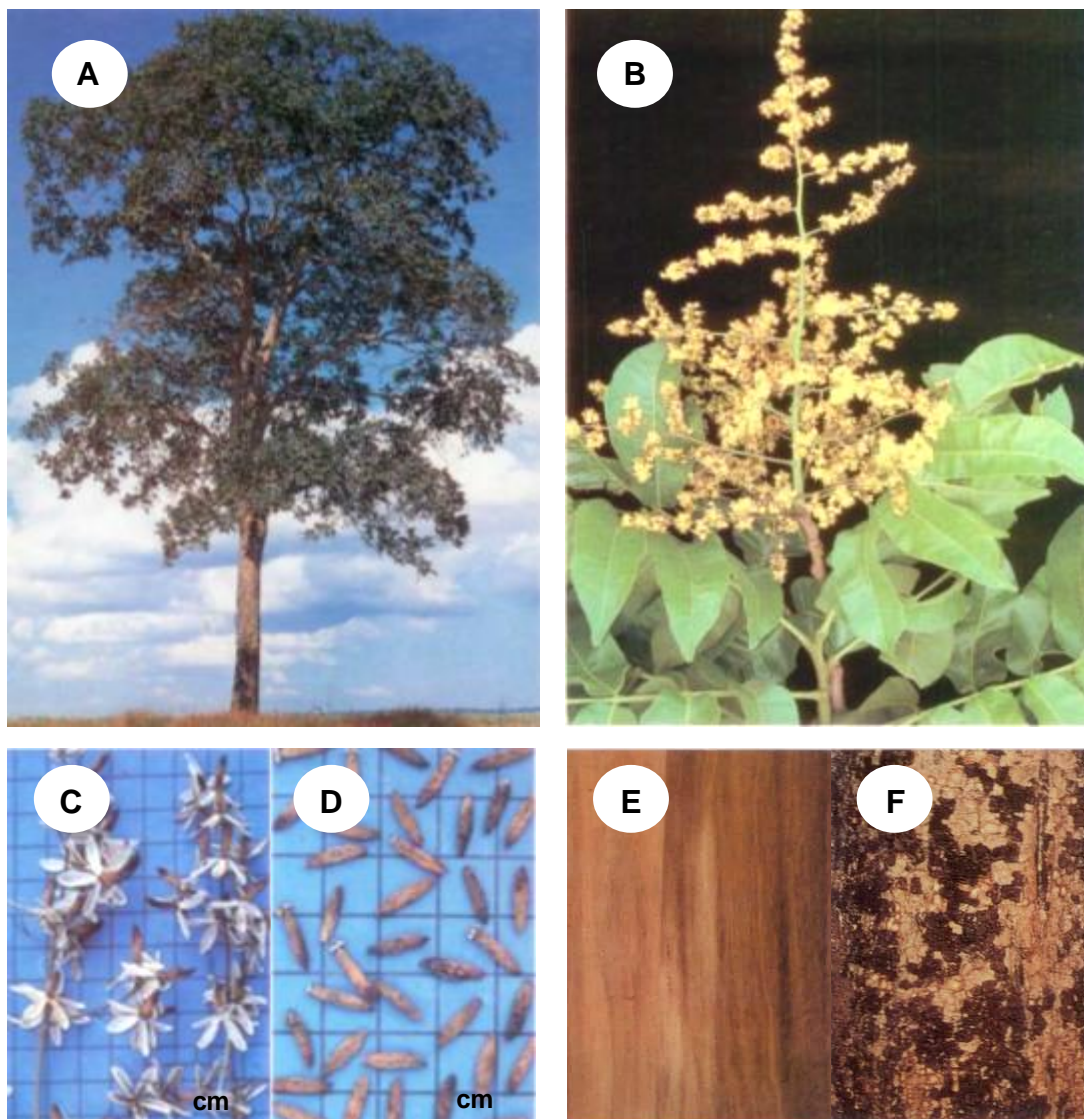


Figura 3 - A-F: A espécie *A. fraxinifolium* Schott.: A- árvore na fase adulta; B- inflorescência com coloração amarela; C-Frutos em forma de fuso; D- Sementes alongadas e pardo-amarelada dispersas pelo vento; e E-F- madeira de coloração bege-rosada, podendo variar para castanha-avermelhada com a presença de listras escuras. Fonte: Lorenzi e Renzi(2008).

O período de florescimento do *A. fraxinifolium* ocorre de junho a agosto no Cerrado e de junho a outubro na Amazônia (Leite, 2012). A inflorescência apresenta coloração amarela-pálida e o fruto é facilmente disperso pelo vento por apresentar alas (Lorenzi e Renzi, 2008), como mostra a Figura 3-B e C. Suas sementes (Figura 3-D) em condições adequadas de clima e tempo não apresentam dormência e são tolerantes a dessecação e a baixas temperaturas de armazenamento, assumindo as características de sementes ortodoxas (Braga et al., 2014).

A madeira do *A. fraxinifolium* (Figura 3-D e F), é caracterizada como compacta e resistente, utilizada na marcenaria até para fino acabamento, construção civil, naval e paisagismo (Feitosa et al., 2011). As cascas e as folhas são popularmente utilizadas

para tratamentos homeopáticos e possuem indicação terapêutica adstringência e ação anti-inflamatória. E de acordo com Cardoso et al. (2015), pesquisas voltadas para a produção de sementes, o *A. fraxinifolium*, tem colaborado para programas de conservação de RGV.

2.2.4. Ipê amarelo- *Handroanthus chrysotrichus*- (Cham.) Standl.

O *H. chrysotrichus* (Cham.) Standl. (Figura 4-A), pertence a família Bignoniaceae e é conhecido como ipê-amarelo ou ipê-tabaco. Caracteriza-se por ser uma espécie heliófila e seletiva xerófita, decídua, característica de cerrado em terrenos bem drenados (Lorenzi e Renzi,2008).

Lorenzi e Renzi (2008) e Leite et al. (2017), afirmam em seus trabalhos que a ocorrência natural do *H. chrysotrichus* abrange os estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, em áreas de Cerrado e nas Florestas Semidecíduais da Bacia do Paraná. Os autores ainda descrevem em seus trabalhos, o *H. chrysotrichus* como uma árvore de médio porte, atingindo de 4 a 10 metros de altura, apresentando folhas compostas digitadas (Figura 4-B) com cinco folíolos, pubescentes nas faces superior e inferior, medindo de 5-10 cm de comprimento.

As sementes do *H. chrysotrichus* são classificadas como cordiformes e oblongas (Figura 4-C e D), envoltas por uma membrana que apresenta pontas afiladas, lembrando asas, liberadas por um fruto no formato de vagem que se abre, favorecendo a dispersão das sementes pelo vento.

Sua madeira (Figura 4-E e F) é considerada como moderadamente pesada, resistente, difícil de serrar e de grande durabilidade (Lorenzi e Renzi, 2008; Lohmann, 2015). O *H. chrysotrichus* pode ser utilizado na construção civil para a confecção de assoalhos, batentes, escadas e na fabricação de instrumentos musicais, bolas de boliche, projetos de arborização urbana e na recuperação de áreas degradadas, quando em consórcio com outras espécies (Lorenzi e Renzi, 2008).

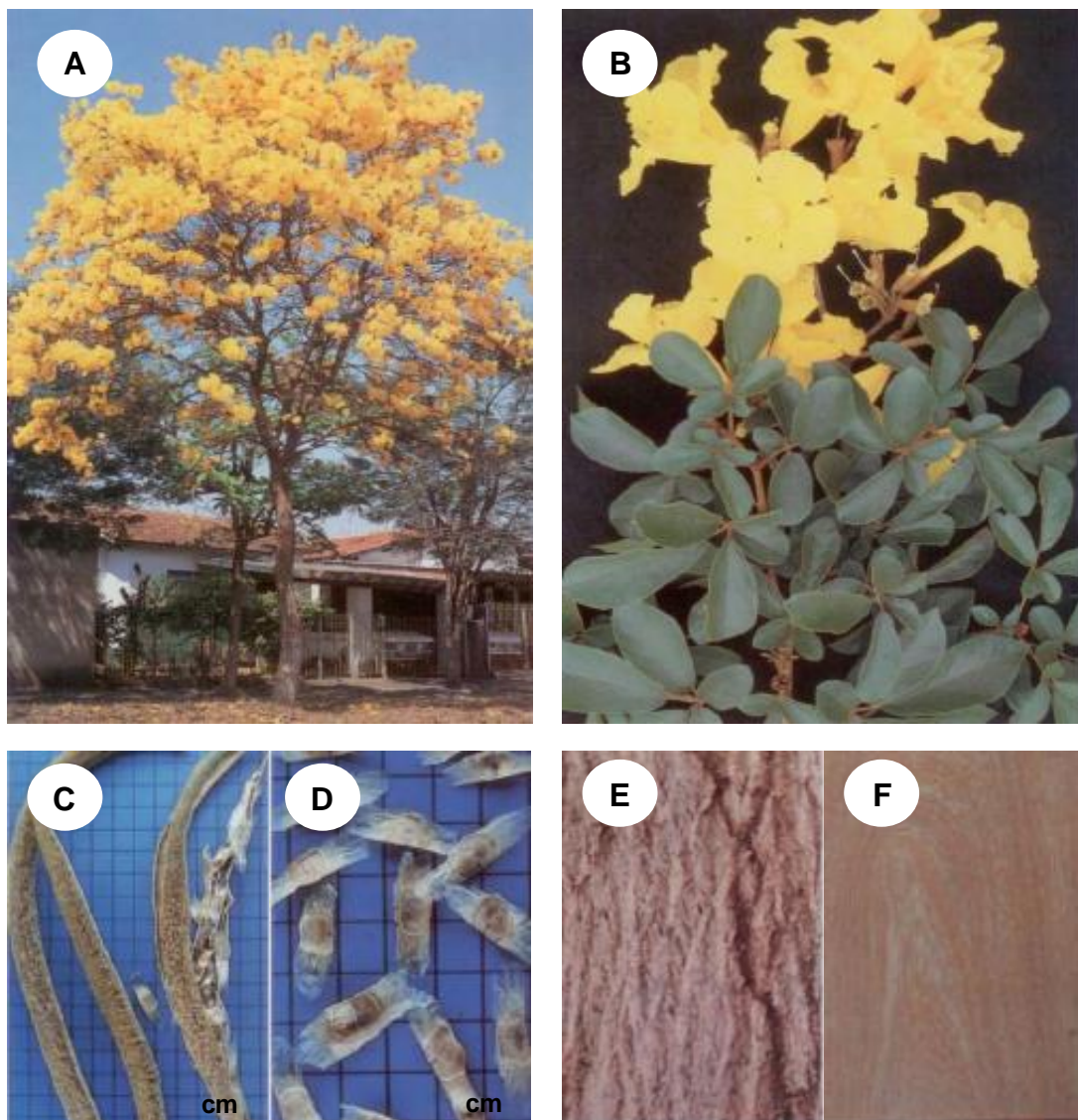


Figura 4 - A-F: A espécie *H. chrysotrichus* (Cham.) Standl.: A- árvore na fase adulta; B- inflorescência com coloração amarela; C-Frutos do tipo vagem; D- Sementes cordiformes a oblongas; e E-F- madeira de coloração amarelada, com a presença de listras mais claras. Fonte: Lorenzi e Renzi(2008).

2.2.5. Ipê roxo- *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos

O *H. impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, com sinonímia *Tabebuia impetiginosa*, é conhecido como ipê-roxo, ipê-rosa e piúva roxa e pertence à família Bignoniaceae (Figura 5- A). Essa espécie caracteriza-se por ser nativa do Brasil, ocorrendo em diversos biomas brasileiros, sobretudo, nos estados de Mato Grosso e Goiás (Lorenzi e Renzi, 2008; Lohman, 2015). Apresenta porte arbóreo, alcançando até 30 metros de altura e está classificada como uma planta heliófila. Contudo, quando jovem é tolerante a variações de temperatura, luminosidade, umidade e a sombra (Fernandes, 2015).



Figura 5 - A-F: A espécie *H. impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos: A- árvore na fase adulta; B- inflorescência com coloração variando do rosa ao roxo; C-Frutos do tipo vagem; D- Sementes cordiformes a oblongas; e E-F- madeira de coloração bege-rosada, podendo variar para castanha-avermelhada, com a presença de listras escuras. Fonte: Lorenzi e Renzi(2008).

As inflorescências do *H. impetiginosus* (Figura 5-B) apresentam colocação roxa e odor suave (Fernandes, 2015), suas flores atraem vários polinizadores pela produção de néctar. As folhas são compostas e com ausência de pelos, o fruto é seco, deiscente e com sementes com coloração marrom clara, conforme demonstrado na Figura 5-C, que possuem uma cobertura membranácea alongadas, extremidades remetendo a estrutura de asas, como mostrado na Figura 5-D, facilitando a dispersão anemocoria (Lorenzi e Renzi, 2008).

De acordo com Maia-Silva et al. (2012), o *H. impetiginosus* apresenta um alto valor comercial por apresentar características físicas e estéticas na fase adulta, como:

madeira de alta densidade, resistente a ataque de parasitas e alta durabilidade, que possibilitam a diversidade do seu uso. De modo que é bastante comum o uso dessa espécie em projetos de paisagismo urbano e reflorestamento.

A importância e valor medicinal do *H. impetiginosus* é citada por Wagner e Seitz (1998), com o uso das diferentes partes da planta por povos indígenas e, posteriormente, pela população de maneira empírica. A planta é utilizada para o tratamento de várias doenças com o uso de chás e misturas que tratam infecções estomacais, fungos, bactérias, doenças como diabetes e sífilis (Dong-Ju et al., 2006). Atualmente, as propriedades e possíveis usos dos compostos e substâncias presentes na espécie vêm sendo comprovada por estudos moleculares (Vasconcelos et al., 2014).

2.3. Conservação de Recursos Genéticos Vegetais

Os avanços do melhoramento genético vegetal estão intrinsecamente ligados a exploração dos RGV disponíveis nos ecossistemas naturais associados à pesquisa, de modo que, a conservação de germoplasma e da variabilidade genética para os programas de melhoramento tornam-se uma necessidade no desenvolvimento e no aprimoramento de produtos da agricultura, pecuária e setor florestal (Vieira, 2006).

2.4. Conservação de germoplasma

O Conselho Internacional de Recursos Filogenéticos (1991), define o termo germoplasma como o material que constitui a base física de uma herança biológica, podendo ser transmitida de uma geração para outra por meio de células reprodutivas. É, a partir da combinação de genes que surge a diversidade genética, usada como base do melhoramento de plantas. De acordo com Vieira (2006), a utilização do germoplasma nos programas de melhoramento genético ocorre, geralmente, por meio do uso do material vindo das coleções de germoplasma, mantidas em várias instituições, que assumem a responsabilidade de garantir variabilidade genética. Seja pela iniciativa de coletar periodicamente os RGV e/ou por favorecer o intercâmbio, multiplicando e compartilhando os materiais armazenados.

O armazenamento dos RGV está diretamente relacionado à manutenção dos BAGs, termo conceituado por Borém (1998) como um acervo repositório do material genético que representa a variabilidade genética, parcial ou total, de uma espécie. Um

banco de germoplasma tem como prioridade evitar a erosão genética das espécies de interesse e disponibilizar o material armazenado.

No que se refere a diversidade genética vegetal, os biomas brasileiros apresentam possibilidades de uso que motivaram o estabelecimento dos centros de conservação de germoplasma para armazenar e conservar variedades autóctones, variedades modernas, crioulas e parentes silvestres de espécies de interesse atual ou potencial (Santos e Salomão, 2010).

De acordo com Nick et al. (2010) e Kami (2012), os RGV podem ser armazenados e conservados através das mais diversas partes da planta (pólen, sementes, ramo, bulbo, em cultura de tecidos ou banco de genes) ocorrendo *in situ* por meio da manutenção e recuperação das espécies em seus meios naturais e *ex situ* realizada fora de seus habitats ou locais de ocorrência natural, como em coleções.

Tradicionalmente, os RGV de grande parte das espécies vêm sendo conservados na forma de coleções de campo, sabe-se, porém, que a conservação em campo apresenta desvantagens que limitam e ameaçam a segurança dos RGV conservados desta forma (Engelmann, 2011). Algumas espécies são mantidas *in vitro*, mediante técnicas de cultura de tecidos e, mais recentemente, trabalhos envolvendo a criopreservação de estruturas inteiras como sementes têm sido aplicados com o objetivo de reduzir os custos e perdas comuns aos BAGs (Engelmann, 2011).

2.4.1. Criopreservação

A criopreservação é empregada como uma alternativa na conservação dos RGV e é compreendida como uma técnica para o armazenamento de um material biológico em temperaturas ultrabaixas, -196°C em NL_2 ou -150°C em N a vapor, prezando pela viabilidade do material de interesse após o processo de descongelamento (Santos e Salomão, 2010).

Dentre as principais vantagens da criopreservação estão os baixos custos e espaço mínimo utilizado para o armazenamento, redução de trabalho para a manutenção quando comparada com outras técnicas de armazenamento e, a possibilidade de conservar o germoplasma por longos períodos de tempo (Engelmann, 2011). Os autores ainda afirmam que a conservação é garantida em decorrência dos processos metabólicos serem diminuídos quase completamente. Além de durante o armazenamento não ocorrer o risco de contaminação por fungos ou bactérias.

Santos (2001) e Carvalho (2010) afirmam que a criobiologia alcançou progresso com o desenvolvimento de protocolos de criopreservação para um número grande de espécies e variedades de cereais e gramíneas, plantas ornamentais, frutíferas tropicais e temperadas, leguminosas e oleaginosas, estimulantes, medicinais e aromáticas, entre outras. Entretanto, no armazenamento em temperaturas ultrabaixas de estruturas como as sementes, a massa de água torna-se um fator crítico para o sucesso da criopreservação (Goldfarb et al., 2010).

Independente dos protocolos, estabelecidos ou propostos, durante a criopreservação devem ser seguidas as etapas do pré-tratamento, resfriamento, armazenamento, descongelamento e regeneração do germoplasma. Considera-se pré-tratamento uma fase preparatória, no qual se fornece à célula vegetal condições de tolerância ao congelamento e descongelamento (Carvalho e Vidal, 2003), onde dependendo da estrutura e comportamento do germoplasma a ser armazenado, pode-se adicionar compostos com atividade osmótica, ou outros aditivos tanto ao um meio nutritivo (Withers e Williams, 1998), quanto aplicar diretamente no material a ser criopreservado, por meio do contato com as soluções denominadas de crioprotetoras.

O congelamento ou resfriamento das amostras após o processo de desidratação é feito com o armazenamento em freezer ou qualquer que seja o equipamento que permita a diminuição gradativa da temperatura, ou ainda, com imersão direta em nitrogênio líquido (NL₂), a temperaturas próximas de -196°C ou em nitrogênio a vapor, com temperaturas que giram em torno dos -150°C. E nessas condições o material é armazenado, pois, o metabolismo celular é eficientemente paralisado e o material pode ser conservado em estado de suspensão metabólica (Santos e Salomão, 2010).

A etapa referente ao descongelamento do material é compreendida como um ponto delicado e de extremo cuidado. Uma vez que, há a possibilidade da formação de cristais de gelo no interior das células quando o material armazenado fica exposto no ambiente. Karlsson (2001), afirma em seus estudos que a desvitrificação quando realizada inadequadamente causa injúrias irreversíveis ao RGV. Para que se obtenha sucesso nessa etapa, os estudos mais recentes mostram o descongelamento rápido como uma alternativa viável. De acordo com Engelmann (2011), o descongelamento rápido não permite a formação de cristais de gelo, justamente, porque o material não fica muito tempo exposto no ambiente e, por conseguinte, há a possibilidade de sucesso na criopreservação.

Quando um protocolo de criopreservação é proposto leva-se em consideração as especificidades de cada gênero, família e espécies, pois, não é possível a proposição de um protocolo comum a todas as espécies. Não é comum que todos os materiais armazenados em seu estado natural permaneçam viáveis quando expostos à temperaturas ultrabaixas (Valois et al., 2001), o que sugere estudos para verificar quais as técnicas adequadas para o armazenamento dos RGV respeitando as suas características.

2.4.2. Métodos de Criopreservação-Clássico e Contemporâneo

Nos primeiros protocolos de criopreservação desenvolvidos para RGV utiliza-se o congelamento em duas fases: a primeira, em que o congelamento ocorre lentamente, sendo a temperatura reduzida a uma velocidade definida (1 a 10°C/min) para valores próximos de -40°C com o auxílio de um congelador programável. Já na segunda, em que o congelamento é rápido, por meio da imersão direta do material em NL₂ ou a vapor (Santos e Salomão, 2010). O material a ser submetido a temperaturas ultrabaixas, quando considerado necessário é desidratado para que se retire o excesso de água e se obtenha o grau de umidade adequado para o seu armazenamento.

Santos e Salomão (2010), afirmam que no método clássico, a parede celular e a membrana plasmática agem como barreiras para a formação dos cristais de gelo que ocorrem nos espaços intracelulares, evitando o congelamento do citoplasma e, que os eventos físicos e as injúrias mecânicas causadas na célula podem ser ocasionadas, sobretudo, quando o seu resfriamento ocorre muito rapidamente ou quando materiais apresentam valores do grau de umidade abaixo do recomendado para a espécie, pois as células podem sofrer com a exposição aos efeitos nocivos da concentração elevada dos eletrólitos celulares. Assim, o grau de umidade, velocidade de congelamento e a temperatura de précongelamento assumem um papel crítico na preservação da viabilidade do material a ser conservado através do método clássico.

Os métodos e protocolos desenvolvidos mais recentemente são baseados na conservação do germoplasma por meio da formação do estado vítreo das células do citoplasma, que ocorre através da desidratação dos tecidos até o ponto que não exista água livre para a formação de cristais de gelo no processo do congelamento (Carvalho e Otoni, 2010). Com isto, a solução presente nas células se torna altamente concentrada e viscosa, sendo possível sua vitrificação (Sakai, 2000), e conferindo

propriedades mecânicas que podem ser comparadas a um sólido, mesmo que não haja a formação de uma estrutura cristalina.

A vitrificação diminui a difusão dos produtos presentes na célula, levando a um estado de redução dos processos metabólicos e resultando na prevenção de reações químicas dependentes do processo de difusão (Koster, 1991). Devido a estas características no estado vítreo, a deterioração de sistemas biológicos também é consideravelmente suprimida assegurando, dessa maneira, a estabilidade e conservação do germoplasma durante o período da criopreservação.

O processo de desidratação das células para a vitrificação leva em consideração a evaporação da água e/ou o tratamento do germoplasma com crioprotetores (Santos, 2000). A desidratação, no entanto, é considerada uma fase delicada, uma vez que, a água se retirada em excesso, pode causar danos irreversíveis às membranas e proteínas, levando as células a morte. Costa (2009) relatam em seus estudos que na fase da desidratação as proteínas e membranas intracelulares compensam a perda da água, ligando-se a outras moléculas e, essas interações podem ocasionar mudanças irreversíveis a estrutura proteica, perda da atividade de enzimas fundamentais para manter as atividades celulares.

As técnicas de criopreservação envolvem as etapas do preparo do material, congelamento e descongelamento, a fim de prevenir as injúrias decorrentes dos processos de desidratação, congelamento e descongelamento (Towill, 2002). Nessas fases, a rapidez nos processos de congelamento e descongelamento é fundamental para assegurar o sucesso da técnica.

Uma das grandes vantagens dos protocolos modernos da criopreservação são que os tecidos vitrificados podem ser congelados pelo mergulho direto em NL_2 , sem a necessidade de usar congeladores programáveis para o resfriamento. Dessa maneira, novos protocolos surgiram a partir do método de vitrificação, como o encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação e vitrificação em gotas (Carvalho e Otoni, 2010).

As técnicas de descongelamento de um germoplasma criopreservado por vitrificação são discutidas por Bajaj (1995), onde no descongelamento lento o material é exposto à temperatura ambiente até que esteja em equilíbrio com a temperatura do local, como já citado no item anterior. E o descongelamento rápido utilizando-se um banho-maria com temperaturas variando entre 37°-40°C. O método de

descongelamento utilizado leva em consideração o tipo de material que está sendo armazenado.

2.4.3. Crioproteção

A crioproteção é aplicada a uma grande variedade de tecidos vegetais, quando congelados pelo método de vitrificação e, baseia-se na aplicação de uma ou mais substâncias ao RGV a ser conservado em baixas temperaturas com o intuito de fornecer às células tolerância para as mudanças físicas e químicas relacionadas aos processos de congelamento e descongelamento, diminuindo, desse modo, o ponto de congelamento e a formação de cristais de gelo intracelular (Carvalho e Otoni, 2010; Santos e Salomão 2010).

Os crioprotetores com características fundamentais devem apresentar baixa toxicidade nas células e alta solubilidade em água pois, a exposição do germoplasma à solução de vitrificação muitas vezes leva a efeitos prejudiciais (Gonzalez- Arnão et al., 2008). Como exemplo de substâncias utilizadas no tratamento de germoplasma, podem ser citados: o dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, metanol, glicerol, propileno glicol e alguns açúcares como sacarose, trealose e glucose.

Veiga et al. (2013) ressaltaram que poucos tecidos vegetais são capazes de sobreviver em temperaturas ultrabaixas sem a proteção proporcionada por tratamentos. Quando se trata de espécies tropicais o cuidado no armazenamento deve ser redobrado, pois, estas ficam mais sensíveis quando expostas à baixas temperaturas (Engelmann, 2012).

Os crioprotetores são separados em duas classes distintas: os intracelulares, ou seja, que ultrapassam a parede celular e os extracelulares ou impermeáveis. De acordo com Felizardo et al. (2007), os crioprotetores intracelulares englobam um grupo de substâncias químicas que retiram a água livre da célula durante o processo de congelamento; já os crioprotetores extracelulares como a sacarose, manitol e trealose auxiliam no recobrimento da superfície celular e estabilizam a membrana realizando o papel de agentes osmóticos externos, ajudando a minimizar e reparar os possíveis danos celulares causados no congelamento e descongelamento.

Espécies cuja as sementes toleram a dessecação, possuem baixa longevidade ou se encontram ameaçadas de extinção e estão entre aquelas que interessam a aplicação das técnicas da criopreservação (Engelmann, 2011). Entretanto, independente do protocolo adotado, é necessário ter o conhecimento

prévio sobre o comportamento da semente, quanto a capacidade de estar viável após a desidratação e/ou congelamento.

Carvalho (2006) distingue em seus trabalhos o comportamento das sementes em três grupos no que se refere à tolerância à dessecação: no primeiro grupo se encaixam sementes que continuam viáveis com baixo teor de água (5-7%), chamadas de resistentes (ortodoxas); no segundo grupo estão as intermediárias, ou seja, aquelas sobrevivem com a perda moderada de água, em torno de 12-15%. E, por fim, existem as sementes sensíveis (recalcitrantes), que quando desidratadas a níveis abaixo dos 15 até 50% dependendo da espécie, ficam inviáveis. Ainda segundo o autor, as sementes ortodoxas são mais tolerantes a redução do grau de umidade para posterior imersão direta em NL_2 , dispensando o congelamento lento das mesmas.

Técnicas de armazenamento em temperaturas ultrabaixas com sementes e embriões isolados são empregadas para muitas espécies de sementes recalcitrantes, visando a sua conservação em bancos de germoplasma (Marcos Filho, 2005), garantindo, assim, a redução da atividade metabólica, contaminação e mudanças na expressão genética dos acessos originais. De toda forma, em função da dificuldade do armazenamento de sementes recalcitrantes a longo prazo, estratégias de conservação *in situ* dessas espécies devem ser levadas em consideração como forma de garantir a preservação e conservação de sua diversidade genética.

De acordo com Goldfarb et al. (2010), a conservação de sementes é a forma mais fácil e eficiente para a conservação *ex situ*, pois, garante a variabilidade genética. Em geral, ocupam pouco espaço e o processo de coleta e transporte do germoplasma é menos trabalhoso. Além disso, o tamanho das sementes pode favorecer um congelamento mais eficiente assumindo, dessa maneira, a ideia de que a desidratação e o congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores (Carvalho e Vidal, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi desenvolvido no Laboratório de Sementes e Plantas Ornamentais e Casa de Vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade do Estado de Mato Grosso-MT, situada no município de Cáceres-MT.

3.1. Obtenção das sementes

Foram adquiridas sementes de *M. urundeuva*, *P. dubium*, *A. fraxinifolium* e *H. impetiginosus* por meio da solicitação dos lotes correspondentes às espécies de interesse, armazenados e comercializados pela empresa Sementes Caiçara, localizada em Brejo Alegre - São Paulo. Já as sementes de *H. chrysotrichus* por meio de coletas em campo, na região de Cáceres-MT. Após a aquisição, as sementes foram beneficiadas, a fim de, selecionar as unidades livres de imperfeições e danos que pudessem causar a inviabilidade dos lotes e, posteriormente, os lotes correspondentes a cada espécie foram acondicionados em envelopes de alumínio e mantidos em câmara fria ($7^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) até que fosse dado início a aplicação dos tratamentos.

3.2. Grau de umidade

O grau de umidade das sementes foi determinado pelo método de estufa de circulação de ar a $105^{\circ}\text{C} (\pm 3^{\circ}\text{C})$, indicado para espécies de sementes inteiras, onde foram retiradas de cada lote duas amostras contendo 25 sementes cada. Respeitando, desse modo, as orientações da Regra para Análise de Sementes (Brasil, 2009), onde o grau de umidade foi calculado pela expressão matemática:

$$\text{Grau de Umidade (U\%)} = \frac{100 \times (P_i - p_f)}{P_i - t} \times 100$$

Onde,

P_i = peso inicial, peso do recipiente + o peso da semente úmida;

p_f = peso final, peso do recipiente + o peso da semente seca;

t = tara, peso do recipiente

3.3. Tratamentos

Os tratamentos foram distribuídos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 2200 sementes para cada espécie, conforme o fluxograma apresentado na Figura 6, sendo: TP - Testemunha Padrão, dosagem 0 de crioprotetor e sem imersão em NL₂; Testemunha (T.) - dosagem 0 de crioprotetor, com imersão em NL₂; T1 - sacarose 0,29M em solução; T2 - sacarose 0,58M em solução; T3 - sacarose 0,87M; T4 - sacarose 1,16M em solução; T5 – DMSO 5% em solução; T6 - DMSO 10% em solução; T7 - DMSO 15% em solução; e T8 - DMSO 20% em solução. As sementes foram mergulhadas e mantidas nas soluções crioprotetoras por 3 horas em temperatura controlada de 25°C e, em seguida retiradas e acomodadas sobre papel germitest em bancada para secagem ao ar livre por 12 horas.

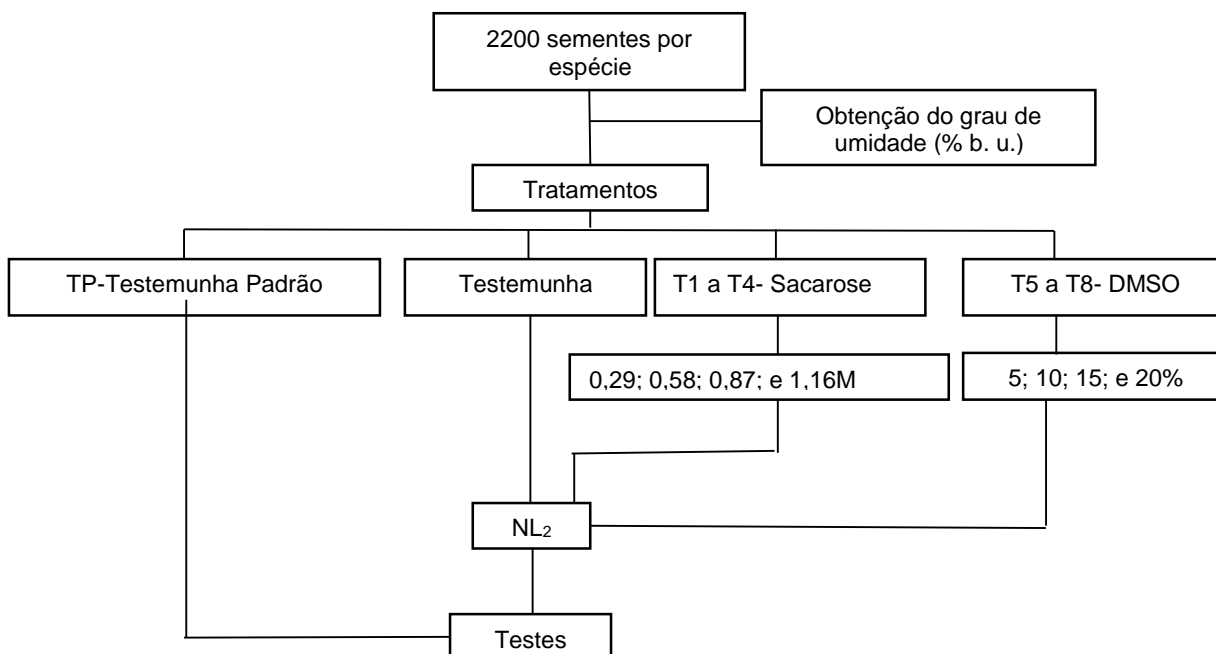


Figura 6 - Fluxograma representando as etapas dos tratamentos até a aplicação dos testes para as sementes de *M. urundeuva*, *P. dubium*, *A. fraxinifolium*, *H. chrysotrichus* e *H. impetiginosus*.

O processo de congelamento ocorreu pelo método de vitrificação, onde as sementes foram acondicionadas em embalagens herméticas no formato de envelope, compostas por três camadas (polietileno, alumínio e polietileno), identificadas por tratamento, seladas e imediatamente armazenadas em NL₂ pelo período de 120 horas.

Para o descongelamento, as sementes ainda embaladas, foram mergulhadas em banho-maria a 37°C durante 05 minutos e, posteriormente, depositadas sobre a bancada para que ocorresse o equilíbrio com a temperatura do ambiente. O grau de

umidade de cada tratamento foi verificado após a criopreservação por meio de estufa de circulação de ar e dessecador com sílica em gel, seguindo as recomendações de Medeiros (2003) para sementes ortodoxas, com 5-7% b.u.

3.4. Testes

A distribuição das sementes para os testes consistiu em 4 repetições de 25 sementes para cada tratamento, permitindo um espaçamento adequado entre as sementes. A duração dos testes não seguiu as recomendações da Regra de Análises de Sementes Florestais (Brasil, 2013), pois o comportamento dos lotes não esteve de total acordo com as orientações para primeira e última contagem de germinação e emergência a campo.

3.4.1. Germinação

No teste de germinação foram utilizadas incubadoras do tipo BOD programadas com temperatura constante de 25°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas sob lâmpadas fluorescentes. As sementes foram acomodadas em caixas de acrílico transparente com tampa, medindo 11x11x4 cm, comumente conhecidas como “Gerbox”, desinfestadas com hipoclorito a 2% (Fernandez, 2010). O substrato utilizado foi o mata-borrão, umedecido com 2,5 vezes o seu peso com água destilada (Brasil, 2009).

A contagem de germinação foi iniciada no segundo dia após a montagem do teste considerando, dessa maneira, germinadas as sementes que apresentassem a formação e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições ambientais favoráveis. A última contagem variou para cada espécie, sendo adotado como critério para o encerramento do teste uma sequência de cinco dias sem germinação.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi obtido através da fórmula descrita por Maguire (1962):

$$IVG = \left(\frac{E1}{N1}\right) + \left(\frac{E2}{N2}\right) + \dots + \left(\frac{En}{Nn}\right)$$

Onde,

IVG = índice de velocidade de germinação;

E_{1-n} = número de plântulas normais germinadas a cada dia; e

N_{1-n} = número de dias decorridos da sementeira da primeira até a última contagem.

3.4.2. Emergência a Campo

No teste de emergência a campo as sementes correspondentes a cada tratamento foram colocadas em bandejas, medindo 30x20x07 cm, preenchidas com o substrato comercial Vivatto Plus, composto por moimha de carvão vegetal, casca de pinus e turfa, apresentando de acordo com o fabricante um pH de 5,6. As bandejas identificadas por tratamento e repetição foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas três vezes ao dia.

A contagem do número de sementes emergidas teve início no segundo dia após a sementeira, sendo realizada a cada 48 horas por 30 dias, adotando como critérios de emergência o rompimento da barreira solo (substrato) e a formação de plantas normais (Brasil, 2009). O índice de velocidade de emergência (IVE), foi obtido através da fórmula descrita por Maguire (1962):

$$IVE = \left(\frac{E1}{N1}\right) + \left(\frac{E2}{N2}\right) + \dots + \left(\frac{En}{Nn}\right)$$

Onde,

IVE = índice de velocidade de emergência;

E_{1-n} = número de plântulas normais germinadas a cada dia; e

N_{1-n} = número de dias decorridos da sementeira da primeira até a última contagem

3.4.3. Variáveis Analisadas

A partir dos valores diários de germinação foi possível determinar a porcentagem de germinação (G%), velocidade de germinação (IVG) (Maguire, 1962), porcentagem de emergência (E%), índice de velocidade de emergência (IVE); comprimentos parte da aérea (CPA) e raiz da planta (CR/cm), massas secas da parte aérea (MSPA/g) e raiz (MSR/g); massa seca total (MST/g). Para a obtenção da massa seca foram seguidas as recomendações de Silva (2007), utilizando plantas normais já mensuradas, colocando-as em sacos de papel Kraft e as levando para secar em estufa com circulação de ar forçado e aquecida ($65^{\circ}\text{C} \pm 3$) durante 72h e, posteriormente, resfriadas em dessecador com sílica gel e pesadas em balança analítica.

3.5. Análise Estatística

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (teste F) e ao teste de normalidade de Shapiro – Wilk. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, com o intervalo de 5% de significância, através do programa computacional R.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Grau de Umidade

Os valores para o grau de umidade (b.u.%) encontrados nas sementes de espécies florestais do Pantanal estudadas variaram de 6,1 - 7,5%, para os tratamentos em período anterior a criopreservação (a.c.) e, de 6,1 - 7,6% para os tratamentos submetidos a criopreservação (d.c.), conforme demonstrado nos gráficos de A-E (Figura 7).

As maiores médias para o teor de água foram encontradas nas sementes de *H. chrysotrichus*, com o grau de umidade de 7,6% b.u. (d.c.), corroborando com Silva et al. (2011), que trabalhando com sementes de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose, obteve médias próximas a 8% b.u., e Stegani et al (2017), trabalhando com sementes de *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moor tratadas com soluções protetoras e criopreservadas, observaram que os teores de água das sementes que apresentaram as maiores médias de germinação estiveram em torno de 7,5% b.u.

De acordo com José et al. (2009), o teor de água das sementes destinadas à conservação por longos períodos de tempo pode estar entre 3 - 7% b.u., sem interferir na qualidade fisiológica do material. Tal afirmativa pode ser explicada pelo fato das sementes armazenadas por muitos anos, geralmente, possuem tolerância a dessecação podendo manter o vigor com baixos teores de água e diminuição da atividade metabólica. Fowler (1998), afirma que a redução no teor de água das sementes causa diminuição da sua atividade metabólica, acarretando, o prolongamento da viabilidade delas.

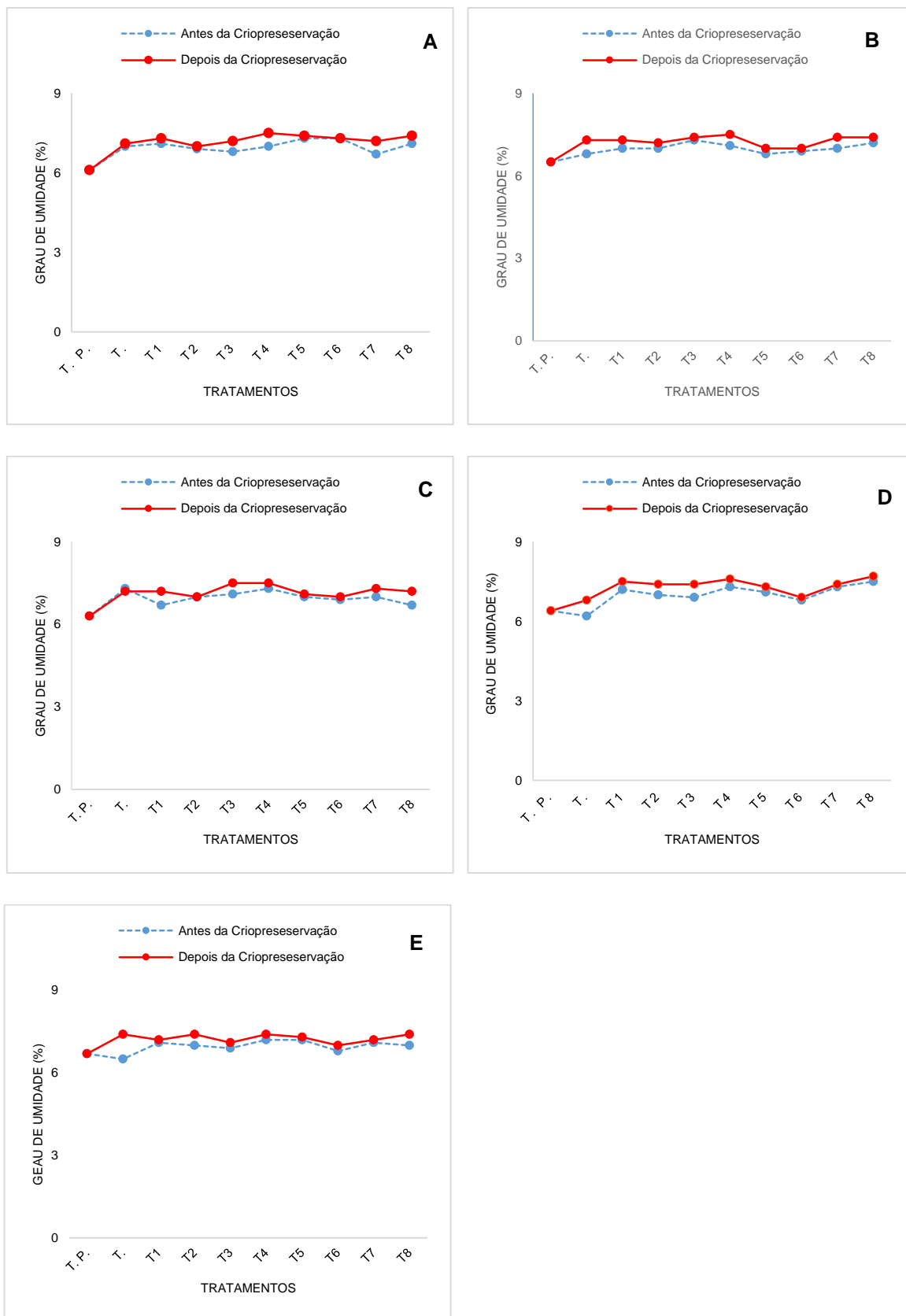


Figura 7 - A-E: A- *M. urundeuva*, B- *P. dubium*, C- *A. fraxinifolium*, D- *H. chrysotrichus*, E- *H. impetiginosus*.

A formação de sementes ortodoxas pode ser dividida entre as fases de histodiferenciação, maturação e secagem (Bewley e Black, 1994). E, é no processo de maturação que as sementes ortodoxas adquirem a tolerância à dessecação, que por sua vez, é mantida após a dispersão.

Com um conteúdo de água menor no interior da semente, esta pode entrar em estado de quiescência, consumindo uma quantidade de reservas de nutrientes muito pequena quando comparada a uma semente com grau de umidade mais elevada, possibilitando o seu armazenamento a longo prazo e de acordo com Tresena et al. (2010), o armazenamento pode ser feito em temperaturas ultrabaixas como em NL₂, sem grandes perdas no seu vigor.

Galdino (2009), afirma que a aquisição de sementes com alta qualidade fisiológica, que apresentem uma pronta germinação e rápido estabelecimento de suas plântulas, assim como a manutenção deste vigor por meio do armazenamento são metas prioritárias dentro do processo de produção de sementes.

Segundo Barrôco et al. (2005), durante o processo de germinação a água é tida como um fator primordial, pois, durante essa etapa ocorrem processos bioquímicos que têm início a partir da embebição da semente. No caso dessa pesquisa, teores diferentes dos recomendados para as sementes estudadas poderiam influenciar nos tratamentos com ou sem o uso das soluções crioprotetoras e imersão em NL₂. Entretanto, a partir dos processos de secagem em estufa, bancada e dessecador, foi possível controlar a umidade das sementes e mantê-las dentro dos teores esperados para aquelas com o comportamento ortodoxo.

4.2. Testes de Germinação e Vigor

De acordo com o teste de Shapiro - Wilk os dados referentes as variáveis analisadas mostraram a normalidade para os resíduos. E de acordo com a análise de variância as médias foram classificadas como significativas ($p \leq 0,05$), exceto nos valores do CPA, MSPA, MSCR e MST para *M. urundeuva* e CR para o *H. chrysotrichus*, conforme mostrado na Tabela 1, verificando que após a aplicação do teste aglomerativo de Skott - Knott, houve diferenças na germinação e vigor das sementes, sendo possível ranquear os tratamentos.

Tabela 1. Quadrados médios (QM) e coeficientes percentuais da variação experimental para testes com sementes de espécies florestais do Pantanal criopreservadas em NL₂, onde foram avaliados os Índice do Velocidade de Germinação (IVG), Porcentagem de Germinação (G%), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Porcentagem de Emergência (E%), Comprimento da Parte Aérea (CPA), Comprimento da Raiz (CR), Massa da Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA), Massa da Matéria Seca da Raiz (MSR) e Massa da Matéria Seca Total (MST).

| Espécies | Variáveis | | | | | | | | |
|----------|-----------|-----------|----------|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | IVG - | G (%) | IVE - | E (%) | CPA (cm) | CR (cm) | MSPA (g) | MSR (g) | MST (g) |
| A | 3,354* | 1669,380* | 2,597* | 941,160 * | 6,215 ^{ns} | 8,243* | 0,000 ^{ns} | 0,000 ^{ns} | 0,000 ^{ns} |
| B | 7,616* | 1304,180* | 2,094* | 992,180* | 4,775* | 4,341* | 0,003* | 0,004* | 0,015* |
| C | 3,610* | 1626,500* | 3,677* | 425,290* | 6,586* | 6,534* | 0,002* | 0,002* | 0,007* |
| D | 4,392* | 1128,040* | 2,223* | 1253,38* | 4,252* | 2,861 ^{ns} | 0,001* | 0,008* | 0,003* |
| E | 6,874* | 493,380* | 10,808 * | 802,71* | 19,078* | 4,683* | 0,001* | 0,001* | 0,006* |

Legenda: A- *M. urundeuva*, B- *P. dubium*, C- *A. fraxinifolium*, D- *H. chrysotrichus*, E- *H. impetiginosus*. ^{ns} - Médias não apresentam diferenças significativas; * - médias apresentam diferenças significativas, ao nível de 5% de significância.

Na análise da variável IVG (Tabela 2), em sementes de *M. urundeuva* os tratamentos foram separados em quatro grupos distintos com a Testemunha Padrão (4,095), ficando classificada como o tratamento que apresentou a maior média. E de T5 - T8 (1,695, 1,450, 1,285, 1,392) como o grupo com as médias mais baixas.

Nas sementes de *P. dubium* e *H. impetiginosus* (Tabela 2) ocorreu a separação das médias em apenas dois grupos, sendo os tratamentos Testemunha Padrão, Testemunha, T1, T2, T3 e T4 (5,592, 6,682, 5,087, 5,302, 4,977 e 4,422, e 9,381, 10,433, 10,062, 9,875, 9,556 e 9,551) para ambas as espécies classificados no grupo que se destacou dos demais tratamentos aplicados. E, para as sementes de *A. fraxinifolium* e *H. chrysotrichus* ocorreram três grupos distintos, sendo para o *A. fraxinifolium* a Testemunha Padrão e para o *H. chrysotrichus* a Testemunha Padrão e a Testemunha, os tratamentos que apresentaram as melhores médias, quando comparadas aos demais tratamentos.

Souza et al. (2005) a fim de determinar as melhores condições e períodos de armazenamento adequados a tipos de conservação do vigor das sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* Vahl.), verificou aos 0 dias de armazenamento em câmara fria valores próximos aos encontrados nesse trabalho (3,65).

Nas sementes de *P. dubium* e *H. impetiginosus* os tratamentos tanto com imersão direta em NL₂ quanto com o uso da sacarose, mostraram-se igualmente eficientes quanto ao IVG, não retardando o tempo de desenvolvimento do embrião com o processo de criopreservação e, permitindo a emissão das estruturas da parte

aérea e raiz. Já para as sementes de *H. chrysotrichus* os tratamentos Testemunha Padrão- sem imersão em NL₂ e Testemunha, com imersão direta em NL₂, foram os que apresentaram as melhores médias e para as demais espécies somente a Testemunha Padrão manteve médias superiores.

É importante ressaltar que as sementes de *H. impetiginosus* apresentaram um comportamento atípico para sementes dessa espécie, em todos os tratamentos, com médias superiores as encontradas nos estudos realizados por Lamarca e Bardedo (2017). A observação dessas médias pode estar ligada ao ponto máximo de maturação fisiológica das sementes dos lotes.

Gemaque et al. (2005) explicam em seu trabalho que os estágios de desenvolvimento da semente (fertilização, acumulação de nutrientes, perda de água até a dormência), podem gerar mudanças morfológicas e fisiológicas que podem alterar o desempenho das sementes. Os autores ainda explicam que o ponto máximo de vigor e germinação de uma semente ou a maturidade fisiológica é atingida com o acúmulo máximo de matéria seca que ela pode adquirir.

As sementes de *M. urundeuva*, *P. dubium*, *A. fraxinifolium* e *H. chrysotrichus* utilizadas nos testes de germinação (G%) apresentaram os tratamentos Testemunha Padrão e Testemunha no grupo com as maiores médias (Tabela 2). Já para as sementes de *H. impetiginosus* ocorreu a formação de três grupos distintos, onde os tratamentos Testemunha Padrão, Testemunha, T1 e T3, se destacaram dos demais.

Foi possível observar que para as sementes de *P. dubium* e *H. impetiginosus*, na variável IVG além dos tratamentos T. e T.P., aqueles com imersão em diferentes concentrações de sacarose (0,29, 0,58, 0,87 e 1,16M), também se destacaram para as espécies e para todas as espécies no que se refere a porcentagem de germinação, o tratamento com imersão direta em NL₂ (Testemunha) se destacou dos demais tratamentos (Tabela 2).

Araújo et al. (2016), trabalhando com sementes de *Passiflora spp.*, tratadas com diferentes crioprotetores e criopreservadas em NL₂, teve para *Passiflora edulis* os melhores resultados de IVG e porcentagem de germinação (3,3 e 78% e 2,89 e 70%) nos tratamentos controle (sem imersão em NL₂) e sem o uso dos crioprotetores, com imersão direta em NL₂, assim, como Stegani et al. (2017), que obteve os melhores resultados para germinação (57%) sementes de *S. leucotricha* criopreservadas diretamente em NL₂.

Tabela 2. Médias para o Índice do Velocidade de Germinação (IVG), Porcentagem de Germinação (G%), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Porcentagem de Emergência (E%) Comprimento da Parte Aérea (CPA), Comprimento da Raíz (CR), Massa Seca da Parte Aérea (MSPA), Massa Seca da Raíz (MSR) e Massa Seca Total (MST) para sementes e plantas de cinco espécies do bioma Pantanal criopreservadas em Nitrogênio Líquido (NL₂).

| F.V. | IVG - | G (%) | IVE - | E (%) | CPA (cm) | CR (cm) | MSPA (g) | MSCR (g) | MST (g) |
|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|---------------------|------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| A - <i>M. urundeuva</i> | | | | | | | | | |
| T. P. | 4,095 a | 88,000 a | 3,687 a | 81,000 a | 9,415 ^{ns} | 10,495 a | 0,110 ^{ns} | 0,122 ^{ns} | 0,232 ^{ns} |
| T. | 3,295 b | 84,000 a | 3,255 a | 77,000 a | 9,685 | 9,360 b | 0,107 | 0,112 | 0,222 |
| T1 | 2,617 c | 59,000 b | 2,705 b | 62,000 b | 9,155 | 8,300 b | 0,105 | 0,112 | 0,222 |
| T2 | 2,765 c | 51,000 c | 2,482 b | 54,000 c | 12,227 | 11,692 a | 0,107 | 0,115 | 0,220 |
| T3 | 2,610 c | 41,000 d | 1,755 c | 50,000 c | 9,407 | 9,727 b | 0,110 | 0,115 | 0,225 |
| T4 | 2,255 d | 38,000 d | 1,732 c | 44,000 c | 8,617 | 8,180 b | 0,110 | 0,117 | 0,230 |
| T5 | 1,695 e | 37,000 d | 1,535 c | 42,000 c | 11,415 | 12,040 a | 0,112 | 0,110 | 0,225 |
| T6 | 1,450 e | 36,000 d | 1,475 c | 39,000 c | 10,287 | 9,260 b | 0,105 | 0,107 | 0,212 |
| T7 | 1,285 e | 36,000 d | 1,635 c | 40,000 c | 8,400 | 8,067 b | 0,107 | 0,110 | 0,217 |
| T8 | 1,392 e | 33,000 d | 1,502 c | 43,000 c | 8,702 | 8,512 b | 0,102 | 0,107 | 0,215 |
| CV(%) | 13,31 | 10,34 | 14,01 | 18,16 | 19,66 | 18,97 | 7,53 | 8,00 | 6,19 |
| B - <i>P. dubium</i> | | | | | | | | | |
| T. P. | 5,592 a | 81,000 a | 4,010 a | 81,000 a | 12,850 a | 12,037 a | 0,177 a | 0,202 a | 0,3800 a |
| T. | 6,682 a | 79,000 a | 3,625 b | 78,000 a | 11,612 b | 12,650 a | 0,150 b | 0,132 b | 0,2825 b |
| T1 | 5,087 a | 56,000 b | 2,635 b | 52,000 b | 11,762 b | 11,487 a | 0,130 c | 0,120 c | 0,2525 c |
| T2 | 5,302 a | 44,000 b | 2,535 b | 44,000 b | 10,800 c | 10,800 b | 0,112 d | 0,117 c | 0,2325 d |
| T3 | 4,977 a | 43,000 b | 2,592 b | 43,000 c | 10,362 c | 9,925 b | 0,105 d | 0,107 d | 0,2100 e |
| T4 | 4,422 a | 42,000 b | 2,505 b | 43,000 c | 9,975 c | 9,875 b | 0,097 e | 0,105 d | 0,2075 e |
| T5 | 3,990 b | 40,000 b | 2,310 b | 43,000 c | 10,112 c | 10,337 b | 0,095 e | 0,102 d | 0,1975 e |
| T6 | 3,232 b | 35,000 b | 2,012 b | 41,000 c | 10,287 c | 10,162 b | 0,095 e | 0,097 e | 0,1850 f |
| T7 | 2,117 b | 32,000 b | 2,542 b | 40,000 c | 9,512 c | 9,900 b | 0,092 e | 0,095 e | 0,1825 f |
| T8 | 2,932 b | 32,000 b | 2,397 b | 39,000 c | 9,437 c | 9,600 b | 0,090 e | 0,095 e | 0,1850 f |
| CV(%) | 16,44 | 18,23 | 16,33 | 11,18 | 6,52 | 5,94 | 7,13 | 5,71 | 6,5 |
| C - <i>A. fraxinifolium</i> | | | | | | | | | |
| T. P. | 5,000 a | 86,000 a | 5,380 a | 69,000 a | 11,730 a | 11,730 a | 11,277 a | 0,115 a | 0,110 a |
| T. | 4,177 b | 83,000 a | 3,522 b | 57,000 b | 11,790 a | 11,790 a | 11,867 a | 0,110 a | 0,112 a |
| T1 | 3,787 b | 61,000 b | 3,267 b | 56,000 b | 9,377 b | 9,377 b | 9,657 b | 0,095 b | 0,112 a |
| T2 | 3,660 b | 43,000 c | 2,897 b | 52,000 b | 9,990 b | 9,990 b | 10,000 b | 0,085 b | 0,092 b |
| T3 | 2,682 c | 40,000 c | 2,947 b | 45,000 c | 9,070 b | 9,070 b | 9,370 b | 0,072 c | 0,080 c |
| T4 | 2,342 c | 35,000 c | 2,325 c | 44,000 c | 11,730 a | 9,230 b | 9,702 b | 0,070 c | 0,077 c |
| T5 | 2,465 c | 37,000 c | 2,540 c | 43,000 c | 11,790 a | 9,082 b | 9,105 b | 0,072 c | 0,067 d |

Continua...

Continuação...

| F.V. | IVG | G | IVE | E | CPA | CR | MSPA | MSCR | MST |
|------------------------------------|----------|----------|---------|----------|----------|---------------------|---------|---------|---------|
| | - | (%) | - | (%) | (cm) | (cm) | (g) | (g) | (g) |
| T6 | 2,480 c | 35,000 c | 2,382 c | 42,000 c | 9,377 b | 8,292 c | 8,470 c | 0,057 d | 0,062 d |
| T7 | 2,455 c | 36,000 c | 2,212 c | 38,000 c | 9,990 b | 8,197 c | 8,025 c | 0,057 d | 0,060 d |
| T8 | 2,307 c | 36,000 c | 2,230 c | 35,000 c | 9,070 b | 8,620 c | 8,005 c | 0,055 d | 0,057 d |
| CV(%) | 16,44 | 16,76 | 18,75 | 12,86 | 11,730 a | 5,96 | 9,93 | 11,08 | 7,98 |
| D - <i>H. chrysotrichus</i> | | | | | | | | | |
| T. P. | 3,617 a | 72,000 a | 3,200 a | 89,000 a | 9,350 b | 9,750 ^{ns} | 0,104 a | 0,114 a | 0,217 a |
| T. | 3,937 a | 76,000 a | 2,875 a | 79,000 a | 10,600 a | 9,700 | 0,099 a | 0,113 a | 0,212 a |
| T1 | 2,215 b | 46,000 b | 2,027 a | 51,000 b | 8,725 c | 8,600 | 0,095 a | 0,107 a | 0,207 a |
| T2 | 2,475 b | 40,000 b | 1,717 a | 42,000 b | 7,900 d | 8,600 | 0,087 b | 0,104 b | 0,190 b |
| T3 | 1,900 b | 49,000 b | 1,207 b | 43,000 b | 7,800 d | 10,150 | 0,083 b | 0,098 b | 0,182 b |
| T4 | 1,127 c | 38,000 c | 1,380 b | 44,000 b | 7,550 d | 7,900 | 0,082 b | 0,097 b | 0,180 b |
| T5 | 1,365 c | 32,000 c | 2,822 a | 48,000 b | 7,775 d | 10,200 | 0,081 b | 0,105 b | 0,187 b |
| T6 | 1,362 c | 27,000 c | 2,112 b | 46,000 b | 8,350 c | 9,925 | 0,061 c | 0,076 b | 0,140 c |
| T7 | 0,922 c | 34,000 c | 1,352 b | 36,000 b | 7,375 d | 10,400 | 0,063 c | 0,080 b | 0,142 c |
| T8 | 1,290 c | 33,000 c | 1,227 b | 39,000 b | 7,625 d | 8,475 | 0,060 c | 0,076 b | 0,137 c |
| CV(%) | 16,87 | 20,09 | 18,30 | 16,58 | 6,72 | 13,89 | 11,72 | 7,22 | 9,04 |
| E - <i>H. impetiginosus</i> | | | | | | | | | |
| T. P. | 9,381 a | 93,000 a | 8,045 a | 95,000 a | 14,312 a | 12,275 a | 0,150 a | 0,142 a | 0,292 a |
| T. | 10,433 a | 88,000 a | 7,267 a | 93,000 a | 14,362 a | 10,862 a | 0,122 b | 0,142 a | 0,247 a |
| T1 | 10,062 a | 82,000 a | 7,050 a | 85,000 b | 12,812 b | 10,800 a | 0,115 b | 0,142 a | 0,255 b |
| T2 | 9,875 a | 76,000 b | 6,885 a | 76,000 c | 12,812 b | 11,700 a | 0,105 c | 0,110 b | 0,215 c |
| T3 | 9,556 a | 80,000 a | 7,002 a | 74,000 c | 10,650 c | 10,387 b | 0,110 c | 0,107 b | 0,215 c |
| T4 | 9,551 a | 73,000 b | 5,872 b | 67,000 d | 9,350 c | 9,175 b | 0,097 d | 0,107 b | 0,205 c |
| T5 | 8,295 b | 70,000 b | 4,165 c | 65,000 d | 9,475 c | 9,750 b | 0,090 e | 0,102 b | 0,187 d |
| T6 | 8,466 b | 72,000 b | 3,687 c | 65,000 d | 8,850 c | 9,750 b | 0,090 e | 0,102 b | 0,182 d |
| T7 | 6,766 b | 63,000 c | 3,642 c | 62,000 d | 9,287 c | 9,375 b | 0,085 e | 0,092 b | 0,187 d |
| T8 | 6,750 b | 56,000 c | 4,725 c | 51,000 d | 8,962 c | 9,125 b | 0,085 e | 0,092 b | 0,175 d |
| CV(%) | 18,7 | 11,24 | 11,00 | 7,54 | 11,32 | 11,47 | 5,9 | 10,47 | 7,1 |

Legenda: ^{ns} - Médias não apresentam diferenças significativas para compor a classificação dos tratamentos; * - médias apresentam diferenças significativas entre os tratamentos; e médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância. TP - Testemunha Padrão-dosagem 0 de crioprotetor e sem imersão em NL₂; Testemunha (T.) - dosagem 0 de crioprotetor, com imersão em NL₂; T1 - sacarose 0,29M em solução; T2 - sacarose 0,58M em solução; T3 - sacarose 0,87M; T4 - sacarose 1,16M em solução; T5 - DMSO 5% em solução; T6 - DMSO 10% em solução; T7 - DMSO 15% em solução; e T8 - DMSO 20% em solução.

De acordo com Aguiar et al. (2012) os efeitos prejudiciais durante o processo de criopreservação podem ser causados pela formação de cristais de gelo intracelulares, com o fluxo de água para fora da célula (desidratação) e aumento de concentração intracelular de solutos.

De acordo com Araújo et al. (2016), o uso de açúcares, em especial a sacarose, pode estabilizar a bicamada de fosfolípidos, atuando como agente osmótico externo. E, quando na ausência de água a sacarose mantém a capacidade de transportar a nutrientes através das membranas, manter os lipídios em fase fluida, estabilizando proteínas em condições de congelamento (Woelders et al., 1997). Contudo, para esse estudo, como citado acima, somente duas espécies responderam conforme o previsto pelos autores, apresentando índices de IVG classificados em grupos superiores aos tratamentos com DMSO e, compondo o grupo com as melhores médias com os tratamentos com imersão direta em NL₂ e sem imersão.

Os tratamentos com DMSO apresentaram as menores médias tanto para IVG quanto para porcentagem de germinação, independente das espécies estudadas e dos níveis de concentração das soluções (5, 10, 15 e 20%).

Hubálek (2003) explica que o DMSO pode causar toxicidade devido a sua alta solubilidade em água, causando injúrias as células, por vezes imperceptíveis. Há estudos relatando a baixa toxidez do DMSO e a sua alta permeabilidade nas células. Quando comparado ao uso de açúcares como a sacarose, entretanto, para essa pesquisa os tratamentos com DMSO não mantiveram a porcentagem de germinação das sementes quando comparados ao tratamento T.P.

Galdiano Jr. et al. (2012) afirmam que dentre os fatores considerados importantes para uma vitrificação de sucesso está a seleção de crioprotetores e o tempo de exposição do tecido nas soluções tendo como prioridade reduzir a toxicidade potencial nas células vegetais e aumentar a recuperação após o período de armazenamento. Desse modo, as variáveis IVG e porcentagem de germinação refletem a possibilidade de estabelecer e propor protocolos de criopreservação para as sementes estudadas, sem o uso de soluções crioprotetoras.

As sementes das espécies do Pantanal avaliadas em casa de vegetação (C.V.), apresentaram para IVE a formação de três grupos distintos para *M. urundeuva*, *A. fraxinifolium* e *H. impetiginosus*. Na primeira espécie os tratamentos Testemunha Padrão e Testemunha foram os que se destacaram dos demais, para o *A. fraxinifolium* somente a Testemunha Padrão compôs o grupo com as maiores médias e nas

sementes de *H. impetiginosus*, além dos tratamentos sem imersão em NL₂ (T.P.) e com imersão direta (T.), formaram também o grupo com as maiores médias os tratamentos de T1 - T3, com doses de sacarose de 0,29, 0,58 e 0,87M.

Os índices encontrados para IVE, nas sementes estudadas, corroboram com os resultados encontrados por Diniz et al. (2015), que obteve em sementes de *M. urundeuva* recém coletadas a média de 4,00.

Nas sementes de *P. dubium* e *H. chrysotrichus* observou-se a formação de dois grupos no IVE, sendo para *P. dubium* somente a Testemunha Padrão se destacou dos demais tratamentos com uma média de 4,01/dias. Já para o *H. chrysotrichus* os tratamentos classificados com as maiores médias foram os Testemunha Padrão, Testemunha, T1, T2 e T5.

Os valores para porcentagem de emergência mostraram-se mais altos na T.P. e T., como mostrado na Tabela 2, com taxas de 95, 89, 81 e 69 % para *H. impetiginosus*, *H. chrysotrichus*, *M. urundeuva* e *A. fraxinifolium* e *P. dubium* na T.P respectivamente, já para T. os valores das médias foram de 93, 79, 77 e 57% para as plântulas de *H. impetiginosus*, *H. chrysotrichus* e *P. dubium*, *M. urundeuva* e *A. fraxinifolium*.

Os dados obtidos nesse trabalho estão de acordo com os encontrados por Araújo et al. (2016), quando notou que para sementes de *P. edulis* os tratamentos sem imersão em NL₂ e sem o uso de crioprotetores e com imersão em NL₂, apresentou médias superiores para IVE e porcentagem de emergência, comparadas as sementes tratadas com DMSO ou sacarose.

Paiva Sobrinho et al. (2017), apresentaram valores que permitem uma interpretação diferente das obtidas nesse trabalho, pois, com sementes de *Genipa americana*, obtiveram após o tratamento com DMSO na concentração de 11,29%, uma porcentagem de emergência de 64,2%, sendo o vigor das plantas mantido. E para os tratamentos com sacarose os valores tanto de IVE quanto de IVG ficaram com médias inferiores aos das sementes tratadas com DMSO.

Na presente pesquisa os valores de DMSO para *H. impetiginosus*, nas concentrações de 5 e 10% apresentaram valores de 65% na porcentagem de emergência, próximos aos encontrados pelos autores acima citados. Contudo, comparando os valores com o grupo de maiores médias (Tabela 2) a diferença foi de 28% para menos. Os efeitos dos crioprotetores podem variar de acordo com o material

e espécie a serem criopreservado de modo que o material pode ou não apresentar a perda do vigor (Huehne e Bhinija, 2012).

Comparando ao agrupamento das médias entre os tratamentos para as espécies estudadas, verificou-se que assim como para o IVG e porcentagem de germinação, as sementes apresentaram os melhores resultados a partir dos tratamentos sem criopreservação e/ou com a imersão direta em NL_2 pois, de acordo com estudos realizados por Carvalho e Nakagawa (2012), sementes que apresentam maior vigor tendem a formar plântulas mais vigorosas.

Zeliang e Pattanayak (2012) reforçam que os protocolos para conservação propostos devem manter a viabilidade dos materiais biológicos durante o ciclo de congelamento e descongelamento. Contudo, pode-se ter respostas diferentes com um mesmo protocolo dependendo dos materiais utilizados.

O vigor das sementes estudadas apresentou uma diminuição expressiva das médias de IVE e porcentagem de emergência a partir do uso das soluções com DMSO e sacarose. De acordo com Wu et al. (2013), uma concentração elevada de DMSO, que varia de acordo com as especificidades do material estudado, pode provocar desidratação osmótica excessiva, pois quando esse crioprotetor passa através da membrana da célula pode levar a morte dos tecidos.

Hirano et al. (2009) explicam que altas dosagens de sacarose também podem diminuir o vigor das sementes pelo excesso de desidratação pois, a solução de sacarose tende a substituir uma parte da água presente nas sementes e se esta estiver com uma quantidade próxima do mínimo aceitável para manter o seu vigor será, provavelmente, afetada.

As médias para comprimento da parte aérea (CPA), como de acordo com a Tabela 2, não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos para as plantas de *M. urundeuva*. As sementes de *P. dubium* e *H. impetiginosus* apresentaram três grupos distintos, sendo que para *P. dubium* a Testemunha Padrão obteve as melhores médias (12,85cm) e para o *H. impetiginosus* além da Testemunha Padrão (14,31cm), também compôs o grupo que se destacou a Testemunha (14,36cm). O agrupamento das melhores médias para as plantas de *H. chrysotrichus* contemplou somente a Testemunha (10,60cm). Já nas plantas de *A. fraxinifolium* as melhores médias estão nos tratamentos Testemunha Padrão, Testemunha, T4 e T5.

No comprimento da raiz (CR) das plantas de *M. urundeuva*, apresentaram as melhores médias os tratamentos Testemunha Padrão, T2 e T5 (Tabela 2), para o *P.*

dubium se destacaram a Testemunha Padrão, Testemunha e T1. Já nas plantas de *A. fraxinifolium* os tratamentos com as melhores médias foram a Testemunha Padrão, a Testemunha, T4 e T5 e para o *H. impetiginosus* os grupos com os tratamentos com as maiores médias seguiram a sequência da Testemunha Padrão a T2. Não foram encontradas diferenças significativas para as plantas de *H. chrysotrichus* nessa variável.

Nos tratamentos com sacarose a dosagem de 1,16M (T4) e DMSO a 5% (T5), bem como, a imersão direta em NL₂ (T.) mostraram resultados positivos para o CPA em plantas de *A. fraxinifolium*, sendo este último tratamento também se apresentando juntamente com a Testemunha Padrão para *H. impetiginosus* no grupo com as melhores médias. Já para o CR, em plantas de *M. urundeuva* foi possível notar que as dosagens de sacarose de 0,29M (T1) e DMSO 5% (T4) também se apresentaram no grupo das maiores médias. A sacarose também mostrou bons resultados para o *H. impetiginosus* nas concentrações 0,29 (T1) e 0,58M (T2), assim como a imersão direta em NL₂ (T.). Contudo, mesmo que separados em grupos distintos, os valores encontrados possuem uma diferença muito pequena entre si, tanto para CPA quanto para CR.

Resultados semelhantes foram encontrados por Galdiano Jr et al. (2012) utilizando crioprotetores para a conservação de sementes de *Dendrobium Swartz* Dong Yai, em NL₂, notaram que independente do tratamento aplicado não houve alterações nas características de crescimento e desenvolvimento normal da planta.

Stegani et al. (2017), obtiveram para o CPA os maiores valores de média a partir do tratamento controle, composto de sementes de *S. leucotricha* criopreservadas em NL₂ e sem o uso de soluções crioprotetoras e para CR os maiores valores estavam no tratamento controle, seguido dos tratamentos PVS3 modificado e PVS2 (30% de glicerol, 15% de etileno glicol, 15% dimetil sulfóxido e 0,4 M de sacarose, diluído em ½ meio MS) + floroglucinol. Já os resultados obtidos por Garcia e Lima (2000), no teste de vigor baseado no comprimento da parte aérea de plântulas de *Copaifera multijuga* (Hayne), não se mostraram eficientes em detectar diferenças entre as sementes armazenadas em diferentes embalagens no ambiente de laboratório.

Nas sementes das espécies estudadas foi possível observar que houve uma tendência para uma relação decrescente entre a classificação das médias entre o CPA e CR com o tipo de tratamento aplicado. Para as cinco espécies do Pantanal, os

tratamentos com as maiores médias estiveram entre a criopreservação sem a crioproteção das sementes e com dosagens iniciais de sacarose ou DMSO.

Os tratamentos com maiores valores de comprimento de partes ou de plantas normais inteiras são considerados por Vieira e Carvalho (1994) como mais vigorosos. O fato das plantas de maior comprimento estarem associadas com o seu vigor pode ser explicado por apresentarem uma maior capacidade de translocação das suas reservas e maior assimilação desta pelo eixo embrionário quando comparadas com as de menor comprimento onde, geralmente, os cotilédones auxiliam no processo fornecendo os nutrientes armazenados ou fotossintetizados para a plântula.

Para as MSPA, MSR e MST a classificação das médias de acordo com a Tabela 2, as plântulas não mostraram diferenças significativas para os tratamentos aplicados nas sementes de *M. urundeuva*, e para as plantas de *P. dubium* as maiores médias foram encontradas nas Testemunha Padrão para MSPA, MSCR e MST, já nas plantas avaliadas de *A. fraxinifolium* o comportamento dos tratamentos mostrou médias maiores nas Testemunha Padrão e Testemunha para MSPA, MSCR e em MST, o tratamento com dosagem 0,29M (T1) além das Testemunha Padrão e Testemunha, compôs o grupo que se destacou dos demais.

As plantas de *H. chrysotrichus* nas variáveis MSPA, MSCR e MST, tiveram os tratamentos Testemunha Padrão e Testemunha e T1 mostrando resultados com maior média quando comparado com os demais e, para o *H. impetiginosus* além da Testemunha Padrão presente em todas as variáveis, a Testemunha também se destacou para MSCR e MST e o T1 para MSCR. Esses dados corroboram com os encontrados por Silva et al. (2016), quando avaliou a criopreservação de sementes de *Ziziphus joazeiro* Mart e verificou que para sementes sem o uso de crioprotetor o peso da matéria seca diminuiu conforme o período de tempo armazenado.

Comparando o uso da sacarose e do DMSO com os tratamentos que não utilizaram as soluções verificou-se que fora a dosagem de 0,29M (T1) nas espécies de ipê, a tendência foi a MST apresentar médias inferiores nos tratamentos que utilizaram a imersão das sementes nas soluções crioprotetoras.

Araújo et al. (2016) trabalhando com sementes de *Passiflora nítida* tratadas com soluções de sacarose e DMSO e armazenadas em NL₂, verificou que as médias dos tratamentos com ou sem o uso de soluções crioprotetoras se equivaleram aos do tratamento controle (com imersão direta em NL₂) para a maioria das variáveis analisadas. Goldfarb et al. (2010), trabalhando com sementes de *Jatropha curcas* L.,

e Souza et al. (2005), trabalhando com sementes de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) verificaram que no processo de armazenamento em baixas temperaturas o vigor medido pela massa seca das plantas não foi perdido.

Segundo Nakagawa (1994), no processo de germinação, as sementes vigorosas possibilitam uma maior transferência de massa seca de seus tecidos de reserva para o eixo embrionário, originando plântulas com maior peso, em razão do maior acúmulo de matéria.

Em um contexto geral, quando comparado o grau de representatividade das médias de todas as variáveis analisadas, o tratamento com a imersão direta em NL₂ para todas as espécies apresenta-se como alternativa para o armazenamento de RGV por longos períodos de tempo, sendo possível supor que nesses protocolos ocorre a preservação das estruturas físicas da semente e, conseqüentemente, proporcionar os bons resultados de germinação e vigor desse material.

5. CONCLUSÕES

No teste de germinação, a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação mostraram médias favoráveis para a criopreservação com imersão direta em NL₂ para todas as espécies, e

Os testes de germinação e vigor indicaram que para todas as espécies, o armazenamento das sementes em NL₂ sem o uso de soluções crioprotetoras é o mais promissor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, T.D.F.; TEIXEIRA, M.F.S.; TELES, C.H.A.; MARTINS, G.R.; JÚNIOR, R.Q.B.; COSTA, E.C. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.2, p.80-93, 2012.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

ARAÚJO, D. S., DA LUZ, P. B., NEVES, L. G., E PAIVA SOBRINHO, S. Criopreservação de espécies de Passiflora. **Journal of Seed Science**. v. 38, n. 3, 2016.

ARONSON, J.; DURIGAN, G.; BRANCALION, P. H. S. Conceitos e definições correlatos à ciência e à prática da restauração ecológica. **IF Série Registros**, v. 44, p. 1-38, 2011.

BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Springer-Verlag, New York: Heiderlberg, 1995. p. 89-91.

BARRÔCO, R. M., VAN POUCKE, K., BERGERVOET, J. H., DE VEYLDER, L., GROOT, S. P., INZÉ, D., ENGLER, G. The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. **Plant Physiology**, v.137: n. 1, p. 127-140, 2005.

BERTOLINI, I. C.; BRUN, E. J.; DEBASTIANI, A. B. Caracterização silvicultural da canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 2, p. 67-76, 2015.

BEWLEY, J. D.; BLACK. M. **Seeds: physiology of development and germination**. Plenum Press, 1994. 445p.

BORÉM, A. 1998. **Melhoramento de Plantas, 2ª ed**. Universidade Federal de Viçosa. 453p.

BRAGA, L.L.; RODRIGUES, P.M.S.; NUNES, Y.R.F.; VELOSO, M. D. M. Effects of pre-germination treatments and storage on germination of *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) diaspores. **Ciência Florestal**, v. 24, p. 391-399. 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária., 2013, 93p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regras para análise de sementes**. Manual. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS. 2009, 399p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - MMA. **Mapas de cobertura vegetal dos biomas brasileiros**. (2007). Brasília, DF: Secretaria de Biodiversidade e Florestas – SBF, IBGE.

CANUTO, D. S. O. **Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão) utilizando caracteres quantitativos**, Ilha Solterria. Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2009. 112p. Tese (Doutorado em Agronomia).

CARDOSO, V. J. M. PARÂMETROS TERMO-HÍDRICOS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Astronium fraxinifolium* SCHOTT E ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS. **Heringeriana**, v. 9, n. 1, p. 13-23, 2015.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Documentos, 115, Embrapa Algodão, 26 p. 2003.

CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A., DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, nº 2, p.15-25, 2006.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.

CARVALHO, V. S.; OTONI, W. C. Criopreservação de Germoplasma Vegetal. In: PEREIRA, T. N. S. Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas. **Arca**, 2010. p.89-113.

COSTA, C. J. **Armazenamento e conservação de sementes de espécies do Cerrado**. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados: Documento. 2009, 30p.

DINIZ, R. Q.; DINIZ, B. L. M. T.; AZEREDO, G. A.; SOUZA, V. C.; PEREIRA, E. M. Potencial germinativo de sementes de Aroeira **Myracrodruon urundeuva** Fr. coletadas de população no cariri paraibano. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 1, p. 154-159, 2015.

DONADIO, N. M. M.; DEMATTÊ, M. E. S. P. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de canafístula (*Peltophorum dubium* (spreng.) Taub.) e jacarandá-da-bama (*Dalbergia nigra* (ver.) fr.ar. exbentb.)- fabaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.1, p. 64-73, 2000.

DONG-JU, S.; YONG, L.; YOUNG-HYUN, P.; SUNG-KEUN, C.; YEO-PYO, Y.; JINTAE, H.; GARY, R.; TAKEOKA; KWANG-GEUN, L.; SUNG-EUN, L.; MI-RAN, K.; JEONG-HAN, K.; BYEOUNG-SOO P. Inhibitory effects of *Tabebuia impetiginosa* inner bark extract on platelet aggregation and vascular smooth muscle cell proliferation through uppressions of arachidonic acid liberation and ERK1/2 MAPK activation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 148 – 151. 2006.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. In *Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*. v.47 (1), p 05-16, 2011.

FEITOSA, D. G.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R.; PAIANO, M. O. Crescimento de mudas de gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium*) sob diferentes fontes e doses de nitrogênio. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, 2011.

FELIZARDO, V. O.; DRUMOND, M. M.; MURGAS, L. D. S.; ANGERONIMO, M. G.; SILVA, J. M. de A.; PEREIRA, G. J. M.; CARVALHO, A. F. S. Avaliação da eficiência de diferentes soluções crioprotetoras no congelamento de sêmen de Piracanjuba *Brycon orbignyanus*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 2007**. Anais. Embrapa, 2007. 7 p.

FERNANDES, L. A. et al. **Montagem e anotação funcional de sequências Gênicas de *handroanthus impetiginosus* (mart. ex DC) Mattos**. Goiania: Universidade Federal de Goiás, 2015. 63p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Biológicas).

FERNANDEZ, J. R. C. **Germinação, conservação, produção de mudas e tolerância à inundação da *Vochysia divergens* Pohl**. São Carlos. Universidade Federal de São Carlos, 2010. 91p. (Tese – Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais).

FIGUEIRÔA, J. M.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Crescimento de plantas jovens de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Acta Botanica Brasilica**, v.18,n.3, p.573-580. 2004.

FONSECA, E. M., FERREIRA, M. A., NUNES, J. R. S., PINHO, N. G. C., FERRAZ, L., MACEDO, M., GUARIM NETO, G. **Aspectos fitossociológicos de uma comunidade de Carvoal (*Callisthene fasciculata*) no pantanal de Mato - Grosso, Brasil**. SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SOCIOECONÔMICOS DO PANTANAL, 2004. p. 229-243.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J.F.A.; BICUDO, C.E. DE M.; CANHOS, D.; CARVALHO JR., A.A.; COSTA, A.F.; COSTA, D.P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P.M.; LOHMANN, L.G.; LUGHADHA, E.N.; MAIA, L.C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.P.; NADRUZ, M.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, V.C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L.S.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D.C. **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014. vol.2, 870p.

FOWLER, J. A. P. et al. **Conservação de sementes de pinheiro-do-paraná sob diferentes condições de ambientes e embalagens**. Colombo: EMBRAPA/CNPF, Comunicado Técnico, n. 34, p.1-4, 1998.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; LEMOS, E. G. M.; FARIA, R. T.; VENDRAME, W. A. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. **Scientia Horticultura**, v.148, p.154-160, 2012.

GALDINO, P.M.; NASCIMENTO, M.V.M.; SAMPAIO B.L. Antidepressant-like effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, n.3, p.581-585, 2009

GARCIA, L. C.; LIMA, D. Comportamento de sementes de *Copaifera multijuga* Hayne durante o armazenamento. **Revista Acta Amazônica**. v. 30: n.3, p. 369-375, 2000.

GEMAQUE, R. C. R.; DAVIDE, A. C., DA SILVA, E. A. A.; FARIA, J. M. R. EFFECT OF SLOW AND FAST DRYING ON IPÊ-ROXO SEEDS (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Revista Cerne**. v. 11, n. 4, p. 329–335-329–335, 2005.

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, p.27-33, 2010.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. Pirassununga: Universidade de São Paulo, 2004. 92 p. (Tese – Doutorado em Reprodução animal).

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROCA, W. M.; ESCOBAR, R. H., ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 92, n. 1, p. 1-13, 2008

GROOM, M. J.; MEFFE, G. K.; CARROLL, C. R. **Princípios da biologia da conservação**. Sunderland: Sinauer Associates, 2006, 286p.

HARRIS, M.B.; ARCANGELO, C.; PINTO, E.C.T.; CAMARGO, G.; RAMOS NETO, M.B.; SILVA, S. M. **Estimativas de perda da área natural da Bacia do Alto Paraguai e Pantanal Brasileiro**. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Campo Grande - MS, 2005. 31p.

HIRANO, T.; GODO, T.; MIYOSHI, K. et al. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. **Plant Biotechnology Reports**, v.3, n.1, p.103-109, 2009.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v.46, p.205-229, 2003

HUEHNE, P.S.; BHINIJA, K. Application of cryoprotectants to improve low temperature storage survival of orchid seeds. **Scientia Horticulturae**, v.135, p.186–193, 2012.

IBPGR. **Elservier's dictionary of plant genetic resources**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1991. 187p.

JOSÉ, S. C. B. R.; SALOMÃO, A. N., MUNDIM, R. C.; PÁDUA, J. G. Umidificação de sementes de girassol após ultrassecagem em sílica gel e câmara de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31: n.3, p.16-26, 2009.

KAGEYAMA, P., Santarelli, E., Gandara, FB, Gonçalves, JC, Simionato, JL, Antiqueira, LR, e Geres, W.. Revegetação de áreas degradadas: modelos de consorciação com alta diversidade. In: **Simpósio Sul-Americano Simpósio Nacional Recuperação de Áreas Degradadas, 2**. FUPEF, 1994. p. 569-76.

KAMI, D. Cryopreservation of Plant Genetic Resources. In: KATKOV, I. (Ed.). Current frontiers in cryobiology. **In Tech**. p.439-456, 2012.

KARLSSON, J. O. M. A theoretical model of intracellular devitrification. **Cryobiology**, v. 42, p. 154-169, 2001.

KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**. 96: 302-304, 1991.

LAMARCA, E. V.; BARBEDO, C. J. Acerca da utilização do método científico nas pesquisas com sementes florestais: o envelhecimento acelerado em sementes de ipê-roxo, um modelo descritivo. **Revista da Universidade Ibirapuera**. v. 13: p. 47-55, 2017.

LEITE, D. M., DAMASIO, J. F., MELLO, V. D. S., FERNANDES, L., KARSBURG, I. V. Determinação do número cromossômico de *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae). **REVISTA DE CIÊNCIAS AGROAMBIENTAIS**, v. 15, n. 1, 2017.

LEITE, E. J.; e MOURA, V. P. G. **Princípios e Estratégias para o melhor aproveitamento dos recursos genéticos florestais**. In: COSTA, A. M.; SPEHAR, C.

R.; SERENO, J. R. B. **Conservação de recursos genéticos no Brasil**, Brasília, DF: Embrapa, 2012. 628 p.

LOHMANN, L.G. 2015. **Bignoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB114068>>. Acesso em: 28 de

LORENZI, H.; RENZI, H. **Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, v. 1, 2008, 146p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**. v.2: p.176-177, 1962.

MAIA-SILVA, C.; SILVA, C. I.; HRNCIR, M.; QUEIROZ, R. T.; IMPERATRIZFONSECA, V. L. **Guia de Plantas Visitadas por Abelhas na Caatinga**. Editora Fundação Brasil Cidadão, Fortaleza – CE, 1ª Edição. 2012.

MEDEIROS, A. C. de S. **Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas**. Embrapa Florestas-Circular Técnica, 12p., 2003.

MEDEIROS, A. C. S. **Comportamentofisiológico, conservação degermoplasma a longo prazo eprevisão de longevidade de sementesde aroeira (Astronium urundeuva(Fr.All.) Engl.)**. Jaboticabal: Universidade Estadual de SãoPaulo, 1996. 127p. Tese (Doutorado em Agronomia).

MORAES NETO, S.P.; GOLÇALVES, J.L. de M.; ARTHUR JR, J.C.; DUCATTI, F.; AGUIRRE JR, J. H. Fertilização de mudas de espécies arbóreas nativas e exóticas. **Revista Árvore**, v.27, n.2, p.129-136, 2003.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal, FUNEP, 1994. p.49-85.

NICK, C.; SILVA, D. J. H.; MATTEDI, A. P.; PEDROSA, D. A. Conservação *ex situ* dos recursos fitogenéticos. In: PEREIRA, T. N. S. (Ed). **Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas**. **Revista Arca**, 2010, p.5987.

NICK, C.; SILVA, D. J. H.; MATTEDI, A. P.; PEDROSA, D. A. Conservação ex situ dos recursos fitogenéticos. **Revista Arca**. p.59-87, 2010.

NOGUEIRA, F.C.B.; MEDEIROS FILHO, S.; GALLÃO, M.I. Caracterização da germinação e morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Dalbergia cearenses* Ducke (pau-violeta) – Fabaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.4, p.978-985, 2010.

ODALIA-RÍMOLI, A.; ARRUDA, E. D., RÍMOLI, J., BUENO, N. R.; e COSTA, R. B. Biodiversidade, biotecnologia e conservação genética em desenvolvimento local. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, n. 1, p. 21-30, 2000.

PAIVA SOBRINHO, S.; DE FIGUEIREDO, M. C.; LUZ, P. B., NEVES, L. G.; CAMILI, E. C. Tolerância de sementes de jenipapo a crioprotetores e ao descongelamento após imersão em nitrogênio líquido. **Revista Pesquisa Florestal Brasileira**. v. 37, n. 92, p. 421-428, 2017.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. p.283-297, 2004.

RIBEIRO, J. C.; VICENS, R. S.; TOCANTINS, N.. PAISAGENS TIPOLOGICAS DO RIO ITIQUIRA NA BACIA HIDROGRÁFICA DO ALTO RIO PARAGUAI/MT: UMA ANÁLISE DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS COMO SUPORTE AO ORDENAMENTO. **Revista Ciência Geográfica**. vol. 21 (1), p.30-45, 2017.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Springer-Verlag, New York: Heiderlberg, 1995. p. 53-69.

SAKAI, A. **Development of cryopreservation techniques**. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application*. Tsukuba: JIRCAS e IPGRI, 2000, p.1-7.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12: p.70-84. 2001.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma – vegetal: criopreservação**. Brasília: Embrapa, 2010. v.1, 16p.

SANTOS, R. S. **Fronteira Agrícola, Força de Trabalho e o Processo de Urbanização em Mato Grosso**. Caminhos de Geografia, v. 13, n. 43, 2012.

SILVA, L. M. DE M.; MATA, M. E. R. M. C.; E DUARTE, M. E. M. Aspectos fisiológicos das sementes de Romã e Juá durante o armazenamento criogênico. **Engevista**. v. 18: n. 1, p. 1-10, 2016.

SILVA, L.T.S. **Morfometria, qualidade do tronco e da copa de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. em povoamento experimental no estado do Rio Grande do Sul**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 75p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia Florestal).

SILVA, M. P.; MAURO, R.; MOURÃO, G.E. e COUTINHO, M. **Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo**. Revista Brasileira de Botânica, v. 23, p.143 – 152, 2000.

SOUZA, V. C.; BRUNO, R. de L. Al.; DEANDRADE, L. A. Vigor de sementes armazenadas de ipê-amarelo *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, 2005.

STEGANI, V, ALVES G. A. C., BERTONCELLI, D. J., FARIA, R. T. DE. Cryopreservation of seeds of Brazilian edelweiss (*Sinningia leucotricha*). **Ornamental Horticulture**. v. 23: n. 1, p. 15-21, 2017.

TOWILL, L. E. Cryopreservation plant germplasm. In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). Cryopreservation of plant germplasm II. **Springer**, 2002. p. 4-21.

TRESENA, N. L.; CAVALCANTI MATA, M. E. R. M.; DUARTE, M. E. M. Determinação do teor de água limite para crioconservação das sementes de ipê amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex. DC.) Standl.). **Revista Cerne**. v.16: n.2, p.171-175, 2010.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. de. **Conservação ex situ de recursos genéticos vegetais**. In: NASS, L. L.; et al. Recursos genéticos e melhoramento - plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p. 123-147.

VASCONCELOS, C. M.; VASCONCELOS, T. L. C.; PÓVOAS, F. T. X.; SANTOS, F. E. P.; MAYNART, W. H. C.; ALMEIDA, T. G.; OLIVEIRA, J. F. S.; FRANÇA, A. D. D.; VERÍSSIMO, R. S. S.; LINS, T. H.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; BASTOS, M. L. A. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 7, p. 2673-2681. 2014.

VEIGA, R.; MOLINA, M., BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C. A criopreservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agrônômico (IAC). **O agrônômico**, v.58, n.1/2, p. 19-21, 2013.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma in vitro. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 3, n. 14, p. 18-20, 2006.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: Funep, v. 19894, p. 49-85, 1994.

WAGNER, H.; SEITZ, R. Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) – portrait of a medicinal plant from the South American rainforest. **Z Phytother**, v.19, p.226–238. 1998

WETZEL, M. V. S; REIS, R. B.; RAMOS, K. M. **Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas**. 1º edição. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (INFOTECA-E), 2003. vol. 1, 5 p.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. **Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa-CNPq, p. 297-330. 1998.

WOELDERS, H.; MATHIJS, A.; ENGEL, B. Effects of trehalose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intractness of sperm after freezing and thawing. **Cryobiology**, v.35, p.193-195, 1997.

WU, R.; CHANG, S.; HSIEH, T. et al. Cryopreservation of *Bletilla formosana* seed (Orchidaceae) by desiccation. **Scientia Horticulturae**, v.157, n.20, p.108-112, 2013.

ZELIANG, P. K.; PATTANAYAK, A. Fundamental Cryobiology and Basic Physical, Thermodynamical and Chemical Aspects of Plant Tissue Cryopreservation. In: ABDURAKMONOV, I. **Plant Breeding**. p. 41-56, 2012.