



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1379(Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



Giovana Esteves

Influência da Temperatura de Armazenamento na Viabilidade de Sementes de *Bowdichia*
Virgilioides Kunth

Alfenas/MG

2019

Giovana Esteves

Influência da Temperatura de Armazenamento na Viabilidade de Sementes de *Bowdichia*
Virgilioides Kunth

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas -UNIFAL-MG. Área de concentração: Tecnologia Aplicada
Orientador: Prof. Dr. Breno Régis Santos
Colaboradores: Marinês Ferreira Pires Lira, Gabriel Chiari, Gisele de Fátima Esteves

Alfenas/MG

2019



GIOVANA ESTEVES

“Influência da Temperatura de Armazenamento na Viabilidade de Sementes de *Bowdichia Virgilioides Kunth*”.

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2019.

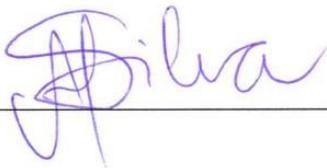
Prof. Dr. Breno Régis Santos
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva
Instituição: UNIFENAS

Assinatura: 

*Aos meus familiares e
amigos que estiveram sempre ao
meu lado.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por iluminar meu caminho me dando forças para seguir sempre em frente.

A minha família pelo amor incondicional e apoio, nada disso seria possível sem os valores que me foram impressos desde a infância para perseverar e cumprir com meus deveres e responsabilidades.

Aos meus colaboradores, agradeço pelas inúmeras horas de trabalho no laboratório, tornando mais fácil e divertida a construção deste trabalho.

Aos meus queridíssimos amigos: Mariana Azevedo, Gabriel Augusto, Gabriel Chiari, Leticia Bressanin, Brena Gomes, (eterno lado leste da Biotecnologia 2013) vocês estarão sempre no meu coração. Agradeço a cada dia por ter conhecido vocês, em meio as alegrias e desesperos sempre juntos desde a graduação. Uma amizade que o tempo e a distância não mudam.

Aos amigos anteriores a graduação por sempre acreditarem na minha capacidade de atingir meus objetivos, pelo incentivo e carinho, vocês foram indispensáveis para a caminhada até aqui.

Agradeço imensamente ao meu querido orientador Breno Régis Santos que é a melhor pessoa para se conversar quando tudo parece perdido. São de pessoas como você, que veem o melhor da vida, que precisamos ao nosso lado. Muito obrigada pelos conselhos ensinamentos e principalmente por me incentivar a continuar sempre.

Aos colegas de laboratório que trazem para o dia a dia a alegria de fazer pesquisa mesmo com os percalços.

Ao programa de pós-graduação PPGCA pela oportunidade, à agência de fomentos CAPES pelo financiamento.

Por fim a todos que de forma direta ou indireta ajudaram nesta caminhada meu agradecimento.

Obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Frente as mudanças climáticas e grande intervenção antrópica, torna-se cada vez mais relevante a busca por formas de conservação das espécies vegetais. A *Bowdichia virgilioides* Kunth, popularmente conhecida como sucupira preta, é uma espécie arbórea de grande porte, com ampla dispersão no Brasil, especialmente no Cerrado. A intensificação de seu uso comercial, aliado a baixa propagação natural devido ao fato de suas sementes possuírem dormência tegumentar, permitiu sua inserção na Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012, indicando sua ameaça de extinção. Neste contexto, tornam-se necessários maiores estudos de conservação do germoplasma da espécie. Uma das alternativas de conservação de germoplasma é a criopreservação, onde o material biológico é submetido a ultrabaixas temperaturas (-196 °C) estagnando seu metabolismo por tempo indeterminado. Neste projeto buscou-se estabelecer um protocolo de criopreservação para sementes de *B. virgilioides*, bem como averiguar a influência da temperatura de armazenamento na viabilidade de suas sementes. Foram testadas diferentes temperaturas de armazenamento das sementes (temperatura ambiente (25 °C), geladeira (10 °C), congelador (-20 °C), freezer (-80 °C) e nitrogênio líquido (-196 °C) pelo período de 32 semanas. Foi criado um protocolo eficiente de criopreservação para a espécie sem o uso de crioprotetores o que torna economicamente mais vantajoso o processo. Além de verificar que de forma geral durante o período de 32 semanas a viabilidade das sementes não é afetada pelas diferentes temperaturas de armazenamento.

Palavras chave: Sucupira preta. Fabaceae. Germoplasma. Criopreservação.

ABSTRACT

Facing of climate change and major anthropogenic intervention, the search for conservation forms of plant species becomes increasingly relevant. *Bowdichia virgilioides* Kunth is a large tree species with wide dispersion in Brazil, especially in the Cerrado. The intensification of its commercial use, coupled with low natural propagation because its seeds have tegumentary dormancy, allowed its inclusion in the Red List of Brazilian flora version 2012, indicating its threat of extinction. In this context, further studies on the conservation of germplasm of the species are required. One of the germplasm conservation alternatives is cryopreservation, where the biological material is subjected to ultra-low temperatures (-196°C) stagnating its metabolism indefinitely. In this project, we sought to establish a cryopreservation protocol for *B. virgilioides* seeds, as well as to investigate the influence of storage temperature on the viability of their seeds. Seed storage temperatures (25 ° C), refrigerator (10 ° C), freezer (-20 ° C), freezer (-80 ° C) and liquid nitrogen (-196 ° C) were tested for a 32-week period. An efficient cryopreservation protocol for the species has been created without the use of cryoprotectants, which makes the process economically more advantageous. In addition to verifying that in general during the period of 32 weeks the viability of the seeds is not affected by the different storage temperatures.

Keywords: *Bowdichia virgilioides*; Fabaceae; germplasm; cryopreservation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CV_t	- Coeficiente de Variação do Tempo de Germinação
F₀	- Fluorescência inicial
F_M	- Fluorescência máxima
F_V/F_M	- Eficiência quântica potencial
G	- Germinação
GU%	- Grau de umidade
IVG	- Índice de Velocidade de Germinação
MDA	- Malondialdeído
MR	- Taxa de Germinação
MT	- Tempo de germinação
°C	- Graus Celsius
PSII	- Fotossistema II
PVPP	- Polivinil polipirrolidona
TBA	- Ácido tiobarbitúrico
TBARS	- Ácido tiobarbitúrico
TCA	- Ácido tricloroacético
U	- Incerteza do processo de germinação
Z	- Sincronia do processo de germinação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	<i>BOWDICHIA VIRGILIOIDES</i> KUNTH.....	12
2.2	CRIOPRESERVAÇÃO.....	14
2.3	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	16
3	JUSTIFICATIVA.....	17
4	OBJETIVOS.....	18
4.1	OBJETIVOS GERAIS	18
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
	REFERÊNCIAS	18
	APÊNDICE.....	22
	RESUMO.....	23
	INTRODUÇÃO	23
	MATERIAL E MÉTODOS	24
	MATERIAL VEGETAL E CARACTERIZAÇÃO DO LOTE DE SEMENTES.....	24
	CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E VIABILIDADE DAS SEMENTES	24
	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	25
	FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA	25
	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
	RESULTADOS.....	26
	MATERIAL VEGETAL E CARACTERIZAÇÃO DO LOTE DE SEMENTES	26
	CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E VIABILIDADE DAS SEMENTES	26
	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	27
	FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA	27
	DISCUSSÃO.....	28
	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

Alguns ecossistemas têm enfrentado fortes pressões antropogênicas, provocando erosão e perda de diversidade genética. Assim, a conservação dos recursos genéticos é uma prioridade estabelecida e reconhecida em nível mundial (LOPES et al. 2013). Para espécies exploradas comercialmente e com dificuldades de propagação como a sucupira preta, a preocupação quanto à conservação de seu germoplasma, material genético que constitui a base física da herança sendo transmitida de uma geração para outra, se torna ainda maior.

A *Bowdichia virgilioides* Kunth, popularmente conhecida como sucupira preta, é uma espécie arbórea de grande porte, com ampla dispersão no Brasil, especialmente no Cerrado. Pertencente à família Fabaceae, a espécie possui uma madeira resistente, sendo por isso muito empregada na construção civil (DELANHOL et al. 2014). Além disso, na medicina popular a espécie possui indicações para o tratamento de reumatismo, artrite, doenças de pele e como agente antidiabético e anti-inflamatório (SMIDERLE; SOUSA, 2003; ALBUQUERQUE et al. 2007). A intensificação de seu uso comercial e medicinal, aliado à sua baixa propagação natural devido dormência tegumentar de suas sementes, levou à sua inserção na lista vermelha da flora brasileira versão 2012, indicando a ameaça de extinção (CNCFlora, 2012).

A conservação de sementes apresenta diversas vantagens, e o armazenamento correto desacelera o seu processo de deterioração. Segundo Popinigis (1977), geralmente a longevidade é aumentada conservando-se a semente com baixo teor de umidade e em baixas temperaturas. Neste sentido, a criopreservação de sementes pode ser uma forma mais adequada de conservar a biodiversidade das espécies das regiões florestais e subtropicais, por longos períodos. Na criopreservação, o material biológico é submetido a baixas temperaturas (-196 °C) estagnando seu metabolismo por tempo indeterminado (CARVALHO; VIDAL, 2003).

Diante a ampla utilização de *B. virgilioides*, bem como ameaça de extinção faz-se importante estudos da conservação do germoplasma da espécie. Por meio deste trabalho foi realizado o estudo sobre o comportamento das sementes submetidas a diferentes condições de temperatura de armazenamento e do estabelecimento de protocolo de criopreservação visando à conservação da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Bowdichia virgilioides* Kunth

Pertencente à família Fabaceae e subfamília Faboideae (LIMA, et al. 2015), *Bowdichia virgilioides* Kunth é popularmente conhecida como sucupira preta, sucupira-parda, sucupira-roxa, sucupira do cerrado, sucupira do campo, angelim amargoso, coração de negro e paricarana (DELANHOL et al. 2014). Trata-se de uma espécie arbórea de grande porte, decídua, heliófita, anemocórica, com ampla dispersão pelo Brasil, principalmente no Cerrado. Além disso, de acordo com Campos Filho e Santoralli, (2016) é considerada pioneira, sua altura varia de 8 a 20 metros, com diâmetro entre 30 a 50 cm, e está bem adaptada a terrenos secos, pobres e sujeitos a passagem de fogo, ao qual possui capacidade de resistência (Figura 1). Esta leguminosa apresenta sementes classificadas como ortodoxas, que são dispersas com grau de umidade entre 8,7% a 10,0% (CARVALHO et al. 2006; CRUZ et al. 2012; MOURA et al. 2014; DELANHOL et al. 2014; FERREIRA et al. 2015).

Figura 1- Espécime de *B. virgilioides*



Fonte: a autora

Os frutos de *B. virgilioides* (Figura 2) são indeiscentes, achatados e com sementes que medem cerca de 3 a 5 mm, com colorações distintas variando de tons castanhos escuros a avermelhados e ferrugíneos, podendo acontecer dentro do mesmo fruto (SMIDERLE; SCHWENGBER, 2011). Além disso, as sementes possuem dormência tegumentar por serem impermeáveis à entrada de água, dificultando sua germinação e a propagação da espécie. Desta forma, estudos que analisam o potencial de germinação e crescimento inicial sob diferentes

substratos, temperaturas e luminosidades já foram realizados, obtendo resultados positivos (CRUZ et al. 2012). A germinação pode variar de 45% a 88% com superação da dormência, e de 0% a 2,1%, sem tratamentos pré-germinativos (CARVALHO 2006; RIBEIRO-OLIVEIRA et al. 2013; DELANHOL et al. 2014).

Figura 2 - Sementes de sucupira preta sobre papel milimetrado



Fonte: a autora

De acordo com Lorenzi et al. (1992) e Delanhol et al. (2014) por ter naturalmente alta densidade, resistência ao ataque de organismos xilófagos e longa durabilidade sua madeira é muito empregada na construção civil e na fabricação de móveis. Sua madeira estriada e pesada, de cerne pardo escuro é empregada como dormentes, postes, cercas, embarcações e móveis de luxo. Além disso, *B. virgilioides* tem sido usada também em trabalhos de reflorestamento e/ou recuperação de áreas degradadas e apresenta comportamento de espécie colonizadora (RIBEIRO-OLIVEIRA et al. 2013; MOURA et al. 2014; ARANTES et al. 2015). Tal característica a levou a ser inserida no Guia de identificação de espécies chaves para restauração florestal na região do Mato Grosso (FILHO; SARTORELLI, 2016), como também está presente no Guia de árvores para restauração do Oeste da Bahia (LIMA, et al. 2013). Segundo Montahim et al. (2014), a espécie também pode ser utilizada como planta paisagística, e Silva, Aguiar e Rodrigues (2001) citam suas propriedades apícolas.

Segundo Bourdy et al. (2000), *B. virgilioides* apresenta propriedades medicinais sendo utilizada por comunidades indígenas no tratamento de disenteria, malária e até leishmaniose.

Na medicina popular, suas sementes são utilizadas no tratamento de reumatismo, artrite e doenças de pele e a sua casca é aproveitada como um agente antidiabético e anti-inflamatório de uso tópico e a infusão da entrecasca é utilizada para tratamento tópico de inflamações (SMIDERLE e SOUSA, 2003; ALBUQUERQUE et al. 2007). Por estas razões, a espécie foi incluída na primeira edição da farmacopeia brasileira (BRANDÃO et al. 2006). Quanto ao conteúdo de metabólitos secundários, Almeida et al. (2006) demonstraram que o óleo essencial extraído de folhas de *B. virgilioides* apresentou atividade antimicrobiana contra vários microrganismos patogênicos. Estudos químicos revelaram a presença de alcaloides, terpenoides e derivados de benzofurano nas cascas do caule, constituintes voláteis, óleos essenciais, flavonoides e isoflavonoides nas raízes taninos na região da entrecasca e em folhas, geraniol, cariofileno e antocianinas em frutos (JORGE-NETO et al. 1970 ARRIAGA et al. 1998; VELOZO et al. 1999; ARRIAGA et al. 2000; BARBOSA-FILHO et al. 2004; THOMAZZI et al. 2010).

Apesar de possuir ampla distribuição no Brasil, *B. virgilioides* possui baixa densidade populacional e com maior ocorrência no Cerrado, um bioma que ocupa 23% do território nacional, dos quais 55% já foram desmatados ou transformados pela ação humana (MACHADO et al. 2004). Em função da riqueza biológica e da alta pressão antrópica a que vem sendo submetido, o Cerrado é considerado um dos Hotspots mundiais, ou seja, considerado uma área crítica para conservação (Conservation International, 2009). O risco de extinção, aliado a grande importância da espécie para o setor de construção civil, recuperação de áreas degradadas e potencial medicinal tornam a *B. virgilioides* um exemplar para pesquisas de conservação de germoplasma e melhoramento vegetal.

2.2 Criopreservação

O armazenamento de sementes é o método tradicional para preservação de germoplasmas, uma vez que as sementes são a forma pela qual uma planta sobrevive por mais tempo fazendo uso do mínimo de atividade fisiológica possível (WETZEL et al. 2003). Além disso, sementes são a forma mais comum de conservação *ex situ*, por ser a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (VEIGA et al. 2006), requerem pequenos espaços para armazenamento.

Para armazenamento em longo prazo, destaca-se a criopreservação, definida como uma técnica de conservação de material biológico em temperaturas ultrabaixas, usualmente em nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor a -150°C (ENGELMANN, 2011). Em tais condições, todas as divisões celulares e processos metabólicos são interrompidos. De modo que o material vegetal pode ser armazenado durante um período de tempo teoricamente ilimitado sem sofrer modificações. Outra vantagem é que o armazenamento dessas culturas ocupa um pequeno volume, fica protegido de contaminação e exige pouca manutenção.

A criopreservação de sementes é mais adequada para fins de conservação de uma espécie, por serem sistemas mais organizados (SILVA et al. 2011). Contudo, segundo Panis et al. (2005) para o sucesso da criopreservação não é preciso que haja uma elevada tolerância ao congelamento, mas sim a tolerância à desidratação e sua indução. O elevado teor de água intracelular pode resultar na formação de cristais de gelo, e assim causar danos irreversíveis as células. A formação de gelo causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semipermeabilidade e da compartimentalização celular, levando à morte celular. Assim, a água precisa ser removida antes do congelamento, para evitar as injúrias (ENGELMANN et al. 2011).

Dentre as técnicas de criopreservação, destaca-se a vitrificação. Nesta técnica, ocorre a passagem de água diretamente da fase líquida para a fase amorfa ou de vidro (NOGUEIRA, 2010). Esse tipo de formação pode ser obtida por meio da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não exista água livre para a cristalização antes de mergulhá-lo em nitrogênio líquido. Essa desidratação pode ser obtida por evaporação da água ou por tratamento com soluções concentradas de crioprotetores químicos (SANTOS, 2000). As vantagens da criopreservação estão associadas principalmente a conservação da integridade genética, o pequeno espaço necessário para a instalação do banco de germoplasma, além do baixo custo associado ao armazenamento dos materiais biológicos e a proteção contra a contaminação (ALMEIDA et al. 2002; ENGELMANN, 2011).

2.3 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é uma cascata de eventos bioquímicos que ocorrem devido a ação de radicais livres sobre lipídeos insaturados das membranas celulares que desencadeiam uma sequência de lesões na célula. Estas reações levam a formação principalmente de radical alquila, alcóxila e peróxila destruindo a estrutura das membranas. (LIMA; CARDOSO, 2015).

As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA e comprometimento dos componentes da matriz extracelular: proteoglicanos, colágeno e elastina levando assim a morte celular (BARREIROS; DAVID,2006).

Geralmente, baixos teores de água nas sementes aliados as baixas temperaturas do ar do ambiente de armazenamento proporcionam prolongamento do período de viabilidade das mesmas. Entretanto, a insuficiência de dados sobre conservação em longo prazo dificulta o entendimento do processo de deterioração sob tais condições ((MARCOS-FILHO, 2005). Os sintomas fisiológicos mais evidentes da deterioração das sementes podem ser observados durante a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas. Outra manifestação da deterioração durante o armazenamento tem sido a desestruturação do sistema de membranas, como consequência do ataque aos seus constituintes químicos pelos radicais livres (JOSÉ et al. 2010).

A instabilidade química dos lipídios constitui um dos fatores preponderantes para a queda do desempenho das sementes de várias espécies. Assim, torna-se útil a realização de testes que avaliem o desenvolvimento da plântula, a integridade estrutural das membranas, bem como a ocorrência de peroxidação lipídica, em sementes armazenadas em temperaturas subzero, com diferentes teores de água (JOSÉ et al. 2010).

3 JUSTIFICATIVA

Ainda existem dúvidas a respeito da eficiência dos protocolos de criopreservação, principalmente quanto ao tempo necessário de congelamento durante os testes para assegurar a eficácia do protocolo. *B. virgilioides* foi escolhida para o estudo da influência da temperatura no armazenamento de sementes por estar presente na Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012 (CNCFlora, 2012) apresentar dificuldade de dispersão uma vez que suas sementes possuem dormência tegumentar.

A espécie é muito explorada economicamente para produção de madeira como, por exemplo, a exploração autorizada da espécie no Estado do Mato Grosso, que rendeu, entre 2006 e 2011, R\$3.155.630,62, cerca de 80.227,79 m³ de madeira (SEMA-MT, 2011). Além disso, também é utilizada na medicina popular no tratamento de reumatismo, artrite, doenças de pele e como agente antidiabético e anti-inflamatório. Uma vez que as sementes são a forma mais comum de conservação *ex situ*, e devido a limitações no processo de formação de mudas por meio da ocorrência de dormência tegumentar (ALBUQUERQUE, et al. 2007), justificam-se os esforços para o estabelecimento de uma forma eficiente de conservação do germoplasma da espécie garantindo assim a continuidade da espécie.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivos Gerais

Verificar a influência de diferentes temperaturas de armazenamento na viabilidade de sementes de sucupira preta.

4.2. Objetivos Específicos

- Obtenção de um protocolo eficiente de criopreservação;
- Teste de conservação de sementes em diferentes temperaturas;

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, K. S. et al. C. S. Métodos para a superação da dormência em sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1716-1721, 2007.

ALMEIDA, F. A.C. et al. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v.6, n.2, p.295-302, 2002.

ALMEIDA, J. R. G. D. S. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 638-641, 2006.

ARANTES, C. S. et al. Ação facilitadora de *Bowdichia virgilioides* kunth. (Fabaceae) na colonização de espécies em uma área de cerrado sentido restrito. **Caminhos de Geografia**. 16, n. 53, 2015.

ARRIAGA A. M.; GOMES G.A.; BRAZ-FILHO R. Constituents of *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 211-212, 2000.

ARRIAGA, A. M. C. et al. Volatile constituents from roots of *Bowdichia virgilioides*, Kunth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 205-206, 1998.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 6, p. 11-17, 2004.

BARREIROS, A.; DAVID, J. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração De Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Revista Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.

BOURDY, G. et al. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 2, p. 87-109, 2000.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.

CAMPOS FILHO, E. M.; SANTORALLI, P. A. R. Guia de identificação de espécies-chave para restauração florestal na região do Alto Pires, Mato Grosso. **São Paulo: The Nature Conservancy**, 248p. 2016.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, v. 1, 2003.

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

CENTRO NACIONAL DA CONSERVAÇÃO DA FLORA (CNCFlora). *Bowdichia virgilioides* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Bowdichia virgilioides](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Bowdichia_virgilioides)>. Acesso em 20 agost. 2018.

CONSERVATION INTERNATIONAL. Biodiversity hotspots: cerrado. Arlington, 2010. Disponível em:<<http://www.biodiversityhotspots.org/xp/hotspots/cerrado/Pages/default.asp>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

CRUZ, A. F. et al. Métodos para análise de sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth. **Scientia Forestalis**. Piracicaba, v. 40, n. 93, p. 077-084, mar. 2012.

DALANHOL, S. J., REZENDE, E. H., ABREU, D. C. A. D., & NOGUEIRA, A. C. Teste de condutividade elétrica em sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth. **Flora**, v. 21, n. 1, p. 69-77, 2014.

SILVA, R. C. et al. Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão-mansão originadas de germoplasma criopreservado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 836-844, 2011.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

FERREIRA, C. S. et al. Anatomia da lâmina foliar de onze espécies lenhosas dominantes nas savanas de Roraima. **Acta Amazônica**. v. 45, n. 4, p. 337-346, 2015.

JORGE-NETO J. Pharmacognostic study of essential oil of sucupira, *Bowdichia virgilioides*. **Ver Fac Farm Odontol** Araraquara, v. 4, p. 203-204, 1970.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Armazenamento de sementes de girassol em temperaturas subzero: Aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, p.29-38, 2010.

LARCHER, W. Ecofisiologia Vegetal. São Carlos, **São Paulo**. Editora Rima, 531p. 2000.

LIMA-JUNIOR, E.C. et al. Trocas gasosas, características das folhas e crescimento de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p.1092-1097, 2005.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, H.C.; CARDOSO, D. B. O. S. *Bowdichia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29489>>. Acesso em 12 dez.2018

LIMA, R.A.F. et al. Guia de árvores para restauração do Oeste da Bahia. **The Nature Conservancy**. Edição nº 01, 206p. 2013.

LOPES, K. P. et al. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 17, n. 3, 2013

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa**: Ed. Plantarium. p. 195, 1992.

MACHADO, R. B. Estimativa de perda da área do Cerrado brasileiro. 2004.

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ, v.12, 495p. 2005.

MONTANHIM, G. C. et al. Uso de biomassa de algas para a peletização de sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.38, n.5, p.867-877, 2014.

MOURA, L. C., TITON, M., FERNANDES, J. S. C., & SANTANA, R. C. Germinação in vitro e aclimação de plântulas de Sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth). **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 678-687, Oct./2014.

NOGUEIRA, G F. **Criopreservação e produção de sementes sintéticas in vitro de mangabeira**. 2010.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Amsterdam, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.

POPINIGIS, F. Fisiologia da Semente. Brasília : **Agiplan**, 297p. 1977.

RIBEIRO-OLIVEIRA, J. P. et al. A amplitude amostral interfere nas medidas de germinação de *Bowdichia virgilioides* Kunth?. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 23, n. 4, p. 623-634, out.-dez., 2013.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Edição especial v. 12, p. 7084, dez. 2000.

SEMA-MT. Extração e Comércio de Toras de Madeira Nativa. Período 2006-2011., 2011.

SILVA, L. M. M.; AGUIAR, I. B.; RODRIGUES, T. J. D. Seed germination of *Bowdichia virgilioides* Kunth, under water stress. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.1, p.115-118, 2001.

SMIDERLE, O. J.; SCHWENGBER, L. A. M. Superação da dormência em sementes de Paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, n. 3 p. 407 - 414, 2011.

SMIDERLE, O. J.; SOUSA, R. C. P. Dormência em sementes de Paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth – Fabaceae – Palilionidade). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 25, n. 1, p.72-75, 2003.

THOMAZZI S.M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 451-456 ,2010.

VEIGA, R. F. R. et al. A criopreservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agrônomico. **O Agrônomico**, v.5, p.19-21, 2006.

VELOZO L.S. et al. Constituents from the roots of *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia**, v. 70, n. 5, p. 532-535, 1999.

WETZEL, MVS; REIS, R. B.; RAMOS, K. M. Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica**, 2003.

APÊNDICE

ARTIGO: Temperatura de Armazenamento e Viabilidade de Sementes de *Bowdichia Virgilioides* Kunth

RESUMO

Frente a devastação ambiental torna-se cada vez mais importante a busca por formas de conservação de espécies vegetais, principalmente daquelas que já se encontram em risco de extinção, como por exemplo a sucupira preta, uma espécie arbórea de grande porte, que apresenta características de espécie pioneira, sendo assim utilizada em áreas de reflorestamento, além do seu uso no setor madeireiro e construção civil. Visando a conservação do germoplasma da espécie, sementes de sucupira preta foram armazenadas durante 32 semanas sob diferentes temperaturas (25 °C, 10 °C, -20 °C, -80 °C e -196 °C), as sementes foram escarificadas e testadas quanto a parâmetros de germinação, peroxidação lipídica e fluorescência da clorofila “a”. Como resultado, obteve-se um protocolo eficiente de criopreservação sem a utilização de crioprotetores, o que torna a técnica mais econômica. E ainda não foram verificadas diferenças significativas na viabilidade das sementes armazenadas em diferentes temperaturas.

Palavras chaves: sucupira preta, criopreservação, reflorestamento, Fabaceae

INTRODUÇÃO

Bowdichia virgilioides Kunth é uma espécie arbórea nativa do Cerrado, pertencente à família Fabaceae e conhecida popularmente como sucupira preta (LIMA, et al., 2015). Com altura média de 8 a 20 metros, esta espécie é considerada pioneira sob o ponto de vista ecológico, além de estar bem adaptada a terrenos pobres, secos e sujeitos queimadas, típicos do Cerrado (ARANTES et al., 2015; FILHO & SARTORELLI, 2016). Seus frutos são indeiscentes e achatados, com sementes ortodoxas, que medem cerca de 3 a 5 mm, e que apresentam dormência tegumentar o que dificulta sua propagação em ambiente natural (SMIDERLE & SCHWENGBER, 2011).

Na medicina popular, *B. virgilioides* é utilizada no tratamento de reumatismo, artrite, doenças de pele, anti-inflamatório e como agente antidiabético (SMIDERLE & SOUSA, 2003; ALBUQUERQUE et al., 2007). Além disso, a espécie é bastante resistente e, por isso, bastante recomendada para programas de reflorestamento e/ou recuperação de áreas degradadas (LIMA, et al., 2013; MOURA et al., 2014; FILHO & SARTORELLI, 2016). Contudo, a intensificação de sua exploração medicinal e comercial, aliada à sua baixa taxa de propagação em ambiente

natural, reduziram suas populações a níveis críticos, o que levou a sua inserção na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (CNCFlora, 2012).

Diante do exposto, a criopreservação de sementes pode servir como alternativa para conservação de germoplasmas de *B. virgilioides* em temperaturas ultrabaixas por longos períodos de tempo, assegurando sua estabilidade genética e alta qualidade fisiológica das sementes (ENGELMANN, 2011). Contudo, estudos sobre o comportamento fisiológico de sementes de *B. virgilioides* em diferentes temperaturas ao longo do tempo são insipientes. Em bancos de sementes tradicionais, as sementes geralmente são mantidas a uma temperatura de 10 °C e umidade relativa do ar de 40% por cerca de 2 anos (GOLDFARB et al., 2008). Entretanto, esse tipo de armazenamento não evita a erosão genética das espécies ao longo do tempo, justificando o uso de bancos criogênicos para a conservação das espécies vegetais nativas do Cerrado ameaçadas de extinção como *B. virgilioides* (GONZAGA et al., 2003).

Visando otimizar as técnicas de conservação de sementes das espécies nativas do Cerrado, este estudo busca uma alternativa mais eficiente do que a conservação em bancos de sementes tradicionais, e de baixo custo, para conservação do germoplasma de *B. virgilioides*, avaliando a influência da temperatura no armazenamento de suas sementes, além do estabelecimento de um protocolo de criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e caracterização do lote de sementes

Sementes de *B. virgilioides* Kunth foram coletadas na região de Bom Despacho – MG no mês de dezembro de 2017, acondicionadas em sacos de papel, e conduzidas ao laboratório para início dos experimentos. A retirada das sementes das vagens foi realizada manualmente, seguido do cálculo do número de sementes por quilo de amostra e do grau de umidade (GU%) das sementes de acordo com a Regra de Análise de Sementes, utilizando-se 4 repetições de 25 sementes (BRASIL, 2009).

Condições de armazenamento e Viabilidade das sementes

A fim de avaliar as melhores condições de armazenamento, as sementes foram mantidas em 5 diferentes temperaturas: temperatura ambiente (25 °C), geladeira (10 °C), congelador (-20 °C), ultra freezer (-80 °C) e em nitrogênio líquido (-196 °C), durante 1, 2, 4, 8, 16 e 32 semanas. Posteriormente, todas as sementes foram submetidas a imersão em banho-maria à 37 °C durante

3 minutos, seguido de escarificação por imersão em ácido sulfúrico concentrado durante 10 minutos para superação da dormência. Em seguida foram avaliados o percentual de germinação (G%), a sincronia do processo de germinação (Z), a incerteza do processo de germinação (U) e o índice de velocidade de germinação (IVG) (RANAL et al., 2009). Além dos parâmetros germinativos, foram avaliados a massa fresca (MF) e seca (MS) das plântulas, comprimento de raiz (CR) e da parte aérea (PA) aos 21 dias de cultivo. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 5 condições de temperatura e 6 seis períodos de armazenamento.

Peroxidação lipídica

O estresse oxidativo das sementes durante as condições de armazenamento foi avaliado por meio da quantificação do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como produtos finais do processo de peroxidação lipídica. Para isso, amostras de 0,2 g de plântulas foram maceradas com polivinil poliporilidona (PVPP) e adicionados 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. Após homogeneização, o extrato foi transferido para tubos eppendorfs e centrifugados a 10.000 rpm durante 15 minutos. Do sobrenadante foi retirado 375 μ L e adicionados 750 μ L de TCA (10%) contendo 5% de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi deixada em banho-maria a 95 °C durante 30 minutos e resfriada em gelo por 10 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. O teor de malondialdeído foi calculado conforme Shimizu et al. (2006), para cada condição de armazenamento avaliada.

Fluorescência da clorofila

A análise de fluorescência da clorofila “a” foi realizada com auxílio de um fluorímetro de imagem (modelo Fluorcam, Photon Systems Instruments), medindo-se os valores de F_0 (Fluorescência inicial), F_M (Fluorescência máxima) e F_v/F_M (eficiência quântica potencial) do Fotossistema II (PSII). As medidas foram realizadas entre 9 e 11 horas da manhã, após um período de adaptação das folhas de 20 minutos no escuro, para cada condição de armazenamento avaliada.

Análise estatística

A análise de variância e comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey com 5% de significância. Para normalização dos dados de germinação realizou-se a transformação.

RESULTADOS

Material vegetal e caracterização do lote de sementes

A caracterização do lote de sementes de *B. virgilioides* antes do armazenamento resultou em aproximadamente 52.000 sementes por quilo. O grau de umidade encontrado nas sementes antes do armazenamento foi de 9,25% e 9,92% para sementes escarificadas e não escarificadas, respectivamente (dados não mostrados).

Condições de armazenamento e Viabilidade das sementes

Não houve interação significativa entre o tempo e as diferentes temperaturas de armazenamento de sementes de *B. virgilioides*. Avaliado a temperatura de armazenamento, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o percentual de germinação (G%) e os demais testes de vigor de sementes de *B. virgilioides* armazenadas em diferentes temperaturas, alcançando valores acima de 67% de germinação em todas as condições de armazenamento testadas (Tabela 1). Exceto o comprimento da parte aérea onde essa é mais desenvolvida na temperatura de -20 °C.

Tabela 1: Parâmetros de germinação e desenvolvimento avaliados para sementes armazenadas em diferentes temperaturas

Temp.	G	%	U	Z	IVG	Peso	CPA	CR
25 °C	1,0439 ^a	67,33	2,2845 ^a	0,1999 ^a	2,9406 ^a	0,0929 ^a	10.613 ^a	66.856 ^{ab}
10 °C	1,0159 ^a	71,83	2,3373 ^a	0,1838 ^a	2,9758 ^a	0,0904 ^a	10.735 ^a	66.961 ^{ab}
-20 °C	1,0913 ^a	78,16	2,2934 ^a	0,1945 ^a	3,3538 ^a	0,0888 ^a	11.717 ^a	70.298 ^a
-80 °C	1,0825 ^a	77,00	2,1818 ^a	0,2228 ^a	3,2520 ^a	0,0903 ^a	10.683 ^a	59.161 ^b
-196 °C	1,0502 ^a	70,33	2,3400 ^a	0,2000 ^a	3,0048 ^a	0,0820 ^a	10.258 ^a	63.516 ^{ab}

Com relação aos diferentes tempos de armazenamento, a germinação se mantém ao longo do tempo, entretanto com 8 semanas de armazenamento o tempo de germinação tem uma queda na incerteza e no comprimento de raiz, aumento de sincronia, IVG, peso e comprimento de parte aérea (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros de germinação e desenvolvimento avaliados para sementes armazenadas durante 32 semanas

Tempo	G	%	U	Z	IVG	Peso	CPA	CR
1 sem	1,1150 ^a	80,00	2,3713 ^{bc}	0,1961 ^{ab}	3,3100 ^b	0,0851 ^b	9.784965 ^{bc}	84.421 ^a
2 sem	1,0602 ^a	70,40	2,5129 ^{ab}	0,1648 ^{bc}	2,7860 ^{bc}	0,0824 ^b	11.31373 ^b	65.355 ^{bc}
4 sem	1,0207 ^a	70,60	2,0264 ^d	0,2456 ^a	2,7897 ^{bc}	0,0851 ^b	11.5615 ^b	71.929 ^b
8 sem	1,1003 ^a	78,20	2,0396 ^d	0,2510 ^a	4,3148 ^a	0,1124 ^a	13.94387 ^a	62.200 ^c
16 sem	1,0628 ^a	71,40	2,1240 ^{cd}	0,2128 ^{ab}	2,7816 ^{bc}	0,0875 ^b	10.05503 ^{bc}	63.970 ^{bc}
32 sem	0,9816 ^a	67,00	2,6504 ^a	0,1308 ^c	2,6503 ^c	0,0807 ^b	8.15202 ^c	44.274 ^d

Peroxidação lipídica

O teste bioquímico de peroxidação lipídica que mostra diretamente o estresse sofrido pela plântula demonstra que ocorreu sim um estresse oxidativo, além disso de acordo com a estatística há uma interação entre tempo de armazenamento e a temperatura cujos valores podem ser vistos na tabela 3 onde observamos que os maiores níveis de peroxidação ocorreram com 2 semanas de armazenamento para as temperaturas de 10, -20, -80 e -196°C

Entretanto podemos observar que o menor nível de peroxidação pode ser notado na temperatura de -196°C após 32 semanas de armazenamento.

Tabela 3: Peroxidação avaliada em plântulas advindas de sementes armazenadas em diferentes temperaturas durante 32 semanas

Tempo	Temperatura				
	25°C	10°C	-20°C	-80°C	-196°C
1 sem	46732,61 ^{cA}	102787,00 ^{bBC}	160028,30 ^{aB}	159043,50 ^{aB}	136555,90 ^{aB}
2 sem	93002,17 ^{aC}	75369,57 ^{abA}	70858,70 ^{abA}	61706,52 ^{abA}	54184,78 ^{ba}
4 sem	25030,43 ^{bb}	81086,96 ^{aAB}	92376,09 ^{aB}	91270,53 ^{aCD}	80063,18 ^{aBC}
8 sem	131673,90 ^{aC}	60074,88 ^{bcC}	88747,28 ^{bc}	53847,83 ^{ce}	29760,87 ^{cC}
16 sem	43739,13 ^{cC}	49684,78 ^{bcAB}	68260,87 ^{abcB}	95467,39 ^{aBC}	77478,26 ^{abB}
32 sem	30847,83 ^{aC}	33271,74 ^{aBC}	30173,91 ^{aB}	26532,61 ^{aDE}	30000,00 ^{aC}

Fluorescência da clorofila

Para os estudos de fluorescência da clorofila “a”, observa-se que após 32 semanas há uma queda apenas na fluorescência máxima quando comparada as plantas não armazenadas, mas a queda ocorre independentemente da temperatura de armazenamento (tabela 4).

Já para os parâmetros de fluorescência inicial e potencial fotossintético não ha variação.

Tabela 4: Análise de fluorescência da clorofila “a” de plântulas advindas de sementes armazenadas em diferentes temperaturas durante 32 semanas comparadas com sementes não armazenadas

Temperatura	Parâmetros analisados		
	F ₀	F _M	F _v /F _M
25°C	143,01	656,00 ^b	0,78
10°C	140,13	651,12 ^b	0,79
-20°C	140,04	610,45 ^b	0,77
-80°C	144,73	674,15 ^b	0,79
-196°C	139,87	660,48 ^b	0,79
Não armazenadas	158,71	764,19 ^a	0,79

DISCUSSÃO

O número de sementes encontrado para um quilo de sementes corrobora com dados da literatura para a espécie, que indicam valores em torno de 49.300 sementes por quilo (ALBUQUERQUE et al., 2007). A umidade relativamente baixa está de acordo com os resultados observados em sementes de *B. virgilioides*, que é considerada uma espécie ortodoxa (ALBUQUERQUE et al., 2007). Os resultados de grau de umidade indicam que a escarificação não afetou o grau de umidade das sementes, e pode ser utilizado como procedimento para superação da dormência tegumentar desta espécie (FERREIRA et al., 2015).

Os resultados para a germinação e teste de vigor indicam sucesso do protocolo de criopreservação para sementes de *B. virgilioides*, que são ortodoxas, e portanto podem ser congeladas sem a utilização de crioprotetores (FERRARI et al., 2016). Os baixos teores de água evitam a formação dos cristais de gelo intracelular que podem degradar o sistema de endomembranas acarretando a perda da semipermeabilidade e da compartimentalização celular (KAVIANI et al., 2009). Além disso, a criopreservação de sementes sem a utilização de crioprotetores torna o armazenamento do material mais viável do ponto de vista econômico (BÁRBARA et al., 2015).

Já para o tempo de armazenamento as variações também foram observadas em sementes de mamona que aos 30 dias de criopreservação, elevaram a germinação ao nível inicial após 60 dias (ALMEIDA et al., 2002). Contudo, sementes criopreservadas deveriam manter sua viabilidade por longos períodos de tempo, uma vez que apresentam metabolismo reduzido (NOGUEIRA et al., 2010). Isto pode ser verificado em sementes de *Pilosocereus pachycladus* F, Ritter, submetida a 360 dias de criopreservação, onde os parâmetros de germinação não foram alterados com o passar do tempo (BÁRBARA et al., 2015).

Os parâmetros de germinação aqui avaliados são importantes para a análise das sementes pois, quanto maior a germinação maior a chance de propagação da espécie, assim como um menor tempo para a germinação demonstram um maior vigor, e menor dano causado as sementes durante os tratamentos (referência). Além disso, a uniformidade das sementes pode ser vista através de um baixo nível de incerteza para a germinação e uma maior sincronia, garantindo assim uma homogeneidade para o cultivo da espécie (RANAL et al., 2006).

O tamanho das plântulas geralmente é utilizado para identificar as mais vigorosas e para isso é feita a determinação do comprimento médio tendo em vista que as amostras que apresentam os maiores valores médios são as mais vigorosas (GRAHAM, 2008)

Para o caso da peroxidação lipídica de acordo com Graham (2008), os principais fatores que levam a redução na viabilidade das sementes são o aumento na peroxidação de lipídeos, a deterioração das membranas, o aumento de radicais livres e a redução da atividade de enzimas específicas. Para esta espécie portanto verificamos que a melhor temperatura de armazenamento para se diminuir a peroxidação é a criopreservação.

De acordo com Adams e Perkins, (1993) estresse por baixas temperaturas levariam a um decréscimo nos valores de F_0 o que não é visto neste caso uma vez que as medias não podem ser consideradas diferentes. O declínio da relação F_v/F_M é um bom indicador do dano fotoinibitório quando plantas estão sujeitas a estresses do ambiente incluindo frio (BAKER, 1983). Para este caso não verificamos que as temperaturas e o período de armazenamento não afetam o fotossistema, garantindo assim boas chances e propagação da espécie.

CONCLUSÃO

Em conclusão sementes da espécie sucupira preta pode ser criopreservadas sem o uso de crioprotetores o que torna economicamente mais vantajoso o processo. Além disso sementes podem ser armazenadas por 32 semanas independente da temperatura e manter a sua germinação em torno de 67%.

REFERENCIAS

ADAMS, G, T,; PERKINS, T, D, Avaliação da tolerância ao frio em *Picea* usando fluorescência de clorofila, *Botânica ambiental e experimental* , v, 33, n, 3, p, 377-382, 1993.

ALBUQUERQUE, K. S.; GUIMARAES, R.M.; ALMEIDA, Í. F. e CLEMENTE, A.C.S. Métodos para a superação da dormência em sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 6, p. 1716-1721, 2007

ALMEIDA, F., MORAIS A. M., CARVALHO, J. M. F. C. e GOUVEIA, J. P.G. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana, *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v, 6, n, 2, p, 295-302, 2002.

ARANTES, C, S., DO PRADO JÚNIOR, J, A., SOUSA, J, R., DO VALE, V, S., & DE OLIVEIRA, R, M, C, Ação facilitadora de *Bowdichia virgilioides* kunth, (Fabaceae) na colonização de espécies em uma área de cerrado sentido restrito, *Caminhos de Geografia*, 16, n, 53, 2015.

BAKER, N,R.; EAST, T,M.; Long, SP Chilling danos à fotossíntese em jovens *Zea mays*: II, Função fotoquímica de tilacóides in vivo, *Journal of Experimental Botany* , v, 34, n, 2, p, 189-197, 1983

BÁRBARA, E, P., SILVA, A, A., SOUZA, M, M., GURGEL, Z, E., MARCHI, M, N., & BELLINTANI, M, C, Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia, *Gaia Scientia*, v, 9, n, 2, 2015.

BRASIL, M, A, Regras para análise de sementes, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária,, 2009.

CAMPOS FILHO, E. M.; SANTORALLI, PAR. Guia de identificação de espécies-chave para restauração florestal na região do Alto Pires, Mato Grosso. São Paulo: The Nature Conservancy, 2015.

CNCFlora. *Bowdichia virgilioides* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Bowdichia virgilioides](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Bowdichia_virgilioides)>. Acesso em 20 agost. 2018.

ENGELMANN, Florent. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011

FERRARI, E, A, P, et al., Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f, by the vitrification method, *Revista Ciência Agronômica*, 47(1):172-177, 2016.

FERREIRA, C. S., CARMO, W. S. D., RIBEIRO, D. G., OLIVEIRA, J. M. F. D., MELO, R. B. D., & FRANCO, A. C. Anatomia da lâmina foliar de onze espécies lenhosas dominantes nas savanas de Roraima. *Acta Amazônica*. v. 45, n. 4, p. 337-346, 2015.

GOLDFARB M, MARTINS MED, MATA MERMC, PIMENTEL LW e SEVERINO LS, Teor de água limite para criopreservação das sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v, 10, n, 2, p, 121-129, 2008.

GONZAGA T,W,C, CAVALCANTI MATA M,E,R,M, SILVA H, e DUARTE M,E,M,Criopreservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.) e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.), *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 5(2): 145-154, 2003.

GRAHAM I,A, Seed storage oil mobilization, *Annual Review of Plant Biology*, 59(1): 115-142, 2008.

KAVIANI B, SAFARI-MOTLAGH MR, PADASHT-DEHKAEI MN, DARABI AH E RAFIZADEH A, Cryopreservation of seeds of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss]: use of sucrose and dehydration, *African Journal of Biotechnology*, 8(16): 3809-3810,2009.

LIMA, H.C., CARDOSO, D.B.O.S. *Bowdichia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2015. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29489>>. Acesso em 12 dez.2018

LIMA, R,A,F,; PINHEIRO, I,G,; AGUIRRE, A,G,; CALIARI, C,P,; Guia de árvores para restauração do Oeste da Bahia, *The Nature Conservancy*, Edição nº 01, 206p, 2013.

MOURA, L. C., TITON, M., FERNANDES, J. S. C., & SANTANA, R. C. Germinação in vitro e aclimação de plântulas de Sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). *Bioscience Journal*. Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 678-687, Oct./2014.

NOGUEIRA, G F, Criopreservação e produção de sementes sintéticas in vitro de mangabeira, 2010.

OLIVEIRA, A. C. S., Martins, G. N., Silva, R. F., & Vieira, H. D. Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas. *InterSciencePlace*, v. 1, n. 4, 2015.
RANAL, M,A, e SANTANA, D, G, How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica* , v, 29, n, 1, p, 1-11, 2006.

RANAL., M, A, SANTANA, D, G, D, FERREIRA, W, R., & MENDES RODRIGUES, C, Calculating germination measurements and organizing spreadsheets, Brazilian Journal of Botany, v, 32, n, 4, p, 849-855, 2009.

SMIDERLE, O, J, & SOUSA, R, C, P, Dormência em sementes de Paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth – Fabaceae – Palilionidade), Revista Brasileira de Sementes, vol, 25, n, 1, p,72-75, 2003

SMIDERLE, O. J. e SCHWENGBER, L. A. M. Superação da dormência em sementes de Paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). Revista Brasileira de Sementes, vol. 33, n. 3 p. 407 - 414, 2011