



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE
GERMOPLASMA DE ALGODÃO-DO-CAMPO
[*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger]
- Cochlospermaceae**

JULCÉIA CAMILLO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BRASÍLIA/DF
ABRIL/2008**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE ALGODÃO-DO-CAMPO [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger] - Cochlospermaceae

JULCÉIA CAMILLO

ORIENTADOR: PROF. JOSÉ RICARDO PEIXOTO
CO-ORIENTADOR: Dr. ROBERTO FONTES VIEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: 305

BRASÍLIA/DF
ABRIL/2008

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE ALGODÃO-DO-CAMPO [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger] -
Cochlospermaceae**

JULCÉIA CAMILLO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO VEGETAL.

**ROBERTO FONTES VIEIRA, PhD (Embrapa – Cenargen)
(CO-ORIENTADOR) CPF: 381.546.926-00
E-mail: rfvieira@cenargen.embrapa.br**

APROVADA POR:

**JOSÉ RICARDO PEIXOTO, Dr. (Universidade de Brasília)
(ORIENTADOR) CPF:354.356.236-34 E-mail: peixoto@unb.br**

**RICARDO CARMONA, PhD (Universidade de Brasília)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF:183.492.181-34 E-mail:rcarmona@unb.br**

**JONNY EVERSON SCHERWINSKI PEREIRA, Dr. (Embrapa – Cenargen)
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 583.320.220-53
E-mail:jonny@cenargen.embrapa.br**

BRASÍLIA/DF, 17 de ABRIL de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Camillo, Julcéia

Germinação e conservação de germoplasma de algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger] - Cochlospermaceae./ Julcéia Camillo; orientação de José Ricardo Peixoto. – Brasília, 2008.

95 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. Algodão-do-campo. 2. Sementes. 3. Conservação *ex situ*. 4. Plantas medicinais. I. Peixoto, J.R. II. Dr.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CAMILLO, J. **Germinação e conservação de germoplasma de algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger] – Cochlospermaceae.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 95 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Julcéia Camillo

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Germinação e conservação de germoplasma de algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger] - Cochlospermaceae

GRAU: Mestre ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Julcéia Camillo

CPF: 023.366.849-77

Quadra 05, CL 19, apto 02

73.331.550 Sobradinho/DF - Brasil

(61) 3487-2230 e-mail: julceia@gmail.com

Dedicatória

À minha família, D'Vinci, João Ricardo e Pedro Arthur, obrigada pela alegria que trazem a minha vida e pelo carinho e compreensão nos momentos de ausência.

Agradecimentos

Ao Dr. Roberto Fontes Vieira por todos estes anos de convívio e aprendizado. Por sua dedicação e profissionalismo, será sempre meu modelo de conduta na vida profissional;

Ao Professor José Ricardo Peixoto pela orientação, confiança, amizade e pelas valiosas lições;

Aos pesquisadores da Embrapa Jonny Everson Scherwinski Pereira, Antonieta Nassif Salomão, Dijalma Barbosa da Silva e Rui Américo Mendes por toda ajuda e atenção que tornaram possível a realização deste trabalho;

Ao Dr. Gerson Renan de Lucas Fortes pela contribuição inicial, minha gratidão;

Às laboratorista Luciene Cardoso e Rosangela Mundim pelo apoio nas atividades do dia-a-dia;

Ao Sr. José Dias pela colaboração e empenho no trabalho de campo;

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade de Brasília;

Aos colegas de trabalho e amigos de profissão, Luciana, Kelly, Rafael, Áurea, Aline, Ricardo, Maíra e Talita, obrigada pelo companheirismo e pelos bons momentos;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela bolsa de pesquisa concedida;

Aos meus pais e irmão, pelo carinho e amor que sempre nos uniu como família. E a Milena e João Francisco que tanta alegria nos deram com sua chegada.

A minha família maravilhosa, meu marido D'Vinci e meus filhos João Ricardo e Pedro Arthur que são a minha inspiração.

E a todos, que de forma indireta contribuíram para a realização deste trabalho quer seja com críticas, sugestões ou simplesmente ouvindo, meu muito obrigada de coração.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1 Caracterização da planta em estudo	05
2.1.1 Fenologia e biologia reprodutiva	06
2.1.2 Habitat e distribuição geográfica	06
2.1.3 Etnobotânica	07
2.1.4 Fitoquímica e farmacologia	07
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10

CAPITULO I

CONSERVAÇÃO À LONGO PRAZO DE SEMENTES DE ALGODÃO- DO-CAMPO [*Cochlospermum regium* (Mart ex Schrank) Pilger] – Cochlospermaceae

RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Germinação de sementes	18
2.2 Dormência	19
2.3 Conservação de sementes em banco de germoplasma	21
2.4 Germinação e conservação de espécies do cerrado	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	26

3.1 Coleta, beneficiamento e seleção de sementes	26
3.2 Determinação do teor de umidade	26
3.3 Germinação	27
3.4 Dessecação.....	30
3.5 Armazenamento em temperaturas sub-zero	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Determinação do teor de umidade	32
4.2 Germinação.....	32
4.3 Dessecação.....	38
4.4 Armazenamento em temperaturas sub-zero	42
5. CONCLUSÕES	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
7. ANEXOS	62

CAPÍTULO II

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ALGODÃO-DO-CAMPO

[*Cochlospermum regium* (Mart ex Schrank) Pilger] –

Cochlospermaceae SOB REGIME DE CRESCIMENTO MÍNIMO.

RESUMO.....	68
ABSTRACT	69
1. INTRODUÇÃO	70
1.1 Micropropagação – Histórico e definições.....	70
1.2 Aplicabilidades	70
1.3 A cultura de tecidos com plantas medicinais.....	72

2. MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1 Germinação <i>in vitro</i>	75
2.2 Sub-cultivos	76
2.3 Conservação <i>in vitro</i>	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
3.1 Germinação <i>in vitro</i>	78
3.2 Sub-cultivos.....	82
3.3 Conservação <i>in vitro</i>	86
4. CONCLUSÕES	89
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
6. ANEXOS	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição de <i>Cochlospermum regium</i> baseado em informações coletadas nos herbários da Universidade de Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Jardim Botânico de Brasília, Reserva Ecológica do IBGE (Brasília – DF), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e Jardim Botânico do Rio de Janeiro	09
Figura 2. Sementes de <i>C. regium</i> , da esquerda para a direita a figura ilustra os diferentes estágios de maturação, desde capulho verde (primeira imagem) até os estágio de dispersão (última imagem).....	29
Figura 3. Semente de <i>C. regium</i> com protusão de radícula e curvatura geotrópica positiva, ilustrando o critério adotado para a contagem de semente germinada.....	29
Figura 4. Diferenças entre os tratamentos (T0, T1 e T2) e efeito do ambiente (claro e escuro) sobre o percentual de germinação de sementes de <i>C. regium</i> após as três etapas de avaliação	37
Figura 5. Germinação de sementes de <i>C. regium</i> em função dos diferentes teores de umidade da semente	41
Figura 6. Seqüência de germinação das sementes de <i>C. regium</i>	47
Figura 7. Plântula de <i>C. regium</i> apresentando necrose na ponta da raiz..	54

Figura 8. Porcentagens de germinação <i>in vitro</i> das sementes de <i>C. regium</i> , obtidas após 30 dias de avaliações diárias	79
Figura 9. Porcentagens de germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>C. regium</i> , obtidas após seis meses da inoculação	79
Figura 10. Plantas de <i>C. regium</i> entre 10 e 30 dias após a germinação, com sistema radicular bem desenvolvido e espessamento de colo característico da espécie.....	81
Figura 11. Explantes oriundos de sementes germinadas de <i>C. regium</i> após 30 dias de sub-cultivo	85
Figura 12. Desenvolvimento dos explantes de <i>C. regium</i> submetidos a diferentes regimes de temperatura, onde A ilustra o desenvolvimento do explante a temperatura de 25°C, B a 20°C e C a 10°C.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos locais de coleta e número de plantas, que compuseram a população identificada para a coleta de sementes de <i>C. regium</i> no entorno do Distrito Federal no ano de 2007	27
Tabela 2. Porcentagens de germinação de sementes de <i>C. regium</i> submetidas a diferentes tratamentos em três fases de avaliação, por um período de 60 dias.....	34
Tabela 3. Porcentagens de germinação de sementes de <i>C. regium</i> submetidas a diferentes condições de luminosidade em três fases de avaliação por um período de 60 dias	34
Tabela 4. Tolerância a dessecação de sementes de <i>C. regium</i> com diferentes teores de umidade em três fases de avaliação	39
Tabela 5. Porcentagens de germinação de sementes de <i>C. regium</i> em função dos tratamentos e das temperaturas, na 1ª fase de avaliação após 40 dias de armazenamento	43
Tabela 6. Porcentagens de germinação de sementes de <i>C. regium</i> em função das temperaturas e dos teores de umidade da semente, na 2ª fase de avaliação após 40 dias de armazenamento	43

Tabela 7. Porcentagens de germinação de sementes de <i>C. regium</i> em função dos tratamentos e dos teores de umidade da semente, na 3ª fase de avaliação após 40 dias de armazenamento	43
Tabela 8. Comparação dos percentuais de germinação de sementes de <i>C. regium</i> em função dos tratamentos e dos teores de umidade das sementes, obtidos na 1ª e 3ª fases de avaliação após 40 dias de armazenamento	45
Tabela 9. Porcentagens de germinação de sementes de <i>C. regium</i> em função da interação tripla entre os tratamentos, umidade da semente e temperaturas, obtidos na 2ª fase após 40 dias de armazenamento.....	45
Tabela 10. Comparação entre as porcentagens de germinação de sementes de <i>C. regium</i> , obtidas em função dos teores de umidade da semente e dos tratamentos, na 1ª fase de avaliação aos 40 e 80 dias de armazenamento	49
Tabela 11. Comparação entre as porcentagens de germinação de sementes de <i>C. regium</i> , obtidas em função das diferentes temperaturas na 1ª fase de avaliação aos 40 e 80 dias de armazenamento	49
Tabela 12. Porcentagens de germinação de sementes de <i>C. regium</i> obtidas em função dos tratamentos e das temperaturas, em duas fases de avaliação após 80 dias de armazenamento.	50

Tabela 13. Comparação das médias de germinação obtidas na 3ª fase de avaliação aos 40 e aos 80 dias de armazenamento, considerando os diferentes teores de umidade das sementes.....	50
Tabela 14. Comparação das médias de germinação das sementes de <i>C. regium</i> obtidas na 3ª fase de avaliação aos 40 e aos 80 dias de armazenamento, considerando os tratamentos testados.....	52
Tabela 15. Comparação das médias de germinação obtidas na 3ª fase de avaliação aos 40 e aos 80 dias de armazenamento, considerando as temperaturas testadas.....	52
Tabela 16. Percentual de sementes duras de <i>C. regium</i> após o final das três etapas de avaliação dos experimentos de germinação, dessecação e armazenamento em temperaturas sub-zero.....	55
Tabela 17. Análise das correlações lineares entre todas as variáveis analisadas nos experimentos de germinação, dessecação e armazenamento em temperaturas sub-zero por 40 e 80 dias, das sementes de <i>C. regium</i>	56
Tabela 18. Comparação entre o desenvolvimento de indivíduos quanto a altura de plântulas, número de gemas formadas e porcentagem de sobrevivência de explantes aos 30 e aos 60 dias de avaliação	83

Tabela 19. Conservação *in vitro* de *C. regium* quanto ao percentual de crescimento, altura das plantas e sobrevivência dos explantes submetidos a três regimes de temperatura e três concentrações do meio de cultura WPM 88

RESUMO GERAL

O algodão-do-campo é um arbusto de aproximadamente 2 metros de altura, com raízes lenhosas, resistentes e bastante profundas. De ocorrência comum nas áreas de cerrado, caatinga e pantanal das regiões centro-oeste e nordeste do Brasil. Na medicina popular suas raízes são utilizadas na forma de fatias, lascas ou pó, no preparo de decoctos, infusões e garrafadas para o tratamento de infecções uterinas, intestinais e ovarianas, gastrite, úlceras, artrite e afecções da pele. O extrativismo crescente somado á destruição dos habitats naturais, colocaram o algodão-do-campo na lista de espécies medicinais nativas prioritárias para ações de conservação. Os objetivos deste trabalho foram: 1) gerar conhecimentos básicos sobre a biologia do algodão-do-campo (*Cochlospermum regium*) (Mart. ex Schrank.) Pilger, baseados em estudos de germinação e conservação de sementes em temperatura sub-zero e estabelecer um protocolo para conservação de sementes a longo prazo; 2) adequar uma metodologia para a conservação *in vitro* do algodão do campo e fornecer subsídios para estudos de micropropagação e conservação da espécie. Foram coletadas sementes de indivíduos adultos em uma população nativa de algodão-do-campo localizada na região do entorno do Distrito Federal. As sementes foram submetidas a diferentes testes para verificar o comportamento germinativo da espécie e seu desenvolvimento inicial sob condições de dessecação e temperatura sub-zero e também nas condições *in vitro*. No estudo de conservação à longo prazo, observou-se que a melhor condição para germinação desta espécie foi a combinação de escarificação química com ácido sulfúrico por três períodos de 40 minutos cada e germinação no escuro, que apresentou percentual de germinação acima de 80%. As sementes de *Cochlospermum regium* apresentaram comportamento ortodoxo, uma vez que apresentaram boa tolerância a dessecação (5,3 e 4,5%) e a exposição a temperaturas sub-zero (20°C e NL). Sementes com conteúdo de umidade de 7,9% podem ser armazenadas à temperatura de -20°C, sendo esta uma alternativa viável para a conservação *ex situ* da espécie. Nos experimentos visando a conservação *in vitro*, a germinação das sementes de *C. regium* foi acelerada e uniformizada com a utilização de um período de escarificação química em ácido sulfúrico por 40 minutos. Os dados mostraram

que sementes escarificadas apresentaram aos 30 dias após a inoculação um percentual de germinação *in vitro* de 93,3%, contra apenas 13,3% de germinação das sementes não escarificadas. A conservação da espécie *in vitro* é viável desde que, as plântulas sejam mantidas em câmara de crescimento a 20°C em meio de cultura ½ WPM, sob estas condições as plântulas mantiveram um crescimento mínimo e percentual de sobrevivência de 100% após três meses de avaliação.

Palavras-chave: algodão-do-campo, conservação *ex situ*, germinação, cerrado, planta medicinal.

GENERAL ABSTRACT

Algodão-do-campo is a shrub commonly found in areas of the Brazilian cerrado, caatinga and Pantanal biomes. Its roots are used in traditional medicine to prepare decoctions and infusions to treat ovarian and intestinal infections, gastritis, arthritis, ulcers, and skin affections. Overcollection and habitat destruction have contributed to its inclusion on the list of priority species for conservation. The main objective of this work was: 1) to develop basic procedures on germination for germplasm conservation of algodão-do-campo (*Cochlospermum regium*) (Mart. ex Schrank.) Pilger, under sub-zero temperature; 2) to adapt methodologies for *in vitro* conservation of algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrenk) Pilger], and subsidize micropropagation studies. Seeds from adult individuals were collected from a population of *C. regium*, and submitted to different types of germination, desiccation and sub-zero temperature conditions. Also, plantlets development *in vitro* was observed. A combination of chemical scarification with sulfuric acid for three periods of 40 minutes each and germination in the dark has showed a germination rate higher than 80%. Seeds of *Cochlospermum regium* presented an orthodox behaviour, since they have shown a good tolerance to desiccation and sub-zero temperatures exposure. Seeds with humidity of 7.9% can be stored at -20°C, being a viable alternative for *ex situ* conservation of this species. In *in vitro* experiments, seed germination rate was accelerated and uniform using a chemical scarification period with sulfuric acid for 40 minutes. After 30 days of inoculation *in vitro*, seeds submitted to scarification have showed an *in vitro* germination of 93,3%, when unscarified seeds presented only 13,3% of germination. *In vitro* conservation of this species on growth chamber at 20°C under ½ WPM culture medium is viable, since under this conditions plantlets kept a minimum growth with 100% survival after three months of evaluation.

Key words: algodão-do-campo, *ex situ* conservation, germination, cerrado, medicinal plant.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O cerrado localiza-se no planalto central do Brasil, ocupando aproximadamente 23% do território nacional. Ocorre em altitudes que variam de 300 até 1600 m, nos estados de Goiás, Tocantins, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Maranhão, Ceará, Piauí, Minas Gerais, Rondônia e São Paulo, e em áreas disjuntas ao norte, nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e ao sul em pequenas formações no estado do Paraná (Ribeiro & Walter, 1998; Eiten, 1993).

O clima do bioma caracteriza-se pela presença de invernos secos e verões chuvosos classificado segundo Köppen como Aw (tropical chuvoso). Possui média anual de precipitação da ordem de 1500 mm. As chuvas concentram-se nos meses de outubro a março, e a temperatura média do mês mais frio é superior a 18°C. Embora existam diferenças significativas de clima entre as superfícies mais baixas (inferiores a 300 m), as longas chapadas (acima de 1600 m) e a extensa distribuição em latitude, o mecanismo atmosférico geral determina uma marcha estacional de precipitação semelhante em toda a região, havendo sempre uma estação seca e outra chuvosa, bem definidas (Ribeiro & Walter, 1998).

O complexo vegetacional do cerrado possui relações ecológicas e fisionômicas com outras savanas da América tropical, África e Austrália. A composição da flora do cerrado é influenciada pelo clima, solo, disponibilidade de água e nutrientes, geomorfologia e topografia. Já a distribuição da flora é determinada pela latitude, frequência das queimadas, profundidade do lençol freático, pastejo e outros inúmeros fatores antrópicos. São descritos onze tipos fitofisionômicos no ambiente do cerrado, enquadrados em formações florestais (Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão), savânicas (Cerrado sentido restrito, Parque de cerrado, Palmeiral e Vereda), e campestres (Campo sujo, Campo rupestre e Campo limpo) muitos dos quais apresentam subtipos (Ribeiro & Walter, 1998; Eiten, 1993).

O povoamento do cerrado teve início há cerca de 11.000 anos. Até meados da década de cinquenta, a região permaneceu praticamente isolada devido à ausência de vias de transporte. Com a implantação de Brasília na década de sessenta, o cerrado sofreu mudanças marcantes em seus aspectos físicos, biológicos, sociais e culturais. A urbanização rápida, o crescimento das cidades

antigas e a expansão da fronteira agrícola exercem até os dias atuais uma forte pressão sobre a região do cerrado, provocando os mais variados tipos de impactos ambientais negativos (Pinto, 1993).

De acordo com o estudo da *Conservation International*, dos 1.783.200 km² originais do cerrado, restam intactos apenas 356.630 km², ou 20% do bioma original (Alho, 2005). Mendonça *et al.* (1998) relatam a ocorrência no cerrado de mais de 7000 espécies de plantas superiores e estima-se que deste total, cerca de 4400 sejam endêmicas.

Na região equatorial da América do Sul estão localizados alguns dos biomas de maior diversidade vegetal do planeta, entre eles o cerrado. Nestas regiões, onde a diversidade de pastadores é maior, as plantas produzem por diferentes rotas metabólicas, uma quantidade maior de compostos especiais denominados de metabólitos secundários, que exercem importante papel na proteção destas plantas contra a ação de microrganismos, herbívoros, intempéries ambientais e atração de polinizadores. Compostos como os alcalóides, flavonóides, cumarinas e terpenoides, produzidos por muitas destas espécies, que, após isolados e identificados, passaram a fazer parte da medicina humana, e estas plantas conhecidas como *plantas medicinais*, são utilizadas pelas comunidades humanas há muitos séculos na cura dos mais diversos males (Skorupa & Vieira, 2005).

Planta medicinal é uma expressão utilizada de forma genérica para indicar plantas com propriedades terapêuticas. A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 80% da população, principalmente nos países subdesenvolvidos, se utilizam destes recursos, principalmente porque, uma parte significativa destas espécies é largamente cultivada ou é de fácil acesso, por possuir uma ampla distribuição geográfica (Skorupa & Vieira, 2005).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (Maciel *et al.*, 2002; Jorge & Morais, 2003).

No Brasil, estima-se que 25% do faturamento da indústria farmacêutica são obtidos pelo comércio de medicamentos derivados de plantas, e calcula-se que o setor cresça aproximadamente 10% ao ano. Entre 1990 e 2000, o crescimento do mercado de plantas medicinais exportadas foi de 159%, de acordo com estudos da Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica, que prevê para 2007 uma movimentação de US\$ 47 bilhões de dólares em todo o mundo. A produção de plantas medicinais pelos agricultores familiares e comunidades tradicionais, também representa uma importante alternativa na implementação da política de utilização da fitoterapia pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o fortalecimento dos Arranjos Produtivos Locais (APL) e a inclusão social das comunidades (Brasil, 2006).

A crescente demanda da indústria farmacêutica por produtos de origem vegetal, pode prejudicar a conservação de muitas espécies de uso medicinal, na forma como vem sendo atendida. Alguns dados sobre comércio de plantas medicinais nativas têm mostrado que mais de 50% das espécies nativas exportadas pelo Brasil são coletadas em seu ambiente natural, na forma de um extrativismo predatório que pode comprometer a sobrevivência dessas espécies e dos ecossistemas envolvidos, diante da elevada utilização de componentes das plantas essenciais para sua reprodução, como flores, frutos, sementes e raízes. Deste modo, algumas plantas medicinais nativas encontram-se ameaçadas de extinção, ou mesmo comercialmente extintas em determinadas regiões (Brito, 2003).

Um dos problemas mais comuns da destruição dos habitats é o desaparecimento das espécies em uma determinada região, como ocorreu no estado do Paraná em 1995, em que o Ibama e o Governo do Estado lançaram a lista das Plantas Medicinais Ameaçadas de Extinção naquele estado, o *Cochlospermum regium* foi citado nesta lista na categoria “Em perigo”. Após analisarem esta listagem, alguns pesquisadores do Instituto Ambiental do Paraná (IAP) realizaram um estudo sobre a germinação e multiplicação da espécie, visando sua reintrodução em áreas de ocorrência de cerrado no Paraná. *C. regium* existia nos cerrados da região, mas com a destruição do habitat natural, esta espécie praticamente desapareceu, por isso foi escolhida como a primeira espécie a ser trabalhada pelo projeto “Flora Ameaçada” sob a coordenação do IAP (Nogueira *et al.*, 1998).

Na região centro-oeste, o *C. regium* também foi incluído na lista de espécies medicinais prioritárias para a conservação. Um estudo sobre o extrativismo de plantas medicinais no cerrado resultou numa lista de espécies consideradas de alta

prioridade para estudos de conservação e domesticação. Entre as espécies desta lista podemos citar: arnica-da-serra (*Lychnophora ericoides* Less.), barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Cov.], copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.), sangra-d'água (*Croton urucurana* Baill.), landim (*Caloplyllum brasiliense* Camb.) e o algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger], cujas ações mais emergenciais envolvem estudos de conservação de sementes e conservação *in vitro* (Vieira, *et al.*, 2002).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização da planta em estudo

A família Cochlospermaceae compreende apenas dois gêneros, *Cochlospermum* e *Amoreuxia*, com quinze espécies distribuídas principalmente, em regiões tropicais da América e África (Keating, 1972). O gênero *Cochlospermum* é constituído por onze espécies, quatro das quais, *C. angolense*, *C. planchonii*, *C. tinctorium* e *C. vitifolium*, apresentam grande importância medicinal (Almeida *et al.*, 2005). As plantas desta família ao serem seccionadas, produzem um suco vermelho ou alaranjado em suas células secretoras, característica bem marcante da espécie (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002).

Cochlospermum regium (Mart. ex Schrank) Pilger é conhecido popularmente como algodão-do-campo, algodãozinho, algodãozinho-do-cerrado, algodão-bravo, algodão-do-mato, algodãozinho-do-campo, algodoeiro-do-campo, pacote, butuá-de-corvo, algodão-cravo, periquiteira-do-campo, rui-barbo-do-campo, samaumá-do-iaguapó (Pio Correa, 1984; Silva, 1998; Durigan *et al.*, 2004)).

A espécie é um subarbusto de até 2 m de altura, seus ramos variam de 0,8 a 1,8 m de comprimento, sistema subterrâneo robusto e lenhoso; caule ferrugíneo e nodoso; ramos castanho-avermelhados a acinzentados e folhas alternadas (Mendonça *et al.*, 1998; Durigan *et al.*, 2004). Flores ígneo-fulvas ou amarelas, em forma de concha, medindo de 6 a 8 cm de diâmetro, dispostas em panículas terminais, contendo de 5 a 10 flores; localizadas na extremidade de brotos grossos e totalmente despidos de folhas (Noronha & Gottsberger, 1980). O fruto é uma cápsula deiscente ovóide ou elipsóide; medindo cerca de 6 cm de comprimento, tendo as sementes envoltas em filamentos compridos e lanosos, idênticos aos do algodão comercial (Ferri, 1969; Pio Correa, 1984; Mendonça *et al.*, 1998). As raízes são tuberosas por causa da abundância de tecido parenquimático de reserva, o qual é permeado pelo tecido vascular (Kirizawa, 1981). Geneticamente é classificada como uma espécie diplóide, cuja carga cromossômica corresponde a $2n = 36$ cromossomos (Forni-Martins *et al.*, 1995).

Algumas plantas possuem raízes modificadas que podem servir como órgãos dormentes ou como fonte de alimentação. No caso de plantas do cerrado, os xilopódios são estruturas típicas de comunidades de plantas, onde a seca e o fogo podem ser fatores de controle de uma população. Muitas espécies como o *C. regium*

formam um xilopódio rapidamente durante o primeiro ano de crescimento, pois enquanto as estruturas jovens acima do solo podem ser dizimadas pela seca ou fogo, os órgãos geminíferos, contendo o alimento armazenado, podem rapidamente recolonizar uma região (Metivier, 1979). Em plântulas de *C. regium* com 30 dias de idade é bem visível a dilatação da extremidade distal da raiz principal, com estrutura secundária totalmente diferenciada (Kirizawa, 1983).

2.1.1 Fenologia e biologia reprodutiva

O algodão-do-campo no cerrado apresenta alternância entre o período vegetativo e o reprodutivo, na época das chuvas cobre-se de folhas e no período das secas floresce, estando a planta totalmente despida de folhas (Ferri, 1971). De acordo com Pott & Pott (1994) a floração na região do pantanal ocorre nos meses de maio a setembro. A antese é diurna, ocorrendo entre 6 e 7 horas da manhã e a flor dura cerca de um dia. A polinização é feita exclusivamente por abelhas (*Xylocopa frontalis*, *Bombus sp.*, *Oxaea flavescens* e *Centris spp.*) (Noronha & Gottsberger, 1980).

Estudos realizados por Ferri (1971) no cerrado das Emas (SP) sugeriram a influência da poda sobre o comportamento vegetativo de *C. regium*. As plantas que foram podadas no mês de junho, época de florescimento da espécie, apresentaram uma rebrota rápida, desenvolvendo grande número de ramos curtos, com cerca de 15 cm. Enquanto que na maioria das plantas, ao serem podadas, geralmente apresentam superbrotção de ramos vegetativos, em *C. regium*, o corte da planta determina superbrotção de ramos vegetativos ou florais, de acordo com a época do corte. Este fenômeno ocorre por causa da atuação da auxina inibindo as gemas, e a sua interação com outros fatores determinam o estágio floral.

2.1.2 Habitat e distribuição geográfica

É uma planta comum em ambientes de cerrado (*cerrado sensu stricto*, cerradão, campo limpo, campo sujo, campo cerrado, mata ciliar, mata mesofítica), caatinga e pantanal (Silva, 1998; Mendonça *et al.*, 1998) nas regiões Centro-Oeste e Nordeste do Brasil (Figura 1).

Molinari *et al.* (1996) descreveram a ocorrência da planta na baixada Cuiabana e na Chapada dos Guimarães, em grupos de três a cinco indivíduos, bem distanciados entre si, não sendo encontradas populações densas. Oliveira (2003) descreve como sendo uma espécie de ocorrência agregada ou com tendência ao agrupamento.

2.1.3 Etnobotânica

Na medicina popular, as raízes da espécie são utilizadas no preparo de decoctos, infusões e garrafadas para o tratamento de inflamações uterinas, intestinais e ovarianas, como também no tratamento de gastrite, úlceras, cravos, espinhas e manchas da pele (Castro *et al.*, 2004) e artrites (Cesquini & Campos, 2006). Também usada como purgativa, regulador menstrual e depurativo (Guarim Neto & Moraes, 2003; Nunes & Carvalho, 2003; Molinari *et al.*, 1996), antidissentérico, no tratamento de abscessos (Silva, 1998, Pio Correa, 1984), colesterol alto, afecções da pele, infecções da próstata (Nunes *et al.*, 2003).

Nunes *et al.* (2003) verificaram que o algodãozinho está na lista das plantas mais indicadas pelos raizeiros de Campo Grande (MS). Tresverzol *et al.* (2006) estudaram o mercado informal de plantas medicinais nas feiras de Goiânia – GO e constataram que, muitas das plantas comercializadas são compradas de extrativistas em outros estados. Isto se deve à dificuldade em encontrar a planta em regiões próximas às cidades goianas, devido ao desmatamento provocado pela crescente urbanização e/ou áreas destinadas a cultivos agrícolas e pastagens.

2.1.4 Fitoquímica e farmacologia

Os principais compostos isolados em espécies do gênero *Cochlospermum* são flavonóides (aspigenina, naringenina, aromadendrina, saponinas, tanino) purinas e coclosperminas (Lima *et al.*, 1995). A análise do extrato do *C. regium* indicou a presença das flavonas naringenina e aromadendrina, e a presença de 1-hidroxitetradecanona-3, um possível precursor das coclosperminas, substâncias que apresentam atividade hepatoprotetora (Ritto, 1996; Ceschini, 2003).

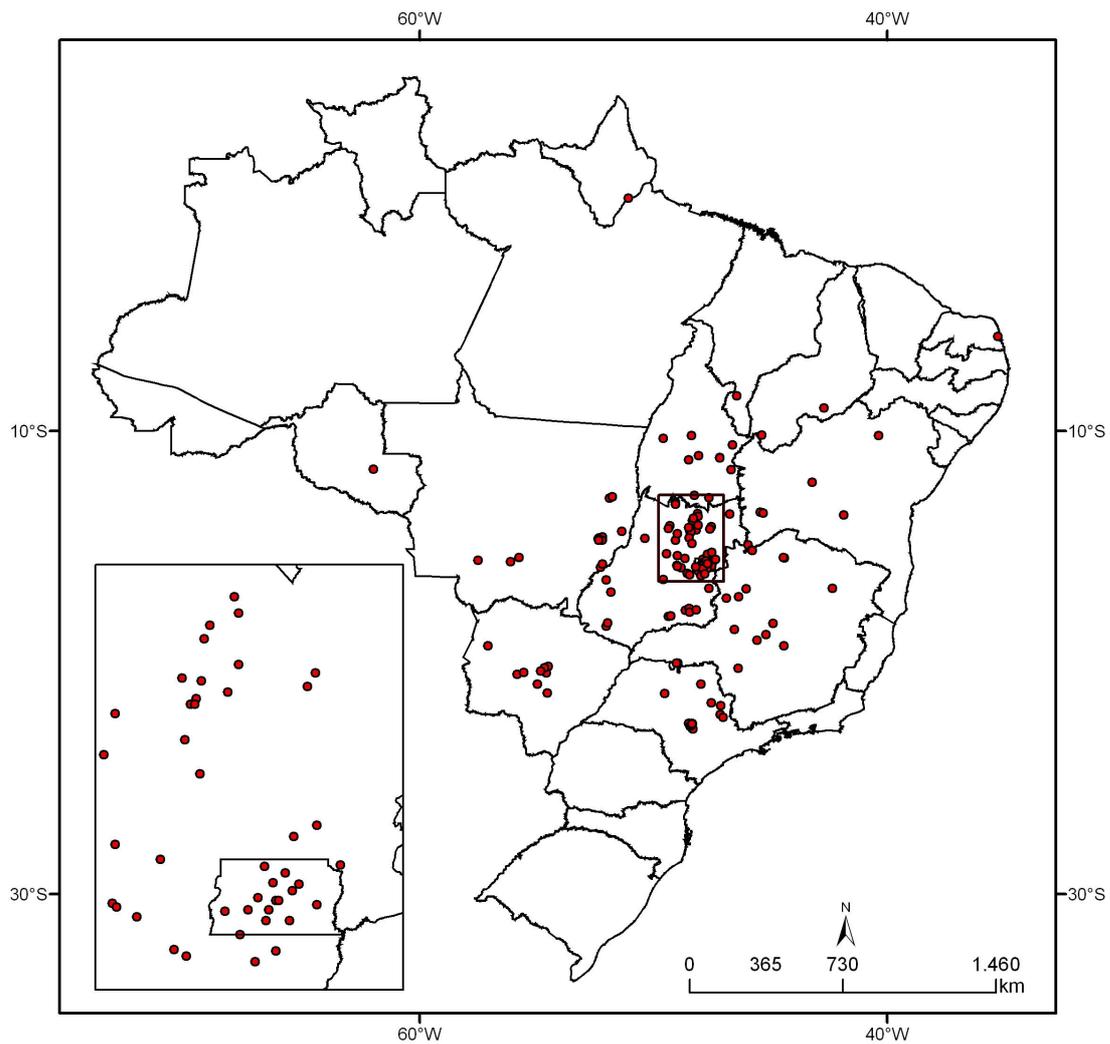
A análise de extrato das raízes do *C. regium* demonstrou que o flavonóide kaempferol possui propriedades analgésica e anti-edematogênica (Castro *et*

al., 1994a; Siqueira *et al.*, 1994; Castro *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 1995), anti-bacteriana (Oliveira *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 1996), antioxidante (Grassi & Siqueira, 2001), mutagênica e citotóxica (Toledo *et al.*, 2000; Nunes & de Carvalho, 2003; Castro *et al.*, 2004).

Castro (2000) comprovou a atividade antinociceptiva do flavonóide 3-O-glicosil-dihidrokaempferol (F-52) extraído do rizoma da planta. Os resultados de pesquisas indicaram que a F-52 é derivada de mecanismos diferentes dos clássicos, sendo útil no desenvolvimento de drogas analgésicas com um novo perfil de atuação (Castro *et al.*, 1994b; Castro *et al.*, 1998). Ceschini & Campos (2006) demonstraram os efeitos do extrato aquoso preparado com o pó das raízes de *C. regium* no tratamento de artrite reumatóide.

Brum *et al.* (1997) estudaram a composição do óleo essencial extraído do rizoma da espécie, onde foram isolados os seguintes compostos: apocarotenóides, triterpenos, flavanonas glicosídeas, triacilbenzenos e longas cadeias de cetonas voláteis. O rendimento do óleo essencial é aproximadamente 0,5 ml de óleo para cada 200 g de material vegetal. A análise do óleo pelo método do GC-MS revelou a seguinte composição: β -selineno (34,1%), elemeno (5,4%), *trans*-cariofileno (4,8%), α -pineno (3,4%), α -humuleno (2,8%), aromadendrina (2,1%), α -selineno (1,2%), δ -cadineno (0,8%) e 45,4% de outros elementos. Também foi detectado a atividade antibacteriana do óleo essencial, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*.

Cunha-Laura *et al.* (2005) recomendam cautela na utilização do extrato das raízes do algodãozinho durante a gravidez, pois estudos realizados em laboratórios com ratas prenhes demonstraram efeitos consideráveis de toxicidade neste período.



Fonte: PROBIO - Projeto Plantas do Futuro – Região Centro-oeste

Figura 1: Mapa da distribuição de *Cochlospermum regium* baseado em informações coletadas nos herbários da Universidade de Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Jardim Botânico de Brasília, Reserva Ecológica do IBGE (Brasília – DF), Universidade Federal do Mato Grosso de Sul e Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHO, C.J.R. Desafios para a conservação do cerrado, em face das atuais tendências de uso e ocupação. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (org) **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005.

ALMEIDA, S.C.X.; LEMOS, T.L.G.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. Constituintes químicos voláteis e não-voláteis de *Cochlospermum vitifolium* (Willdenow) Sprengel. **Química Nova**, v.28, n.1, p. 57-60, 2005.

BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, Ministério da Saúde, 60 p., 2006.

BRITO, M.A. A estratégia de conservação *in situ* (Unidades de conservação) e a conservação das plantas medicinais. In: COELHO, M.F.B.; COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J.L.D. (org.) **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais**. I Seminário Mato-grossense de Etnobiologia, Etnoecologia e II Seminário Centro-oeste de Plantas Medicinais. Anais. Cuiabá: UNICEN, p. 137-148, 2003.

BRUM, R.L.; HONDA, N.K.; HESS, S.C.; CRUZ, A.B.; MORETTO, E. Antibacterial activity of *Cochlospermum regium* essential oil. **Fitoterapia**, v. 68, n. 1., 1997.

CASTRO, D.B.; SANTOS, D.B.; FERREIRA, H.D.; SANTOS, S.C.; CHEN-CHEN, L. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato do *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.6, n.3, p.15-19, 2004.

CASTRO, M.S.A. Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do 3-O-glicosil-dihidrokaempferol, flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium* (algodãozinho). Universidade Federal de São Paulo. Departamento de Farmacologia. Tese de Doutorado, 2000.

CASTRO, M.S.A.; SIQUEIRA, J.M.; VANDERLINDE, F.A.; SANTOS, A.L.; FERNANDES, F.R.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Envolvimento de receptores dopaminérgicos no efeito antinociceptivo de uma flavanona isolada dos rizomas de *Cochlospermum regium* (algodãozinho). Águas de Lindóia. **XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Programa e Resumos; p. 48, 1998.

CASTRO, M.S.A.; SIQUEIRA, J.M.; KRIEGER-AMORIM, L.W.; VIEIRA, I.C.; KASSAB, N.M. Estudo sobre os efeitos analgésico e antiedematogênico de uma flavona isolada de *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger (algodãozinho). Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. **XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Programa e Resumos, 161, 1994a.

CASTRO, M.S.A.; SIQUEIRA, J.M.; PAZ-VIEIRA, I.C.; KRIEGER-AMORIM, L.W.; SOUZA, K.C.B. Efeito analgésico e anti-edematogênico de *Cochlospermum regium* (Mart.) Pilger. (Algodãozinho). Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. **XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Programa e Resumos, 162, 1994b.

CESCHINI, L. Análises do extrato aquoso de *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger, propriedade antioxidante e citotoxicidade em Células de Ovário de Hamster Chinês. Universidade de Brasília. Dissertação de mestrado, 2003.

CESCHINI, L.; CAMPOS, E.G. Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger aqueous root extract on mammalian cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 302-305, 2006.

CUNHA-LAURA, A.L.; BARROS, A.L.; GUALBERTO, J.M.; MATIDA, E.T.; GRANCE, S.R.M.; RIBEIRO, M.P.; TULLI, E.C.O.; SIQUEIRA, J.M.; VIEIRA, M.C.; TEIXEIRA, M.A.; CARVALHO, T.B.; VASCONCELOS, S.B.; LAURA, I.A.; LAURA, V.A. Ação do extrato hidroalcoólico da porção subterrânea de algodãozinho-do-campo em ratas prenhes da linhagem heterogênea Wistar. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2 (suplemento), p.520, 2005.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Editora UNESP, 2 ed. rev. e amp., 2002.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J.B.; FRANCO, G.A.D.C. SIQUEIRA, M.F. **Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada**. São Paulo: Ed. Páginas & Letras, 2004.

EITEN, G. Vegetação do cerrado. In: Pinto, M. M. (org). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2. ed., p. 17-74, 1993.

FERRI, M.G. Modificação do hábito floral de *Cochlospermum regium* (Mart.) Pilger. In: FERRI, M.G. (coord.) **III Simpósio Sobre o cerrado**. Editora Edgard Blucher Ltda/Editora Universidade de São Paulo, p.164-166, 1971.

FERRI, M.G. **Plantas do Brasil – espécies do cerrado**. Editora Edgard Blucher Ltda/Editora Universidade de São Paulo, p. 82-85, 1969.

FORNI-MARTINS, E.R.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; DA CRUZ, N. Chromosome numbers in Brazilian cerrado plants. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, n. 2, p. 281-288, 1995.

GRASSI, R.F.; SIQUEIRA, J.M. Atividade antioxidante em *Cochlospermum regium* – algodãozinho. Botucatu: **V Jornada Paulista de Plantas Medicinais: natureza, ciência e comunidade**. Anais. p. 34, 2001.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R.G. de. Recursos Medicinais de Espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**. V.17 n. 4., 2003.

JORGE, S.S.A. & MORAIS, R.G. Etnobotânica de plantas medicinais. In: COELHO, M.F.B.; COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J.L.D. (org.) **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais**. I Seminário Mato-grossense de Etnobiologia, Etnoecologia e II Seminário Centro-oeste de Plantas Medicinais. Anais. Cuiabá: UNICEN, p. 89-98, 2003.

KEATING, R.C. The comparative morphology of the Cochlospermaceae III. The Flower and pollen. **Ann. Missouri Botanical Garden**, 59, p. 282-296, 1972.

KIRIZAWA, M. Desenvolvimento anatômico do sistema subterrâneo de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger. Porto Alegre: **XXXIV Congresso Nacional de Botânica**. Programa e Resumos, p. 48, 1983.

KIRIZAWA M. **Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger - Cochlospermaceae**. São Paulo: Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado, 437 p, 1981.

LIMA, D.P.; CASTRO, M.S.A.; MELLO, J.C.P.; SIQUEIRA, J.M.; KASSAB, N.M. A flavanone glycoside from *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger. **Fitoterapia**, v.66, p. 545-546, 1995.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JUNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. Flora Vascular do Cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, p. 289- 556, 1998.

METIVIER, J.R. Dormência e Germinação. In: FERRI, M.G. (coord). **Fisiologia vegetal**. V. 2, São Paulo – EPU. Editora da Universidade de São Paulo, p. 343-392, 1979.

MOLINARI, A.C.F.; COELHO, M.F.B.; ALBUQUERQUE, M.C.F. Germinação de sementes da planta medicinal algodão do campo (*Cochlospermum regium* (Mart. et Schl.) Pilg.) – Cochlospermaceae. **Agricultura Tropical**, v. 2, n. 1., p. 25-31, 1996.

NOGUEIRA, A.C.; KUNIYOSHI, Y.S.; HATSCHBACH, G.; LIMA, M.T.E. *Cochlospermum regium* (Mart. & Shum.) Pilger – germinação e reintrodução no estado do Paraná. In: **XLIX Congresso Nacional de Botânica**. Anais. Salvador, 1998.

NORONHA, M.R.P.; GOTTSBERGER, G. A polinização de *Aspilla floribunda* (Asteraceae) e *Cochlospermum regium* (Cochlospermaceae) e a relação das abelhas visitantes com outras plantas do cerrado de Botucatu, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 3, p. 67-77, 1980.

NUNES, W.B.; CARVALHO, S. de. Evaluation of the mutagenic potential of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p. 545-549, 2003.

NUNES, G.P.; SILVA, M.F. da; RESENDE, U.M.; SIQUEIRA, J.M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, 2003.

OLIVEIRA, J. A. Análise florística de oito espécies medicinais nos cerrados de Dourados – MS. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Agronomia. Dissertação de mestrado, 98 p., 2003.

OLIVEIRA, C.C.; SIQUEIRA, J.M.; SOUZA, K.C.B.; RESENDE, U.M. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium*: preliminary results. **Fitoterapia**, v. 67, n. 2, p.176-177, 1996.

OLIVEIRA, C.; SIQUEIRA, J.M.; SOUZA, K.C.B.; RESENDE, U.M. Avaliação da atividade antibacteriana da raiz do *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger (algodãozinho). **XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1994.

PINTO, M.M. (org). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2. ed., 681 p, 1993.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, (Reimpressão), v.I, 1984.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Embrapa: Corumbá, MS. 320 p., 1994.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.T. Fitofisionomias do bioma cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, p. 89-166, 1998.

RITTO, J.L.A. **Caracterização farmacológica da droga e do extrato fluído de algodãozinho-do-campo** [*Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger. Universidade de São Paulo - Fármaco e Medicamentos. Dissertação de mestrado, 1996.

SILVA, S. R. **Plantas do Cerrado utilizadas pelas comunidades da região do Grande Sertão Veredas**. Brasília. Fundação Pró-Natureza-FUNATURA, 1998.

SIQUEIRA, J.M.; CASTRO, M.S.A.; MELLO, J.C.P.; KASSAB, N.M.; VIEIRA, I.C.; AMORIM, L.W.; GUERRA, M.C.; RESENDE, U. Flavona do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger (algodãozinho-do-campo). **XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1994.

SKORUPA, L.A.; VIEIRA, R.F. Coleta de germoplasma de plantas medicinais. In: WALTER, B.T.; CAVALCANTI, T.B. (org.) **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 435-468, 2005.

TOLEDO, M.I.; SIQUEIRA, J.M.; ARAÚJO, L.C.L.; OGA, S. Acute and subacute toxicity of *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger. **Phytotherapy Research**; 14: 359-361, 2000.

TRESVERZOL, L.M.; PAULA, J.R.; RICARDO, A.F.; FERREIRA, H.D.; ZATA, D.T. Estudo sobre o comercio informal de plantas medicinais em Goiânia – GO e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3 (1), 23-28, 2006. Acessado em: 20/03/07. Disponível em: <http://www.farmacia.ufg.br/revista>.

VIEIRA, R.F. (org.) **Estratégias para a conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: Resultados da 1ª Reunião Técnica**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Ibama/CNPq, 184 p., 2002.

CAPITULO I

CONSERVAÇÃO À LONGO PRAZO DE SEMENTES DE ALGODÃO-DO-CAMPO [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger] - Cochlospermaceae

RESUMO

O algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger], arbusto característico das áreas de cerrado, caatinga e pantanal, é utilizado na medicina popular para o tratamento de infecções uterinas, intestinais e ovarianas, gastrite e úlceras. O extrativismo e a destruição dos habitats colocaram o algodão-do-campo, na lista de espécies medicinais nativas prioritárias para conservação. O objetivo deste trabalho foi gerar conhecimentos básicos sobre a germinação e procedimentos para a conservação de sementes de algodão-do-campo (*Cochlospermum regium*) (Mart. ex Schrank.) Pilger, em temperaturas sub-zero. No estudo de conservação a longo prazo, observou-se que a melhor condição para germinação desta espécie foi a combinação de escarificação química com ácido sulfúrico por três períodos de 40 minutos cada e germinação no escuro, que apresentou percentual de germinação acima de 80%. As sementes de *Cochlospermum regium* apresentaram comportamento ortodoxo, uma vez que apresentaram boa tolerância a dessecação e a exposição a temperaturas sub-zero. Sementes com conteúdo de umidade de 7,9% puderam ser armazenadas a temperatura de -20°C, sendo esta, uma alternativa viável para a conservação *ex situ* das sementes desta espécie.

Palavras-chave: algodão-do-campo, conservação, recursos genéticos, semente.

CHAPTER I

LONG TERM SEED CONSERVATION OF ALGODÃO-DO-CAMPO [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger] – Cochlospermaceae.

ABSTRACT

Algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger] is a typical shrub from cerrado, caatinga and pantanal biomes. It is used in the traditional medicine to treat ovarian and intestinal infections, gastritis and ulcers. Overcollection and habitat destruction have contributed to its inclusion on the list of priority species for conservation. The main objective of this work was to develop basic procedures on germination for germplasm conservation of algodão-do-campo (*Cochlospermum regium*) (Mart. ex Schrank.) Pilger, under sub-zero temperature. A combination of chemical scarification with sulfuric acid for three periods of 40 minutes each and germination in the dark has showed a germination rate higher than 80%. Seeds of *Cochlospermum regium* presented an ortodox behaviour, since they have shown a good tolerance to desiccation and sub-zero temperatures exposure. Seeds with humidity of 7.9% can be stored at -20°C, being a viable alternative for *ex situ* conservation of this species.

Key Words: algodão-do-campo, conservation, genetic resources, seeds.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade fisiológica de um lote de sementes é medida através de dois parâmetros principais, que são o vigor e a viabilidade (Popinigis, 1977). A viabilidade é medida, entre outros parâmetros, pelo teste de germinação, onde são fornecidas determinadas condições para que seja obtido o máximo de germinação das sementes. Para boa parte das espécies cultivadas comercialmente estas informações encontram-se facilmente disponíveis, o mesmo não ocorre com espécies nativas do cerrado, havendo pouca informação disponível ou trabalhos incipientes sobre o assunto.

Muitas espécies nativas do bioma cerrado estão ameaçadas de extinção, quer seja pela sua importância econômica ou através da destruição das áreas de cerrado pelo avanço da fronteira agrícola e urbanização. Diante disso, surge a necessidade de desenvolver estudos visando a domesticação e conservação destas espécies.

O objetivo geral deste trabalho foi gerar conhecimentos básicos sobre a germinação e procedimentos para a conservação de sementes de algodão-do-campo (*Cochlospermum regium*) (Mart. ex Schrank.) Pilger, em temperaturas sub-zero.

Os objetivos específicos foram:

- 1) verificar quais as melhores condições para a germinação de sementes de *C. regium*, testando-se o efeito da escarificação das sementes com ácido sulfúrico e o efeito da presença/ausência de luz na germinação;
- 2) testar a tolerância das sementes a dessecação;
- 3) avaliar a germinação das sementes de *C. regium* após exposição a temperaturas sub-zero (-20°C e nitrogênio líquido).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Germinação de sementes

A germinação é um evento fisiológico que depende da qualidade da semente e das condições de germinação, como o suprimento de água e oxigênio e adequação de temperatura, luz e substrato. Estas condições de germinação ou requerimentos básicos para germinação variam entre as espécies de plantas. As qualidades física, fisiológica e sanitária da semente são avaliadas por parâmetros de peso, pureza, germinabilidade, conteúdo de umidade e viabilidade e esses parâmetros podem variar entre lotes de semente de uma mesma espécie (Salomão & Sousa-Silva, 2003; Marcos Filho *et al.*, 1987).

O termo germinação pode ser considerado como a reativação metabólica ou retomada de crescimento do embrião, resultando em uma plântula com as estruturas essenciais para seu desenvolvimento. Por meio do teste de germinação, avalia-se o poder germinativo das sementes do lote. Esta avaliação é feita inicialmente, após os tratamentos pré-germinativos e novamente após o armazenamento. Informações sobre a capacidade germinativa das sementes são importantes para a programação de atividades como a comercialização, plantio e conservação (Salomão & Sousa-Silva, 2003).

Nos testes de germinação, deve-se fazer a contagem diária de sementes germinadas. Quando se conhece o padrão germinativo da espécie, as contagens podem ser feitas em intervalos maiores, a cada cinco ou sete dias, por exemplo. De acordo com o critério botânico de germinação, considera-se semente germinada quando há protrusão/extrusão de qualquer parte do embrião, notadamente a radícula. Se o critério botânico for adotado, deve-se observar se a radícula apresenta curvatura geotrópica positiva e consistência firme. Isto porque, sementes mortas podem emitir radícula devido à força mecânica exercida pela água em seu interior. Pelo critério de tecnologia de sementes, considera-se a semente germinada, aquela que apresenta a emergência de uma plântula normal, com as partes aérea e radicular vigorosas (Salomão & Sousa-Silva, 2003).

Durante o teste de germinação alguns fatores podem afetar o comportamento germinativo das sementes, com destaque para o substrato e a temperatura (Faiad *et al.*, 2001). Os tipos de substratos mais utilizados em testes de germinação são:

papel, pano, areia e solo. Deve-se levar em consideração para a escolha do substrato, o tamanho da semente, sua exigência com relação à quantidade de água, ao suprimento de oxigênio, sensibilidade à luz e, a facilidade que o mesmo oferece para realização das contagens e avaliações (Brasil, 1992).

Sementes viáveis de algumas espécies podem não germinar durante o teste de germinação. Isto pode ser atribuído a um fenômeno chamado de dormência (Faiad *et al.*, 2001)

2.2 Dormência

Dormência é o estado fisiológico de reduzida atividade metabólica, em que a semente viável não germina, ou o faz de maneira assincrônica, com pouca expressividade numérica, ainda que em condições ambientais adequadas de umidade, oxigênio, temperatura e luz. Entre os tipos de dormência, o mais comum em espécies tropicais é a dormência exógena - física. Este tipo de dormência caracteriza-se pela impermeabilidade à absorção de água e às trocas gasosas e/ou restrição mecânica à protrusão radicular imposta pelas estruturas ou tecidos seminais que envolvem o embrião e a semente. A dormência exógena - química - caracteriza-se pela presença de compostos no embrião, nas estruturas ou tecidos seminais ou tecidos de reserva que inibem a germinação. A maioria das sementes das espécies do cerrado estudadas apresenta dormência física (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Bowdichia virgilioides* Kunth.), e algumas delas ainda apresentam dormência química (*Calophyllum brasiliense* Cambess. e *Copaifera langsdorffii* Desf.). A dormência pode ocorrer em sementes, em alguns órgãos de reserva subterrâneos, como os bulbos e gemas de arbustos e árvores perenes (Cardoso, 2004, Salomão & Sousa-Silva, 2003; Metivier, 1979).

O fenômeno da dormência é comum, principalmente em sementes de determinadas hortaliças e forrageiras, algumas fruteiras e de espécies arbóreas e ornamentais. Esse mecanismo é genético e ocorre no ciclo de vida da espécie, durante a maturação da semente, de modo que, logo após a dispersão, a semente ainda não estará apta para germinar. Essa dormência, que se instala na fase de maturação da semente, é denominada primária. No entanto, em algumas espécies, o bloqueio à germinação se estabelece após a dispersão da semente, induzido por

certas condições de estresse ou por um ambiente desfavorável à germinação, caracterizando a dormência secundária (Dias, 2005).

Para facilitar a tomada de decisões sobre utilizar ou não técnicas para a quebra de dormência, é necessário conhecer os tipos de dormências existentes nas sementes. Este fenômeno pode ocorrer de três formas, segundo Dias (2005):

1) Dormência física: relacionada à impermeabilidade do envoltório da semente à água. Algumas espécies apresentam o envoltório impermeável à água, devido à presença de lignina, suberina e outros compostos, sendo necessário rompê-lo ou torná-lo mais permeável, o que se consegue por meio de tratamentos de escarificação física, utilizando-se lixa, areia grossa, imersão em água quente ou de escarificação química, adotando-se produtos químicos abrasivos como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, nitrato de potássio. Exemplo: *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Ocotea spp.* (Cardoso, 2004)

2) Dormência fisiológica: relacionada aos processos fisiológicos que bloqueiam o crescimento do embrião, que apesar de fisicamente estruturado, completo, não germina por razões tais como balanço hormonal inadequado, impermeabilidade do envoltório a trocas gasosas (oxigênio e, ou gás carbônico) ou presença de compostos químicos inibidores. A superação dessa dormência envolve modificações hormonais no embrião, ou seja, tanto a redução da concentração dos inibidores como a síntese de fitohormônios promotores da germinação. Exemplo: *Dipteryx alata* Vogel, *Hymenaea courbaril* L., *Bauhinia forficata* Link. (Cardoso, 2004).

3) Dormência morfológica: relacionada à imaturidade do embrião, ou seja, as sementes são dispersas com o embrião morfológicamente imaturo. Para que a semente germine é necessário um determinado período de tempo, variável com a espécie, até o completo desenvolvimento do embrião. Esse mecanismo de dormência é conhecido também como imaturidade do embrião ou embrião rudimentar. Exemplo: *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., *Annona cacans* Warm. (Cardoso, 2004).

A dormência e a germinação são processos que capacitam as plantas a sincronizarem o desenvolvimento, tanto com o meio ambiente como entre os indivíduos de uma população. A germinação de sementes, originando as gerações

seguintes, é o estágio mais crítico da vida da planta, portanto, da sobrevivência de uma espécie. Seu controle por meio da dormência assegura, que a plântula possa se estabelecer como um organismo autotrófico fotossintetizante, naquele período em que o embrião é dependente das reservas da semente, e em condições que favoreçam este período crítico (Metivier, 1979).

2.3. Conservação de semente em banco de germoplasma

A diminuição, a perda e a extinção dos recursos genéticos vegetais requerem a criação de bancos de germoplasma, para conservar a máxima variabilidade genética vegetal existente (Goedert, 1988). A coleta e conservação têm como principais objetivos, ampliar a base genética de espécies tradicionalmente cultivadas ou espécies de uso potencial e conservá-la para que possa ser utilizada em programas de melhoramento vegetal (Walter *et al.*, 2005).

A estratégia mais eficiente para assegurar a disponibilidade de recursos genéticos vegetais é a conservação de sementes em condições de temperatura sub-zero (-20°C) e baixo conteúdo de umidade (3 a 7%). Algumas pesquisas já comprovaram que reduzindo a temperatura de armazenamento de 5°C para temperatura sub-zero, o tempo de vida das sementes aumenta em 10 anos para algumas espécies ou até várias décadas em outras. Isso indica que, o tempo de vida de uma semente, entre outras coisas, depende do conteúdo de umidade da semente e da temperatura de armazenamento (Faiad *et al.*, 1998).

A conservação de coleções de germoplasma depende da biologia reprodutiva de cada espécie. Quando uma espécie se propaga por sementes, o método de armazenamento a longo prazo é preferido para conservação, porque é mais conveniente, seguro e viável economicamente. O armazenamento de sementes tem como metas principais, proteger a semente da deterioração e dos danos, minimizar a perda de vigor e germinabilidade, manter a identidade da semente, a condição física e a pureza (Goedert, 1988).

Para que a semente seja armazenada em banco de germoplasma, é essencial conhecer seu comportamento para fins de conservação. De acordo com Roberts (1973), os eventos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem nas sementes desde a sua formação até a fase de dispersão, determinam a classificação das

sementes relacionando-as com tolerância a dessecação e a resistência a temperaturas sub-zero em:

1) Ortodoxa: semente tolerante ao dessecação em baixos teores de umidade sem danos em sua viabilidade. Essa categoria é normalmente tolerante a temperatura sub-zero em armazenamento a longo prazo. Exemplo: a maioria das espécies cultivadas (arroz [*Oryza sativa* L.], feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e milho (*Zea mays* L.).

2) Recalcitrante: aquela que não sofre a desidratação durante a maturação; quando é liberada da planta-mãe apresenta altos teores de umidade. É sensível ao dessecação e morre se o conteúdo de umidade for reduzido abaixo do ponto crítico, usualmente um valor relativamente alto. Essa categoria é também sensível a baixas temperaturas. Exemplo: camu-camu [*Myrciaria bubia* (Kunth) McVaugh] e castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.).

3) Intermediária: Aquela que não se enquadra nem na definição de semente ortodoxa nem de recalcitrante. Essa categoria suporta temperaturas baixas quando dessecadas a níveis ainda relativamente altos de umidade (ao redor de 10%) ou que embora seca não suporta temperatura sub-zero sem sofrer danos em sua viabilidade. Exemplo: citros (*Citrus spp.*) e café (*Coffea spp.*) (Ellis *et al.*, 1990).

Além do comportamento fisiológico, outros dois aspectos são determinantes para a conservação de sementes a longo prazo, que são a longevidade e a viabilidade. A longevidade é o período de tempo em que a semente pode permanecer viva em condições ambientais, e que é determinado pela interação entre suas características morfológicas e genéticas e os fatores ambientais. Já a viabilidade corresponde a condição em que a semente permanece viva ou viável, mantendo sua integridade fisiológica, bioquímica, biofísica e sua capacidade de germinar e gerar uma planta normal e vigorosa (Silva *et al.*, 2007).

Sementes ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias podem apresentar vários graus de longevidade. Mas, tanto a viabilidade quanto a longevidade podem ser prolongadas durante o armazenamento da semente, desde que as condições apropriadas de umidade da semente e temperatura de armazenamento sejam fornecidas (Silva *et al.* 2007).

2.4 Germinação e conservação de espécies do cerrado

Inúmeros trabalhos foram e estão sendo desenvolvidos com o objetivo de conservar espécies nativas ameaçadas de extinção no bioma cerrado. Além da conservação *in situ*, estão sendo desenvolvidos protocolos de conservação *ex situ* que visam otimizar as condições de armazenamento de sementes em bancos de germoplasma a temperaturas sub-zero. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, mantém desde 1981 uma Coleção de Base (Colbase), a qual já foram incorporados acessos de várias espécies nativas e cultivadas.

Pesquisas com sementes de espécies nativas tem sido conduzidas objetivando padronizar testes de germinação, umidade, sanidade e tolerância a dessecação e ao congelamento em temperaturas sub-zero. Protocolos para a conservação a -20°C já foram estabelecidos para algumas espécies com sementes ortodoxas e cerca de 800 acessos dessas espécies já foram incorporados à Colbase (Silva *et al.*, 2007).

Dentre as espécies medicinais do cerrado estudadas e incorporadas a Colbase da Embrapa, podemos destacar: copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.), faveira (*Dimorphandra mollis* Benth.), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Covill.) e pacari (*Lafoensia pacari* St. Hil.) (Silva *et al.*, 2007).

As informações sobre germinação de sementes de espécies do Cerrado, em condições laboratoriais, encontram-se dispersas. O caráter destas informações, muitas vezes, não é aprofundado devido à ausência de padronização de procedimentos e às variações de comportamento e disponibilidade das sementes (Salomão & Sousa-Silva, 2003). As espécies do cerrado respondem com elevados índices de germinação à temperatura de incubação de 25°C, como landim, (*Calophyllum brasiliense*.) e mata-pasto (*Chamaecrista desvauxii*), de 30°C, como jenipapo (*Genipa americana*), ou alternada de 20-30°C, como paineira-do-cerrado (*Eriotheca pubescens*) e pau-de-jangada (*Apeiba tibourbou*).

A combinação de temperaturas sub-zero e baixo teor de umidade no armazenamento de sementes apresentaram, bons resultados com espécies nativas do cerrado como a *Jacaranda acutifolia* (Mello & Eira, 1995) e *Copaifera langsdorffii* (Eira *et al.*, 1992), e também com *Maytenus ilicifolia* (Eira *et al.*, 1995) espécie medicinal nativa das matas do sul do Brasil.

A maioria das espécies do cerrado germina em condições de ausência de luz, mas, para algumas delas, a luz estimula a germinação. Neste caso, são utilizados fotoperíodo de 16h luz/8h escuro ou de 12h luz/12h escuro e um substrato que permite a exposição à luz, como papel ou vermiculita em caixas de gerbox (Salomão & Sousa-Silva, 2003).

As sementes de *Cochlospermum regium* (algodãozinho) apresentam tegumento duro e impermeável à água. A impermeabilidade do tegumento é um dos principais fatores que mantêm a viabilidade das sementes, em condições de campo, permitindo que, pelo menos, uma parte da população de sementes germine em condições favoráveis. A semente desta espécie é constituída de testa, tecido de revestimento com aspecto esponjoso e opaco, tégmen tecido interno liso, brilhante e resistente e da camada paliçádica resistente que ocupa a posição mais externa do tégmen, revestida por cutícula delgada que pode ser removida quando submetida a escarificação. Após essa remoção a embebição se processa rapidamente, apresentando alto percentual de germinação (Kirizawa, 1981).

Em estudos recentes, as sementes do algodãozinho foram submetidas a diversos tratamentos pré-germinativos para superar a dormência. Albuquerque *et al.* (2003) demonstram que os métodos mais eficientes para quebra de dormência destas sementes foram a escarificação com lixa e a imersão em água a 85°C por 40 segundos. As sementes não tratadas germinaram 3%, e as sementes submetidas aos tratamentos o percentual de germinação atingiu valores de até 43%.

Sales (2001) testou as melhores condições de luminosidade para a germinação de *C. regium*. Os melhores resultados foram obtidos em escuro, vermelho e vermelho-extremo com porcentagens de 81,2; 90,7 e 74,7%, respectivamente. Na análise da influência da temperatura sobre germinação, em que foram testadas as temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C, sementes incubadas a 25°C atingiram maior porcentagem de germinação (90%), porém os melhores índices de velocidade de germinação foram verificados nas temperaturas de 15 e 25°C (2,6 e 2,7 respectivamente).

Sales *et al.* (2002) estudaram os efeitos de diferentes tempos de imersão das sementes de *C. regium* em ácido sulfúrico (H₂SO₄). A germinação de sementes submetidas aos diversos tratamentos e incubadas a 30°C, ocorreu entre o terceiro e o décimo quinto dia após a sementeira. Quando as sementes foram imersas em

ácido sulfúrico por 90 minutos, seguindo-se de embebição em água destilada por 24 horas, a porcentagem de germinação aos 17 dias foi de 76%, mas o número de sementes germinadas entre o terceiro e o quinto dia ficou abaixo dos 34%, comparando com as sementes tratadas por 120 e 150 minutos, que neste mesmo período apresentaram 55 e 56% de germinação, respectivamente. Os autores relatam que o maior tempo de imersão no ácido permitiu uma maior concentração inicial do número de sementes germinadas, porque proporcionou melhor permeabilidade à entrada de água para um maior número de sementes. Mesmo imersas em H_2SO_4 , as sementes apresentaram comportamentos germinativos diferentes. Esta diversidade de comportamentos deve-se ao grau de permeabilidade tegumentar, a desuniformidade de tamanho, forma e variação de cores das sementes. Essa diversidade na intensidade de dormência, já descrita para outras espécies, pode contribuir para a distribuição temporal da germinação, com maiores vantagens na perpetuação da espécie na natureza (Carvalho & Nakagawa, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta, beneficiamento e seleção de sementes.

As sementes utilizadas neste trabalho foram obtidas de frutos maduros (capulhos), de 33 plantas adultas em uma população nativa de algodão-do-campo coletada no entorno do Distrito Federal (Tabela 1). As coletas foram realizadas semanalmente, durante os meses de agosto e setembro de 2007.

No Laboratório de Sementes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília – DF, as sementes foram retiradas dos capulhos, o linter foi removido de forma manual, juntamente com outras impurezas (folhas, caules e cascas) e armazenadas em sacos aluminizados a temperatura ambiente de laboratório, por 40 dias (Figura 2). As sementes oriundas de todas as coletas foram homogeneizadas para a formação de um lote. Posteriormente este lote foi dividido em quatro sub-lotes de 480 sementes cada, um para cada etapa do experimento (germinação, dessecação e armazenamento por 40 dias e por 80 dias).

A população estudada do algodão-do-campo é ruderal, ocorrendo em solo recentemente revolvido e pedregoso. As plantas apresentavam-se concentradas em reboleiras de 4 a 5 indivíduos, com distâncias variando entre 1 a 15 quilômetros umas das outras. As plantas foram identificadas com placas de metal e fitas coloridas e o local marcado com GPS (Tabela 1). Estas características observadas em campo estão de acordo com a descrição feita por Molinari *et al.* (1996), estudando populações de *C. regium* em fragmentos de cerrado no estado do Mato Grosso, em que os autores descrevem a ocorrência de grupos de três a cinco plantas, bem distanciadas entre si, não sendo encontradas populações densas.

3.2 Determinação do teor de umidade

A umidade inicial das sementes foi considerada após o beneficiamento do material e a formação do lote. Esta umidade e aquelas obtidas após os tratamentos de dessecação (item 3.4) foram determinadas pelo método de estufa a $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$, por 24 horas, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), usando-se quatro repetições de 10 sementes cada.

Tabela 1. Identificação dos locais de coleta e número de plantas, que compuseram a população identificada para a coleta de sementes de *Cochlospermum regium* no entorno do Distrito Federal em 2007.

Local	Número de plantas	Latitude	Longitude
1	4	14°98'27"	47°44'57"
2	5	14°98'50"	47°45'53"
3	4	14°99'21"	47°86'20"
4	4	14°99'02"	47°86'33"
5	12	14°98'34"	47°94'04"
6	4	14°98'25"	47°94'14"

3.3 Germinação

O teste de germinação foi conduzido com quatro repetições de 20 sementes por tratamento, em gerbox sobre papel, a temperatura de 25°C. As condições de germinação foram em presença de luz (fotoperíodo de 16 horas luz, 74.98 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e no escuro (gerbox envolvido com papel alumínio). Como tratamento pré-germinativo utilizou-se ácido sulfúrico (H_2SO_4) e como tratamento germinativo utilizou-se nitrato de potássio (KNO_3) a concentração de 2%. O teste de germinação foi realizado conforme descrito abaixo:

Primeira fase: T0 (substrato umedecido com água destilada); T1 (escarificação por 40 minutos em H_2SO_4) e T2 (substrato umedecido com KNO_3). As avaliações foram realizadas diariamente por um período de 30 dias. Após avaliação final desta fase, as sementes germinadas (protusão de radícula com curvatura geotrópica positiva) (Figura 3) neste período foram separadas e as restantes passaram para a segunda fase.

Segunda fase: todos os tratamentos foram submetidos a escarificação química com H_2SO_4 por 40 minutos (T0+ H_2SO_4 , T1+ H_2SO_4 e T2+ H_2SO_4). As sementes foram depositadas novamente nos gerbox e mantidas em germinador em claro e escuro, com uma única avaliação ao final de 15 dias da inoculação. As sementes germinadas, neste período, foram separadas e as restantes passaram para a terceira fase.

Terceira fase: escarificação química com H_2SO_4 por 40 minutos (T0+ H_2SO_4 + H_2SO_4 , T1+ H_2SO_4 + H_2SO_4 e T2+ H_2SO_4 + H_2SO_4) e prosseguiu-se com o experimento como descrito para a segunda fase.

Os resultados obtidos nesses testes serviram para estabelecer as condições mais favoráveis para a germinação de sementes de *Cochlospermum regium*, a serem utilizadas nos experimentos seguintes.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando-se 4 repetições de 20 sementes cada. A análise dos dados foi realizada em programa estatístico SANEST de acordo com metodologia descrita por Zonta & Machado (1984).

Também foram feitas análises de correlação linear entre todas as variáveis avaliadas, baseando-se na significância de seus coeficientes. A classificação de intensidade da correlação para $p \leq 0,01$, considerou muito forte ($r \pm 0,91$ a $\pm 1,00$), forte ($r \pm 0,71$ a $\pm 0,90$), média ($r \pm 0,51$ a $\pm 0,70$) e fraca ($r \pm 0,31$ a $\pm 0,50$), de acordo com Gonçalves e Gonçalves (1985), citado por Guerra e Livera (1999).



Figura 2. Sementes de algodão-do-campo, da esquerda para a direita a figura ilustra os diferentes estágios de maturação, desde capulho verde (primeira imagem) até o estágio de dispersão (última imagem).



Figura 3. Semente de *C. regium* com protusão de radícula e curvatura geotrópica positiva, ilustrando o critério adotado para contagem de semente germinada.

3.4 Dessecação

Sementes do segundo sub-lote foram divididas em três lotes de 160 sementes cada, o primeiro lote foi a testemunha, e os demais foram divididos em iguais quantidades e depositados em caixas plásticas sobre sílica gel para dessecação por 24 e 48 horas. A testemunha e as sementes desseçadas por dois períodos foram avaliadas quanto ao poder germinativo antes e após armazenamento nas temperaturas de -20°C (freezer) e nitrogênio líquido (-196°C), conforme apresentado no item 3.5.

3.5 Armazenamento em temperaturas sub-zero

Para o congelamento nas temperaturas -20°C (freezer) e nitrogênio líquido (NL), as sementes foram acondicionadas em envelopes aluminizados trifoliolados (polietileno-alumínio-polietileno), selados com fita crepe e identificados. Dois envelopes foram colocados a -20°C e dois envelopes foram expostos ao nitrogênio líquido, por meio de imersão direta e congelamento rápido (ca. $200^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$). As sementes ficaram armazenadas por 80 dias. O descongelamento das sementes foi feito a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) por 12 horas. Os testes de germinação foram realizados com quatro repetições de 20 sementes a temperatura de 25°C , em gerbox sobre papel, no escuro e com tratamento pré-germinativo (escarificação química com H_2SO_4) após dessecação (item 2.4) e armazenamento. A avaliação da germinação procedeu-se em três fase conforme descrito abaixo:

Primeira fase: T0 (substrato umedecido com água destilada); T1 (escarificação por 40 minutos em ácido sulfúrico (H_2SO_4)). As avaliações foram realizadas diariamente por um período de 30 dias. Após avaliação final desta fase, as sementes germinadas neste período foram separadas e as restantes passaram para a segunda fase.

Segunda fase: todos os tratamentos foram submetidos a escarificação química com ácido sulfúrico por 40 minutos (T0+ H_2SO_4 , T1+ H_2SO_4). As sementes foram depositadas novamente nos gerbox e mantidas em germinador em claro e escuro, com uma única avaliação ao final de 15 dias da inoculação. As sementes germinadas neste período foram separadas e as restantes passaram para a terceira fase.

Terceira fase: T0+H₂SO₄+H₂SO₄, T1+H₂SO₄+H₂SO₄, com experimento conduzido da mesma forma como descrito para a segunda fase.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do teor de umidade

A umidade inicial das sementes recém coletadas foi de 6,7%. Após 60 dias mantidas à temperatura ambiente, mesmo acondicionadas em embalagem impermeável, as sementes atingiram 7,9% de umidade. A dessecação em sílica gel por 24 horas reduziu a umidade para 5,3% e após 48 horas, as sementes atingiram 4,5% de umidade. Estes resultados demonstraram que o uso de sílica gel foi eficiente e viável para diminuir a umidade do lote de sementes de *C. regium*.

4.2 Germinação

Os testes realizados para verificar quais as condições mais favoráveis para a germinação de sementes de *C. regium*, apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (T0, T1 e T2) e entre os ambientes testados (claro e escuro), porém não houve interação entre eles.

A análise de variância da primeira fase mostrou que aos 30 dias de avaliação, houve diferença significativa no percentual de germinação apenas entre os tratamentos testados (água, H₂SO₄ e KNO₃). As médias de germinação obtidas foram de 72% para o tratamento T1(H₂SO₄), 4% para T2 (KNO₃) e 1% para T0 (água) (Tabela 2). As médias de germinação para os ambientes claro e escuro foram de 27% e 25% respectivamente, embora haja uma diferença numérica, a 5% de probabilidade não foi considerada significativa (Tabela 3).

A diferença no percentual de germinação obtido entre os tratamentos permitiu inferir que, as sementes de *C. regium* apresentam dormência física e não fisiológica, visto que, o lote tratado com KNO₃ não apresentou percentual de germinação diferente da testemunha (T0). A análise estatística mostrou que T0 e T2 apresentaram comportamento semelhante, ou seja, o substrato umedecido com água destilada e o substrato umedecido com nitrato de potássio, não foram eficientes na quebra de dormência desta espécie.

Na segunda fase, os resultados mostraram que o percentual de germinação aumentou consideravelmente em todos os blocos, inclusive em T0 e T2. Os percentuais de germinação para T0, T1 e T2 foram respectivamente 52, 79, e 38% e

novamente não foi constatada diferença significativa dos ambientes, claro e escuro, sobre a germinação.

Na terceira fase, a contagem final da germinação realizada ao final dos 60 dias de avaliação, resultou um elevado índice de germinação em todos os tratamentos, sendo 71; 88 e 73% e respectivamente para T0, T1 e T2. Nesta fase foi constatado ainda, o efeito significativo do ambiente sobre o percentual de germinação, sendo que, lotes mantidos no claro apresentaram média de germinação de 73% e lotes mantidos no escuro apresentaram 81%.

Os resultados obtidos na análise dos ambientes (claro e escuro) estão de acordo com os dados de Sales (2001), ao testar as melhores condições de luminosidade para a germinação de sementes de *C. regium*, observou que os melhores resultados foram obtidos em escuro, vermelho e vermelho-extremo com porcentagens de 81, 91 e 75%, respectivamente.

A presença ou ausência de luz no processo germinativo está relacionada com as condições ambientais onde as espécies se desenvolvem (Vidaver, 1977). O fato de as sementes de *C. regium* germinarem melhor no escuro pode ser justificado pelo ambiente de ocorrência desta espécie. As plantas estudadas ocorrem em ambientes total ou parcialmente sombreados, como nas bordas de matas mais densas ou em locais de ocorrência de arbustos menores e sempre com grande volume de serrapilheira.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho, também foram descritos para outras espécies nativas do cerrado. Salomão *et al.* (2003) relataram comportamento germinativo semelhante para *Hymenaea courbaril* L. (30 a 70% de germinação), *Cedrela odorata* L. (77 a 100%) e *Cecropia pachystachya* Trécul (30 a 80%) após 30 dias de incubação a 25°C no escuro.

Quanto aos tratamentos testados (T0, T1 e T2), os percentuais de germinação obtidos neste trabalho são muito semelhantes aos obtidos por Sales *et al.* (2002) que obteve germinação de 76, 78 e 80% para os tratamentos 90, 120 e 150 minutos respectivamente, de imersão em ácido sulfúrico. A autora recomenda que qualquer destes períodos de imersão em ácido sulfúrico seguido de 24 horas de embebição em água destilada é eficiente na quebra de dormência desta espécie.

O presente experimento mostrou que a imersão das sementes em ácido sulfúrico por mais de 40 minutos causou danos em muitas sementes. Como havia pouca disponibilidade de material para conduzir o experimento, optou-se por fazer

escarificações em períodos máximos de imersão de 40 minutos. Este tipo de dano está provavelmente relacionado com o teor de umidade e uniformidade de maturação do lote de sementes. Wetzel (1997) relata que as diferenças pluviométricas alteram a época e velocidade de maturação das sementes, portanto para coletar sementes de espécies nativas totalmente maduras há necessidade de maiores estudos.

Tabela 2. Porcentagens de germinação de sementes de *C. regium* submetidas a diferentes tratamentos em três fases de avaliação, por um período de 60 dias.

Avaliações	% Germinação/Tratamentos		
	T0	T1	T2
1ª fase*	1 b	72 a	4 b
2ª fase**	52 b	79 a	38 b
3ª fase***	71 b	88 a	73 b

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* T0 (H₂O); T1 (H₂SO₄); T2 (KNO₃)

**T0+H₂SO₄; T1+H₂SO₄ e T2+H₂SO₄

*** T0+H₂SO₄+H₂SO₄; T1+H₂SO₄+H₂SO₄ e T2+H₂SO₄+H₂SO₄

Tabela 3. Porcentagens de germinação de sementes de *C. regium* submetidas a diferentes condições de luminosidade em três fases de avaliação, por um período de 60 dias.

Avaliações	%Germinação/Ambientes	
	Claro	Escuro
1ª fase*	27 a	25 a
2ª fase**	52 a	61 a
3ª fase***	73 b	81 a

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* T0 (H₂O); T1 (H₂SO₄); T2 (KNO₃)

**T0+H₂SO₄; T1+H₂SO₄ e T2+H₂SO₄

*** T0+H₂SO₄+H₂SO₄; T1+H₂SO₄+H₂SO₄ e T2+H₂SO₄+H₂SO₄

Após cada coleta no campo foi realizada uma minuciosa separação das sementes, preconizando-se sementes de coloração preta, tamanho intermediário e sem deformações. Porém, para os estudos realizados, não se pode garantir a uniformidade de maturação do lote de sementes, pois é comum ocorrer ao mesmo tempo na planta desde botões florais até frutos completamente secos, gerando uma grande desuniformidade de maturação e diferentes teores de umidades entre sementes de um mesmo capulho ou de uma mesma planta. Estas informações também foram relatadas por Wetzler (1997) estudando a época de dispersão e fisiologia de sementes de espécies do cerrado.

Para minimizar os efeitos causados pela diferença de maturação das sementes, as coletas de sementes foram realizadas semanalmente, retirando-se da planta apenas os capulhos totalmente secos e abertos, cujas sementes encontravam-se em fase de dispersão.

O comportamento das sementes quanto às condições favoráveis para germinação, sugere que as sementes desta espécie apresentam dormência morfológica imposta pela testa da semente. De acordo com a descrição feita por Kirizawa (1981), a semente madura de *C. regium* apresenta testa e tégmen com múltiplas camadas de células. A epiderme da testa é constituída por uma camada de células justapostas e recoberta por uma camada delgada de cutícula que confere resistência à semente. Os estratos mais externos apresentam células pequenas com paredes celulósicas espessas, mas aquelas localizadas internamente, são mais volumosas e possuem paredes delgadas. As células do endosperma contêm numerosas gotículas de óleo de tamanhos diversos e grânulos de natureza protéica. Esse material de reserva ainda é possível ser visualizado em sementes estocadas a mais de três anos.

A camada paliçádica das sementes maduras de *C. regium* é bastante resistente, apresentando coloração castanha bem visível. Sua função é de proteger a semente da injúria mecânica ou da alteração no conteúdo hídrico (Kirizawa, 1981). A camada paliçádica e a cutícula podem restringir a passagem de água e de ar, podendo ser responsáveis pela dormência das sementes dessa espécie. Rolston (1978) relata que a principal característica de sementes impermeáveis à água é a presença da camada paliçádica. Kirizawa (1981) também relata que em sementes de *C. regium* a camada paliçádica e o tégmen embora bastante resistentes, ao serem escarificadas a embebição se processa rapidamente e a porcentagem de

germinação é elevada, tanto em temperatura ambiente como em estufa a temperatura de 30°C.

Os dados obtidos nestas avaliações corroboram com os relatos de Albuquerque *et al.* (2003) estudando a germinação de espécies medicinais do cerrado. Neste estudo foi constatado que as sementes de algumas espécies medicinais de cerrado normalmente são indiferentes à luz, germinando na ausência ou presença de luz. Entretanto, a presença de luz durante a condução do teste de germinação favorece o desenvolvimento das plântulas, facilitando a avaliação das mesmas.

A análise da germinação inicial serviu de base para as análises subseqüentes. Os dados obtidos mostraram que o uso de KNO_3 não é justificado, pois não apresentou elevação no número de sementes germinadas. Parcelas mantidas no escuro apresentaram maior porcentagem de germinação, quando comparadas com aquelas mantidas sob luminosidade. O uso de escarificação com ácido sulfúrico aumentou a velocidade da germinação e o número de sementes germinadas nas parcelas tratadas, sendo uma forma eficiente de quebra de dormência.

A Figura 4 ilustra as diferenças entre os tratamentos T0 (água destilada), T1 (H_2SO_4) e T2 (KNO_3), em presença e ausência de luz. Os resultados obtidos demonstram que, as combinações de escarificação química com ácido sulfúrico e escuro proporcionaram maior eficiência quanto ao número de sementes germinadas e a velocidade de germinação.

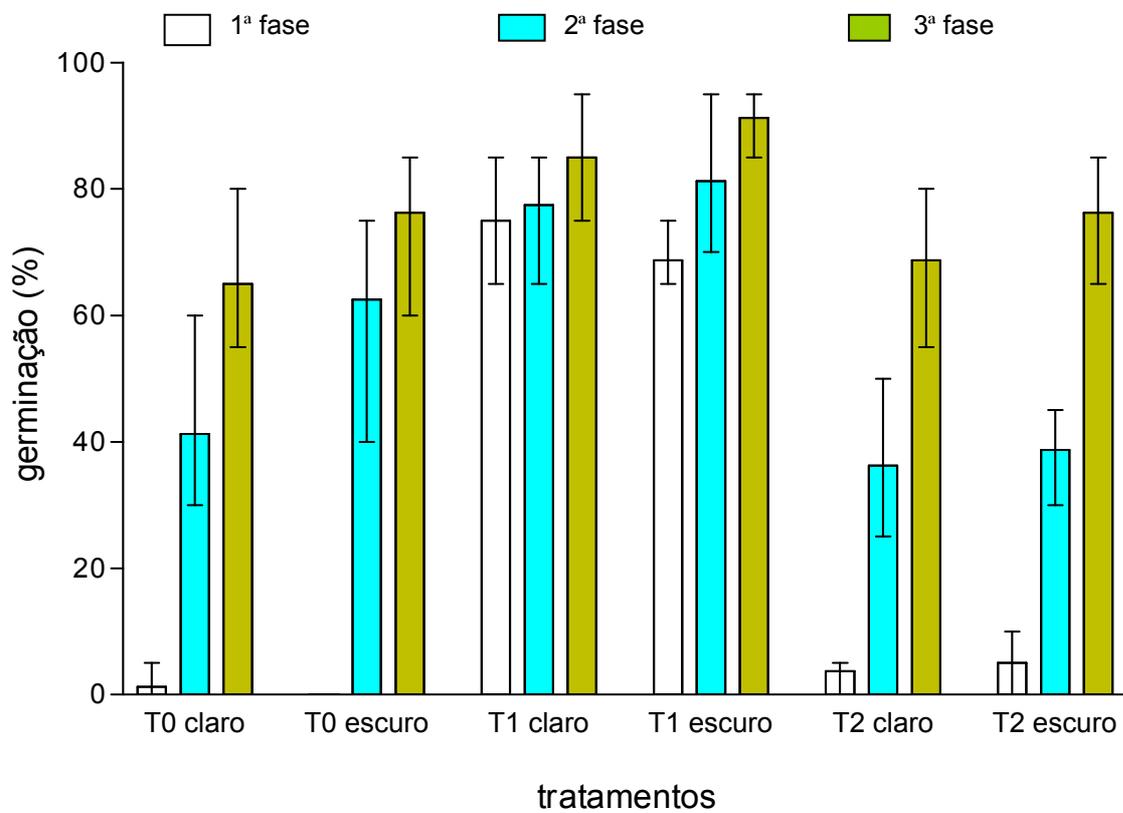


Figura 4. Diferenças entre os tratamentos (T0, T1 e T2) e efeito do ambiente (claro e escuro) sobre o percentual de germinação de sementes de *C. regium* após as três etapas de avaliação.

4.3 Dessecação

As sementes desta espécie apresentaram boa tolerância à dessecação, os resultados mostram que houve um incremento de germinação a cada avaliação. Ao final da terceira fase, as sementes desseccadas a 4,5% de umidade e escarificadas, por três vezes, com ácido sulfúrico apresentaram índice de germinação maior do que os demais tratamentos (82%). Observou-se que a diminuição do teor de umidade das sementes induz um grau maior de dormência destas, como pode ser verificado na Tabela 4. Este aumento na dormência das sementes de *C. regium* em função da dessecação também foi relatado por Wetzel (1997).

Os resultados obtidos mostram que entre os dois tratamentos testados (T0 e T1) T1 foi superior em todas as avaliações. Entre os teores de umidade da semente houve diferenças significativas em cada período avaliado (Tabela 4).

Os teores de umidade das sementes apresentaram diferentes comportamentos quanto ao tempo de exposição das sementes ao agente escarificador. Observou-se que quanto menor a umidade da semente, maior foi o tempo de escarificação para obter o mesmo percentual de germinação. Sementes desseccadas a 4,5% de umidade atingiram 82% de germinação após a terceira escarificação, indicando que a metodologia adotada foi eficiente para atender ao objetivo proposto que foi conseguir o maior número possível de sementes germinadas.

O menor teor de umidade a que as sementes são expostas a escarificação também influenciou no nível de dano a semente. As sementes com 7,9% de umidade que foram expostas ao ácido sulfúrico apresentaram na 2ª fase e 3ª fase de avaliação 34% e 60% de germinação respectivamente, e foi observada a ocorrência de sementes danificadas. Este fato pode ser atribuído, possivelmente, ao fato de estas sementes terem iniciado o processo germinativo estando, portanto, com seu tegumento mais permeável e o contato com o ácido resultou na deterioração de algumas sementes. O mesmo não ocorreu com as sementes desseccadas a 5,3 e 4,5% que apresentaram percentual de germinação acima de 72% e poucas sementes danificadas, ao final da 3ª fase de avaliação.

Tabela 4. Tolerância a dessecação de sementes de *C. regium* com diferentes teores de umidade, em três fases de avaliação.

Tratamentos	Umidade das sementes (%)								
	1ª fase			2ª fase			3ª fase		
	7,9	5,3	4,5	7,9	5,3	4,5	7,9	5,3	4,5
T0	2,00 aB	0,00 aA	2,00 aB	52,00 aA	11,00 bB	5,00 bB	75,00 aA	56,00 bA	61,00 abB
T1	34,00 aA	7,00 bA	15,00 bA	49,00 aA	27,00 bA	42,00 abA	60,00 bB	74,00 abA	82,00 aA

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido horizontal e as letras maiúsculas (A,B) no sentido vertical

1ª fase = T0 (H₂O); T1 (H₂SO₄); 2ª fase = T0+H₂SO₄; T1+H₂SO₄; 3ª fase = T0+H₂SO₄+H₂SO₄; T1+H₂SO₄+H₂SO₄
7,9% (Umidade inicial); 5,3% (24 horas dessecação); 4,5% (48 horas dessecação).

A tolerância a dessecação das sementes de algodão-do-campo a teores de umidade abaixo de 5%, é um dado muito interessante sob o ponto de vista do armazenamento a longo prazo. Alguns trabalhos têm demonstrado que, quando um lote de sementes é armazenado com elevados teores de água podem reduzir a longevidade das mesmas, alterando o metabolismo e favorecendo o crescimento de patógenos prejudiciais à manutenção de sua capacidade germinativa (Hellmann *et al.*, 2006; Barreto *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2001) A viabilidade do material biológico também é aumentada quando armazenado após secagem e em ambiente frio (Vertucci & Roos, 1990). De acordo com Kirizawa (1981), sementes de algodão-do-campo armazenadas por até três anos em temperatura ambiente, conservam a viabilidade, mas perdem parte do poder germinativo.

Os diferentes índices de germinação obtidos das sementes de *C. regium* coletadas no entorno do DF, podem ser justificados pela ocorrência de um ou mais fatores combinados, como por exemplo, a diferença no vigor das plantas matrizes e embriões de tamanhos variáveis ou fisiologicamente imaturos. Kirizawa (1981) relata que sementes de *C. regium* retiradas de frutos recém coletados germinam rapidamente, enquanto que em sementes armazenadas há mais tempo, o ápice da radícula demora para romper os estratos internos do tegmen.

A maturação das sementes é a fase onde se define todo o comportamento germinativo das sementes. O desenvolvimento da semente pode ser dividido em três fases: a primeira corresponde a divisão e diferenciação celular, a segunda é a fase de acúmulo de substâncias de reserva e a terceira corresponde ao embrião totalmente formado que se torna resistente a dessecação. Nesta fase a semente desidrata perdendo mais de 90% de água, conseqüentemente, o metabolismo cessa e a semente entra no estágio de quiescência ou latência. Ao contrário das sementes dormentes, a semente quiscente irá germinar assim que for reidratada (Taiz & Zeiger, 2004). A partir deste conceito e dos dados obtidos pode-se dizer que as sementes de *C. regium* apresentam dormência, e que esta característica é crescente a partir da dispersão.

Segundo Kelly *et al.* (1992) a identificação do mecanismo de dormência de uma semente tem implicações econômicas e ecológicas. O mecanismo de dormência varia de espécie para espécie, e o conhecimento sobre o desenvolvimento desta semente e do seu mecanismo de troca (permeabilidade), pode facilitar o processo de quebra de dormência desta semente. Sob circunstâncias

naturais a quebra de dormência de uma semente exige a interação dos fatores ecológicos (ação de microrganismos) e fisiológicos (composição da semente).

A Figura 5 mostra que é recomendável o uso de um terceiro tempo de escarificação, pois os índices obtidos com uma ou duas imersões em ácido sulfúrico (T0), ainda resultaram num elevado percentual de sementes duras, principalmente nas parcelas em que os teores de umidade das sementes era menor, o que tornaria obrigatório o uso de um teste de viabilidade nas sementes restantes.

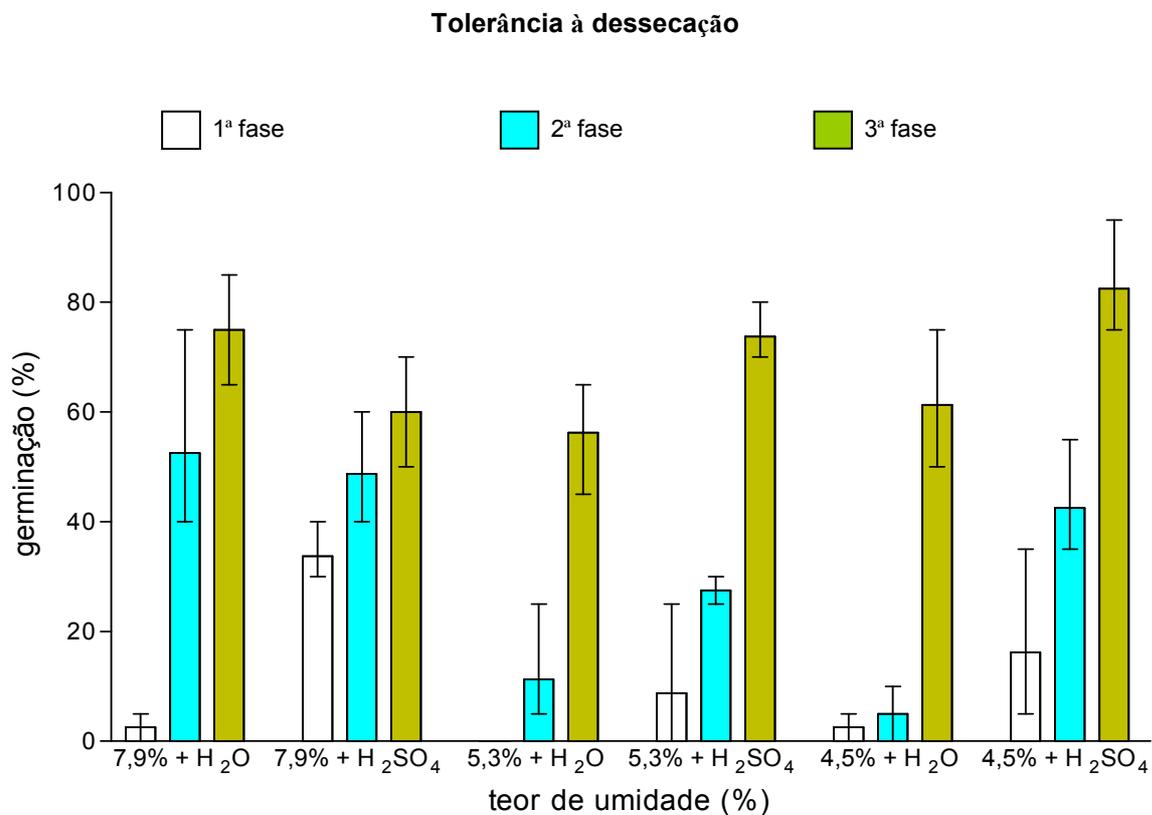


Figura 5. Germinação de sementes de *C. regium* em função dos diferentes teores de umidade da semente.

4.4 Armazenamento em temperaturas sub-zero

Na primeira fase de avaliação após 40 dias de armazenamento, observou-se interação entre os tratamentos (T0 e T1) e as temperaturas testadas (-20°C e nitrogênio líquido (-196°C)), onde T1 foi superior a T0 nas duas temperaturas e o material armazenado a -20°C respondeu com índice de germinação mais elevado em relação aquele armazenado em nitrogênio líquido (Tabela 5).

Estes resultados mostraram que as sementes armazenadas em nitrogênio líquido, apresentaram maior resistência a germinação do que sementes mantida a -20°C. Esta resistência pode ter sido provocada pela dormência acentuada devido a exposição à temperatura extrema, ou por injúria causada pelo congelamento que comprometeu a integridade física da semente. Porém, os dados obtidos na segunda fase de avaliação sugerem que estas sementes permanecem viáveis, sem qualquer tipo de danos aparente a sua estrutura, pois os percentuais de germinação médios obtidos nesta fase foram o dobro daqueles obtidos na primeira fase (Tabela 6). Outro fator a ser considerado é que os teores de umidade das sementes não foram adequados para o congelamento em NL.

Observou-se que as sementes com teores de umidade de 7,9% apresentaram percentuais de germinação mais elevados nas duas temperaturas testadas, em comparação aos teores de 5,3 e 4,5%. A umidade de 7,9% respondeu melhor a -20°C com percentual de germinação de 64%, contra 45% em nitrogênio líquido.

A avaliação da terceira fase mostrou interação dos dados apenas entre os teores de umidade (7,9; 5,3 e 4,5%) e os tratamentos testados (T0 e T1). Sendo que a 7,9% de umidade as sementes apresentaram melhor resposta ao tratamento T0, porém observou-se também que em T1 todos os índices de umidade responderam da mesma forma, ou seja, de acordo com o teste de Tukey e 5% de probabilidade, em T1 não houve diferença significativa entre os desempenhos (Tabela 7).

Tabela 5. Porcentagens de germinação de sementes de *C. regium* em função dos tratamentos e das temperaturas, na 1ª fase de avaliação, após 40 dias de armazenamento.

Tratamentos	Temperaturas	
	-20°C	-196°C
T0	1,00 aB	3,00 aB
T1	25,00 aA	14,00 bA

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido horizontal e as letras maiúsculas (A,B) no sentido vertical.
1ª fase = T0 (H₂O); T1 (H₂SO₄)

Tabela 6. Porcentagens de germinação de sementes de *C. regium* em função das temperaturas e dos teores de umidade da semente, na 2ª fase de avaliação, após 40 dias de armazenamento.

Temperaturas	Umidade (%)		
	7,9	5,3	4,5
-20°C	64,00 aA	43,00 bA	28,00 cA
-196°C	45,00 aB	24,00 bB	37,00 ab A

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido horizontal e as letras maiúsculas (A,B) no sentido vertical.
2ª fase = T0+H₂SO₄; T1+H₂SO₄

Tabela 7. Porcentagens de germinação de sementes de *C. regium* em função dos tratamentos e dos teores de umidade da semente na 3ª fase de avaliação, após 40 dias de armazenamento.

Tratamentos	Umidade (%)		
	7,9	5,3	4,5
T0	89,00 aA	69,00 bA	62,00 bB
T1	76,00 aB	70,00 aA	82,00 aA

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido horizontal e as letras maiúsculas (A,B) no sentido vertical.
3ª fase = T0+H₂SO₄+H₂SO₄; T1+H₂SO₄+H₂SO₄

Comparando-se os resultados de germinação em função dos tratamentos e dos teores de umidade das sementes observou-se que, o lote de semente com 7,9% de umidade submetido a T0, na terceira fase de avaliação apresentou 89% de germinação. Este resultado sugere que teores mais elevados de umidade na semente oferecem menor resistência do tegumento aos efeitos da escarificação química, até um limite onde os danos ao tegumento da semente suplantariam os efeitos benéficos da escarificação.

Observou-se também que quanto menor o teor de umidade, maior é a resistência a germinação. Na terceira fase, as sementes dessecadas a 5,3 e 4,5% de umidade obtiveram em T0 percentuais de germinação inferiores àqueles obtidos em T1, isso corrobora com os dados obtidos nos testes de dessecação, onde observou-se que sementes com menor teor de umidade necessitam de períodos maiores de escarificação.

Na comparação da germinação obtida entre a 1ª e a 3ª fases após 40 dias de armazenamento a temperaturas sub-zero, os resultados descritos pela Tabela 8 sugerem que seria mais vantajoso armazenar as sementes com um teor de umidade próximo de 8%, porque facilitaria o processo de germinação diminuindo custos operacionais. Observa-se que o lote com 7,9% de umidade em T0 na terceira fase, obteve 89% de germinação com apenas dois tempos de escarificação. Porém, estudos mostram que quanto menor o percentual de umidade na semente que for armazenada a temperaturas sub-zero, maior será manutenção da viabilidade e o tempo que estas poderão permanecer armazenadas (Degan *et al.*, 2001; Teófilo *et al.*, 2004). Desta forma para o resultado obtido nesta análise é recomendável utilizar um período a mais de escarificação e armazenar as sementes com 4,5% de umidade, visto que a 5% de probabilidade no final da 3ª fase o desempenho do lote com 7,9% de umidade (89%) e do lote com 4,5% (82%) não apresentaram diferença significativa.

Na segunda fase de avaliação após 40 dias de armazenamento, os dados resultaram numa interação tripla entre as temperaturas de armazenamento (-20 e -196°C), os tratamentos (T0 e T1) e os níveis de umidade da semente (7,9; 5,3 e 4,5%) (Tabela 9).

Tabela 8. Comparação dos percentuais de germinação de sementes de *C. regium* em função dos tratamentos e dos teores de umidade das sementes, obtidos na 1ª e 3ª fases de avaliação após 40 dias de armazenamento.

Tratamentos	1ª fase			3ª fase		
	Umidade da semente (%)					
	7,9	5,3	4,5	7,9	5,3	4,5
T0	3,00 aB	2,00 aB	2,00 aB	89,00 aA	69,00 bA	62,00 bB
T1	32,00 aA	15,00 bA	12,00 bA	76,00 aB	70,00 aA	82,00 aA

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido horizontal e as letras maiúsculas (A,B) no sentido vertical.

1ª fase = T0 (H₂O); T1 (H₂SO₄); 3ª fase = T0+H₂SO₄+H₂SO₄; T1+H₂SO₄+H₂SO₄

Tabela 9. Porcentagens de germinação de sementes de *C. regium* em função a interação tripla entre os tratamentos, umidade das sementes e temperaturas na 2ª fase de avaliação após 40 dias de armazenamento.

Tratamentos	-20°C			-196°C (NL)		
	7,9	5,3	4,5	7,9	5,3	4,5
T0	58,00 aaA	44,00 aaA	12,00 bbB	41,00 aaA	12,00 bbB	35,00 aaA
T1	71,00 aaA	43,00 baA	47,00 baA	50,00 abA	39,00 aaA	38,00 aaA

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias das umidades no sentido horizontal, as letra minúsculas em negrito (a, b) comparam as médias entre as temperaturas no sentido horizontal e as letras maiúsculas (A,B) no sentido vertical comparam as médias dos tratamentos.

2ª fase = T0+H₂SO₄; T1+H₂SO₄

Salomão (2002) relata que a exposição de sementes de algumas espécies tropicais ao NL não superou a dormência destas, mas a combinação de temperatura sub-zero mais escarificação química com ácido sulfúrico favoreceu a germinação de *Mimosa somnians* var. *viscida* e *Stryphnodendron polyphyllum*. A autora observou que, estas duas espécies em relação ao grupo controle aumentaram o percentual de germinação de 65 para 90% e 50 para 90% respectivamente. Mas no caso de *Styrax camporum* no grupo controle o percentual de germinação foi de 90% e após a exposição ao NL a germinação obtida foi de apenas 36%, devido à incidência de contaminação e pela ação do teor de umidade da semente inadequado ao processo.

A análise das temperaturas de armazenamento mostrou que as sementes mantidas a -20°C apresentaram percentuais de germinação maiores do que aquelas mantidas em nitrogênio líquido. A umidade de 7,9% foi a que respondeu favoravelmente com índice mais alto de germinação nas duas temperaturas testadas. O tratamento T1 mostrou melhores resultados em todas as avaliações de umidade e temperaturas de armazenamento.

O armazenamento de sementes em temperatura sub-zero com teores de água mais elevados, também foram descritos por Hellmann *et al.* (2006) estudando o comportamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*). O autor concluiu que, as sementes de *C. echinata* são tolerantes ao congelamento (-20°C), desde que o teor de água inicial seja aproximadamente 12%. Nessa condição, a conservação *ex situ* pode ser utilizada como estratégia para preservar a espécie, fornecendo sementes com elevada qualidade por período de até 12 meses.

Não foi observada a incidência de plântulas anormais ao final da terceira fase de avaliação (Figura 6), e o percentual de sobrevivência não diferiu significativamente entre os tratamentos e as temperaturas testadas, exceto para 7,9% a -20°C. O número reduzido de plântulas vivas neste tratamento foi atribuído a ocorrência de fungos durante a fase de germinação.

Figura 6. Seqüência de germinação de sementes de *C. regium* .



Da esquerda para a direita, a figura mostra as sementes desde a fase de embebição (24 horas após a incubação) até a formação de uma plântula completa (30 dias após incubação).

Na 1ª fase após 80 dias de armazenamento observou-se um percentual de germinação em T1 de 65% para o nível de umidade da semente de 7,9%. Este resultado foi bem acima daqueles obtidos em 5,3 e 4,5% de umidade, que foram 40% e 38% respectivamente. A Tabela 10 mostra que os percentuais de germinação obtidos nesta fase após 80 dias, foi bem acima dos percentuais obtidos nas mesmas condições aos 40 dias de armazenamento.

Comportamento semelhante foi observado quando comparou-se a germinação em função das temperaturas na 1ª fase de avaliação aos 40 dias e aos 80 dias (Tabela 11). Aos 40 dias o percentual em T1 foi superior aquele obtido aos 80 dias de armazenamento, sendo que aos 40 dias para -20°C obteve-se 54% de germinação e para -196°C obteve-se 40% e aos 80 dias os percentuais foram de 25 e 14% respectivamente. Em T0 os percentuais de germinação obtidos foram muito pequenos, não apresentando diferença significativa a 5% de probabilidade entre os períodos de armazenamento. Também foi possível observar que a temperatura de -20°C obteve desempenho superior nos dois tempos de armazenagem.

A Tabela 12 mostra os dados de germinação obtidos em função dos tratamentos (T0 e T1) e das temperaturas (-20°C e -196°C), na primeira e segunda fases após 80 dias de armazenamento. O tratamento T1 obteve os melhores índices de germinação, porém os percentuais obtidos nas duas primeiras fases indicam a

necessidade de um terceiro tempo de escarificação, pois o número de sementes duras restantes ainda era muito elevado, próximo a 50% nos dois períodos.

Tabela 10. Comparação entre as porcentagens de germinação de sementes de *C. regium*, obtidas em função dos teores de umidade da semente e dos tratamentos, na 1ª fase de avaliação aos 40 e 80 dias de armazenamento.

Tratamentos	Período de armazenamento					
	40 dias			80 dias		
	7,9	5,3	4,5	7,9	5,3	4,5
T0	3,00 aB	2,00 aB	2,00 aB	1,00 aB	1,00 aB	1,00 aB
T1	32,00 aA	15,00 bA	12,00 bA	65,00 aA	40,00 bA	38,00 bA

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido horizontal e as letras maiúsculas (A,B) no sentido vertical.

1ª fase = T0 (H₂O); T1 (H₂SO₄)

Tabela 11. Comparação entre as porcentagens de germinação de sementes de *C. regium*, obtidas em função das diferentes temperaturas, na 1ª fase de avaliação aos 40 e 80 dias de armazenamento.

Tratamentos	Períodos de armazenamento			
	40 dias		80 dias	
	-20°C	-196°C	-20°C	-196°C
T0	1,00 aB	1,00 aB	1,00 aB	3,00 aB
T1	54,00 aA	40,00 bA	25,00 aA	14,00 bA

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido horizontal e as letras maiúsculas (A,B) no sentido vertical.

1ª fase = T0 (H₂O); T1 (H₂SO₄)

Tabela 12. Porcentagens de germinação de sementes de *C. regium* obtidas em função dos tratamentos e das temperaturas, em duas fases de avaliação após 80 dias de armazenamento.

Tratamentos	1ª fase		2ª fase	
	-20°C	-196°C	-20°C	-196°C
T0	1,00 aB	1,00 aB	20,00 aB	23,00 aB
T1	54,00 aA	40,00 bA	64,00 aA	50,00 bA

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido horizontal e as letras maiúsculas (A,B) no sentido vertical.

1ª fase = T0 (H₂O); T1 (H₂SO₄)

2ª fase = T0+H₂SO₄; T1+H₂SO₄

Tabela 13. Comparação das médias de germinação obtidas na 3ª fase de avaliação aos 40 e aos 80 dias de armazenamento, considerando os diferentes teores de umidade das sementes.

Armazenamento	Umidade (%)		
	7,9	5,3	4,5
40 dias	82,00 a	72,00 b	69,00 b
80 dias	72,00 a	59,00 b	45,00 c

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3ª fase = T0+H₂SO₄+H₂SO₄; T1+H₂SO₄+H₂SO₄

De acordo com os dados comparativos de umidade, tratamentos e temperaturas testados aos 40 e aos 80 dias de armazenamento foi possível observar que, de modo geral, os percentuais de germinação foram maiores aos 40 dias. Os resultados obtidos após 80 dias de armazenagem, sugerem que sejam realizados novos testes para ajustar o tempo de escarificação, principalmente para os lotes com teor de umidade de 5,3 e 4,5%, onde os percentuais de germinação não atingiram 60% (Tabela 13). É recomendável também que seja realizado um teste de viabilidade para assegurar que as sementes não tenham sofrido nenhum dano pela exposição mais prolongada a temperaturas sub-zero.

Foi observado ainda que, sementes de *C. regium* colocadas para germinar sem escarificação química apresentaram percentuais de germinação muito baixos (1 a 3%) em comparação com as sementes escarificadas, além de a germinação ocorrer de forma lenta e desuniforme. De acordo com Melo *et al.* (1998), embora para espécies nativas o processo de germinação seja lento e gradual, e que o mecanismo de dormência apresente uma vantagem para a perpetuação da espécie no seu habitat natural, este tipo de comportamento inviabiliza qualquer processo de exploração vegetal, principalmente quando há necessidade de uniformizar a germinação e o crescimento de plântulas visando a produção de mudas em escala comercial, por exemplo.

Ao final da 3ª fase após 80 dias de armazenamento, os valores de sementes duras restantes e de plântulas vivas foram muito próximos aos valores obtidos aos 40 dias armazenamento. Não foi constatada a ocorrência de plântulas anormais, tão pouco foram observadas diferenças visuais no crescimento e desenvolvimento das plântulas em análise de laboratório.

Ao final de 80 dias de armazenamento em temperaturas sub-zero, observou-se que a 5% de probabilidade, T1 apresentou os maiores índices de germinação e a conservação das sementes a -20°C foi mais eficiente do que em NL (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14. Comparação das médias de germinação das sementes de *C. regium* obtidas na 3ª fase de avaliação aos 40 e aos 80 dias de armazenamento, considerando os tratamentos testados.

Armazenamento	Tratamentos	
	T0	T1
40 dias	76,00 a	73,00 a
80 dias	49,00 b	68,00 a

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.
 3ª fase = T0+H₂SO₄+H₂SO₄; T1+H₂SO₄+H₂SO₄

Tabela 15. Comparação das médias de germinação obtidas na 3ª fase de avaliação aos 40 e aos 80 dias de armazenamento, considerando as temperaturas testadas.

Armazenamento	Temperaturas	
	-20°C	-196°C
40 dias	75,00 a	74,00 a
80 dias	62,00 a	55,00 a

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.
 3ª fase = T0+H₂SO₄+H₂SO₄; T1+H₂SO₄+H₂SO₄

A espécie observada apenas em nível de laboratório, apresentou índices de sobrevivência de plântulas superior a 90%. Não foi observada a ocorrência de plântulas anormais ou sintomas de toxicidade em função da utilização da escarificação química. Mas a sobrevivência das plântulas foi afetada pela incidência de *Fusarium moniliforme* (Figura 7) que é um fungo endofítico que causa podridão de raiz e prejudicou a germinação e a sobrevivência das plântulas. Nas sementes foi diagnosticada a presença de *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium spp.* e *Curvularia stapeliae*, fungos de ocorrência comum também em sementes da cultura do algodão comercial e que de acordo com Barreto *et al.*, (2004), podem afetar a germinação e a sobrevivência das plântulas.

Observou-se ainda que, os lotes armazenados por 80 dias em nitrogênio líquido, apresentaram um índice de contaminação fungica mais elevado do que nos demais experimentos. Berjak & Dumet (1996) descrevem que tecidos de sementes de algumas espécies após exposição ao nitrogênio líquido, sofrem danos que os tornam mais suscetíveis a ataques de fungos.

Constatou-se neste experimento, que a incidência de fungos foi maior nos lotes com umidade de 7,9%. Fato semelhante foi descrito por Salomão (2002) em algumas espécies tropicais (*Sterculia striata* A. St.-Hill. & Naudin e *Styrax camporum* Pohl.), a contaminação elevada provavelmente tenha acontecido devido à interação entre a umidade inadequada do lote de sementes e pela temperatura de descongelamento após exposição ao NL.

Salomão (2002) descreve situação semelhante ao estudar o comportamento de varias espécies tropicais após exposição ao nitrogênio líquido. A autora constatou uma elevada infestação das sementes após exposição ao NL, por fungos saprofiticos do tipo *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. As espécies mais afetadas foram *Pseudobombax tomentosum* (Mart. & Zucc.) Robyns, *Machaerium aculeatum* (Vell.) Stellfeld, *Dalbergia miscolobium* Benth., *Dimorphandra mollis* Benth., *Ormosia fastigiata* Tul., *Bauhinia acuruana* Moric. e *Bauhinia unguolata* L.. O nível de contaminação interferiu nos resultados da avaliação de germinação e conseqüentemente na resposta destas espécies a exposição ao NL.



Figura 7. Plântula de *C. regium* apresentando necrose na ponta da raiz.

Para a exposição de sementes ortodoxas a temperatura criogênica, sugere-se conteúdos de umidade inferiores a 10%, porém é necessário encontrar um intervalo de umidade favorável ao congelamento, que pode variar em cada espécie estudada. Para *Tabebuia serratifolia* foi identificado um intervalo de umidade entre 5,4 e 14,0% que é benéfico para sua criopreservação. No entanto, para *Tabebuia aurea* não foi possível estabelecer um intervalo de umidade aceitável entre 7,0 e 22,6% este último, foi o teor de umidade crítico para as sementes possivelmente por ter ultrapassado o limite máximo de umidade (Santos & Salomão, 2007).

Para *C. regium* os teores de umidade 7,9; 5,3 e 4,5%, responderam de modo favorável às condições de germinação impostas neste trabalho, embora para a

criopreservação haja necessidade de determinar o teor de umidade favorável ao processo.

Os valores relativos aos percentuais de germinação, sementes duras, condições de germinação e teor de umidade inicial do lote de sementes, obtidos neste experimento, estão de acordo com os dados obtidos por Salomão *et al.* (2003) estudando as características físicas e fisiológicas, armazenamento e germinação de espécies nativas do bioma cerrado. A Tabela 16 mostra os percentuais de sementes duras restantes após as três fases de avaliação em cada etapa do experimento.

Tabela 16. Percentual de sementes duras de *C. regium* após o final das três etapas de avaliação dos experimentos de germinação, dessecação e armazenamento em temperaturas sub-zero.

Experimento	Sementes duras (%)
Germinação	8,00
Dessecação	12,00
-20°C (40 dias)	11,00
NL (40 dias)	25,00
-20°C (80 dias)	9,00
NL (80 dias)	27,00

A análise dos valores de germinação em cada fase, mostrou que houve correlação forte entre cada fase e correlação negativa entre as fases e o número de sementes duras, ou seja, a medida que aumenta a germinação, diminui o número de

sementes duras em cada fase. Esta informação demonstra a confiabilidade dos dados coletados (Tabela 17).

Tabela 17. Análise das correlações lineares entre todas as variáveis analisadas nos experimentos de germinação, dessecação e armazenamento em temperaturas sub-zero por 40 e 80 dias, de sementes de *C. regium*.

X1	X2	X3	X4
X1	0,77	0,66	- 0,64
X2		0,81	- 0,57
X3			- 0,67

A – Correlações lineares entre os dados do experimento da germinação

X1	X2	X3	X4
X1	0,53	NS	- 0,44
X2		0,53	- 0,74
X3			- 0,58

B – Correlações lineares entre os dados do experimento da dessecação

X1	X2	X3	X4
X1	0,55	NS	NS
X2		0,43	- 0,49
X3			- 0,59

C – Correlações lineares entre os dados do experimento de armazenamento em temperatura sub-zero por 40 dias

X1	X2	X3	X4
X1	0,81	0,62	- 0,36
X2		0,89	- 0,54
X3			- 0,10

D - Correlações lineares entre os dados do experimento de armazenamento em temperaturas sub-zero por 80 dias

5. Conclusões

A combinação de escuro e escarificação química em ácido sulfúrico por 3 períodos de 40 minutos cada, foi eficiente na superação da dormência das sementes do algodão-do-campo.

As sementes de *C. regium* podem ser classificadas como ortodoxas, uma vez que suportaram bem a dessecação e a exposição a temperaturas sub-zero.

É necessário determinar o teor de umidade favorável para o armazenamento de sementes de *C. regium* em nitrogênio líquido. Para o armazenamento a temperatura de -20°C, o melhor teor de umidade foi de 7,9%, sendo esta uma alternativa viável de conservação *ex situ* desta espécie.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M.C. F.; COELHO, M. F. B.; ALBRECHT, J.M.F. Germinação de sementes de espécies medicinais do cerrado. In: COELHO, M.F.B.; COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J.L.D. (organizadores) Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais. **Anais do I Seminário Mato-grossense de Etnobiologia, Etnoecologia e II Seminário Centro-oeste de Plantas Medicinais**. Cuiabá: UNICEN, p. 157-182, 2003.

BARRETO, A.F.; ARAUJO, E.; BONIFACIO, B.F.; SILVA, O.R.R.F.; BELEM, L.F. Qualidade fisiológica e a incidência de fungos em sementes de algodoeiro herbáceo tratadas com extrato de Agave. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.8, n.2/3, p. 839-849, 2004.

BERJAK, P.; DUMET, D. Cryopreservation of seeds and isolated embryonic axes of neem (*Azadirachta indica*). **Cryo-Letters**, v.17, n.2, p. 99-104, 1996.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Brasília, 365 p., 1992.

CARDOSO, V.J.M. Dormência: estabelecimento do processo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, Cap. 5, p. 95-108, 2004.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed., Jaboticabal: FUNEP, 588p., 2000.

DEGAN, P.; AGUIAR, I.B.; SADER, R.; PERECIN, D.; PINTO, L.R. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de Ipê-branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.3, p.492-496, 2001.

DIAS, D.C.F.S. Dormência em Sementes: mecanismos de sobrevivência das espécies. **Seed News**, ano XI, v. 4, 2005.

EIRA, M.T.S.; DIAS, T.A.B.; MELLO, C.M.C. Comportamento fisiológico de sementes de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) no armazenamento. Brasília: **Horticultura Brasileira**, v.13, n.1, p. 32-34, 1995.

EIRA, M.T.S.; SALOMÃO, A.N.; CUNHA, R.; MELLO, C.M.C.; TANAKA, D.M. Conservação de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. – Leguminosae. II Congresso Nacional Sobre Essências Nativas. **Anais**. p. 523-526. Brasília, 1992.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour. *Journal of Experimental Botany*, v.41, n.9, p.1167-1174, 1990.

FAIAD, M.G.R.; GOEDERT, C.O.; WETZEL, M.M.V.S.; SILVA, D.B.; PEREIRA NETO, L. G. **Banco de Germoplasma de sementes da Embrapa**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 31p. Documentos, 71, 2001.

FAIAD, M.G.R.; GONDIM, M.T.P.; FERREIRA, F.R.; MIRANDA, A.R.; BARBOSA, N.F.; VASCONCELOS, L.C. **Conservação de germoplasma – semente a longo prazo**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Circular Técnica, n.1, 1998.

GOEDERT, C. Conservação de germoplasma-semente. In: **Anais do Encontro sobre recursos genéticos**. Jaboticabal, p. 78-95, 1988.

GUERRA, N.B.; LIVERA, A.V.S. Correlação entre o perfil sensorial e determinações físicas e químicas do abacaxi cv. pérola. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.21,n.1,p.32-35, 1999.

HELLMANN, M.E.; MELLO, J.I.O.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; BARBEDO, C.J. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, n.1, p.93-101, 2006.

KELLY, K.M.; VAN STADEN, J.; BELL, W.E. Seed coat structure and dormancy. **Plant Growth Regulation**, v.11, n.3, p. 201-209, 1992.

KIRIZAWA M. **Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger - Cochlospermaceae**. São Paulo: Universidade de São Paulo. Tese de doutorado. 437 p., 1981.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, 173 p., 1983.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 230p., 1987.

MELO, J.T.; SILVA, J.A.; TORRES, R.A.A.; SILVEIRA, C.E.S.; CALDAS, L.S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, p. 195-244, 1998.

MELLO, C.M.C.; EIRA, M.T.S. Conservação de sementes de jacarandá mimoso (*Jacaranda acutifolia* Humb & Bonpl.) – Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n. 2, p. 193-196, 1995.

METIVIER, J.R. Dormência e Germinação. In: FERRI, M.G. (coord). **Fisiologia vegetal**. V. 2, São Paulo – EPU. Editora da Universidade de São Paulo, p. 343-392, 1979.

MOLINARI, A.C.F.; COELHO, M.F.B.; ALBUQUERQUE, M.C.F. Germinação de sementes da planta medicinal algodão do campo (*Cochlospermum regium* (Mart. et Schl.) Pilg.) – Cochlospermaceae. **Agricultura Tropical**, v. 2, n. 1., p. 25-31, 1996.

POPINIGIS, P. Avaliação da qualidade fisiológica. In: **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, p. 249-289, 1977.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*. v.1, p. 499-514, 1973.

ROLSTON, M. P. Water impermeable seed dormancy. **The Botanical Review**, Lancaster, v.44, n.3, p.365-396, 1978.

SALES, D.M.; COELHO, M.F.B.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; FERRONATO, A. Superação de dormência por ácido sulfúrico em sementes de algodão-do-campo (*Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilg.) – Cochlospermaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, n.2, p. 65-71, 2002.

SALES, D.M. **Germinação de sementes de algodão-do-campo [*Cochlospermum Regium* (Mart & Schl.) Pilg.] – Cochlospermaceae em função do ácido sulfúrico, substrato, luz e temperatura**. Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso. Dissertação de mestrado, 97 p., 2001.

SALOMÃO, A.N.; WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T.B.; MEDEIROS, M.B. de; SANTOS, I.R.I. dos; SANTOS, A.A.; SILVA, G.P. da; MUNDIM, R.C.; PEREIRA, J.B.; REZENDE, J.M.; MOREIRA, G.A. **Desenvolvimento de metodologias para a conservação de germoplasma semente, resgatado em áreas de aproveitamento de cinco hidrelétricas no Bioma cerrado**. Documento 138. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

SALOMÃO, A.N.; SOUSA-SILVA, J.C. Germinação, análise e armazenamento de sementes. In: SALOMÃO, A.N.; SOUZA-SILVA, J.C.; DAVIDE, A.C.; GONZÁLES, S.; TORRES, R.A.A.; WETZEL, M.M.V.S.; FIRETTI, F.; CALDAS, L.S. **Germinação de sementes e produção de mudas de plantas do Cerrado**. Rede de Sementes do Cerrado. Brasília, p. 03-10., 2003.

SALOMÃO, A.N. Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, vol.14 n.2 Londrina, p. 133-138, 2002.

SANTOS, I.R.I; SALOMÃO, A.N. Criopreservação de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (editor técnico) **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.545-574, 2007.

SANTOS, A.F.; MEDEIROS, A.C.S.; SANTANA, D.L.Q. Fungos associados as sementes de espécies arbóreas da mata atlântica. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.42. Colombo: Embrapa Floresta, p.57-70, 2001.

SILVA, D.B.; WETZEL, M.M.V.; SALOMÃO, A.N.; FAIAD, M.G.R. Conservação de germoplasma semente em longo prazo. In: NASS, L.L. (editor técnico) **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.441-472, 2007.

TAIZ, L.Z.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 581-612, 2004.

TEÓFILO, E.M.; SILVA, S.O.; BEZERRA, A.M.O.; MEDEIROS FILHO, S.; SILVA, F.D.B. Qualidade fisiológica de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* ALLEMÃO) em função do tipo de embalagem, ambiente e tempo de armazenamento. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n.2, p. 371-376, 2004.

VIDAVER, W. Light and seed germination. In: KHAN, A.A. (ed.). **The physiology and biochemistry so seed dormancy and germination**. Amsterdam: North Holland Publishing Co., p.181-190, 1977.

VERTUCCI, C.W.; ROOS, E.E. Theoretical basis of protocols for seed storage. **Plant Physiology** 94: p. 1019-1023, 1990.

WALTER, B.T.; CAVALCANTI, T.B.; BIACHETTI, L.B.; VALLS, J.F.M. Coleta de germoplasma vegetal: relevância e conceitos básicos. In: WALTER, B.T. CAVALCANTI, T.B. (org.) **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 27-56, 2005.

WETZEL, M.M.V. DA S. **Época de dispersão e fisiologia de sementes do cerrado**. Universidade de Brasília: Departamento de Ecologia. Tese de doutorado, 173 p., 1997.

7. ANEXOS

7.1 Tabelas de análise de variância para o experimento de condições de germinação, sendo tres tratamentos (T0, T1 e T2) e dois ambientes (claro e escuro).

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 1ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TRATAMEN	2	25725.0000000	12862.5000000	569.9077	0.00001
AMBIENTE	1	26.0416667	26.0416667	1.1538	0.29729
TRA*AMB	2	58.3333333	29.1666667	1.2923	0.29886
RESIDUO	18	406.2500000	22.5694444		
TOTAL	23	26215.6250000			

MEDIA GERAL = 25.625000 COEFICIENTE DE VARIACAO = 18.539%

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 2ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TRATAMEN	2	7243.7500000	3621.8750000	26.8840	0.00003
AMBIENTE	1	504.1666667	504.1666667	3.7423	0.06605
TRA*AMB	2	439.5833333	219.7916667	1.6314	0.22226
RESIDUO	18	2425.0000000	134.7222222		
TOTAL	23	10612.5000000			

MEDIA GERAL = 56.250000 COEFICIENTE DE VARIACAO = 20.635%

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 3ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TRATAMEN	2	1477.0833333	738.5416667	8.1808	0.00327
AMBIENTE	1	416.6666667	416.6666667	4.6154	0.04330
TRA*AMB	2	27.0833333	13.5416667	0.1500	0.86192
RESIDUO	18	1625.0000000	90.2777778		
TOTAL	23	3545.8333333			

MEDIA GERAL = 77.08333 COEFICIENTE DE VARIACAO = 12.326 %

7.2 Tabelas de análise de variância para o experimento de tolerância a dessecação.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 1ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
UMIDADE	2	7.8063036	3.9031518	6.3683	0.00819
MEIO	1	20.9147470	20.9147470	34.1242	0.00007
UMI*MEI	2	4.7132481	2.3566241	3.8450	0.03976
RESIDUO	18	11.0322124	0.6129007		
TOTAL	23	44.4665111			

MEDIA GERAL = 4.332693 COEFICIENTE DE VARIACAO = 18.069 %

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 2ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
UMIDADE	2	28.9353039	14.4676520	28.5108	0.00002
MEIO	1	15.1010317	15.1010317	29.7590	0.00012
UMI*MEI	2	12.8497066	6.4248533	12.6612	0.00058
RESIDUO	18	9.1339942	0.5074441		
TOTAL	23	66.0200364			

MEDIA GERAL = 6.204769 COEFICIENTE DE VARIACAO = 11.481 %

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 3ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
UMIDADE	2	0.5928701	0.2964350	1.1262	0.34696
MEIO	1	1.2208476	1.2208476	4.6381	0.04284
UMI*MEI	2	5.1679795	2.5839898	9.8167	0.00161
RESIDUO	18	4.7380213	0.2632234		
TOTAL	23	11.7197185			

MEDIA GERAL = 8.811168 COEFICIENTE DE VARIACAO = 5.823 %

7.3 Tabelas de análise de variância para o experimento de conservação em temperaturas sub-zero, período de armazenamento de 40 dias.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 1ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
UMIDADE	2	8.1593279	4.0796640	6.4746	0.00426
TEMPERAT	1	1.4240838	1.4240838	2.2601	0.13787
MEIO	1	42.5416066	42.5416066	67.5156	0.00001
UMI*TEM	2	0.7353463	0.3676731	0.5835	0.56808
UMI*MEI	2	6.5194128	3.2597064	5.1733	0.01058
TEM*MEI	1	5.2284037	5.2284037	8.2977	0.00667
UMI*TEM*MEI	2	0.7656968	0.3828484	0.6076	0.55493
RESIDUO	36	22.6836102	0.6301003		
TOTAL	47	88.0574883			

MEDIA GERAL = 4.429876 COEFICIENTE DE VARIACAO = 17.919 %

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 2ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
UMIDADE	2	24.3771509	12.1885754	18.7418	0.00003
TEMPERAT	1	5.1537842	5.1537842	7.9247	0.00778
MEIO	1	14.3439930	14.3439930	22.0561	0.00013
UMI*TEM	2	10.7540490	5.3770245	8.2680	0.00143
UMI*MEI	2	1.5784801	0.7892401	1.2136	0.30900
TEM*MEI	1	0.0451112	0.0451112	0.0694	0.78960
UMI*TEM*MEI	2	12.2789302	6.1394651	9.4404	0.00076
RESIDUO	36	23.4123077	0.6503419		
TOTAL	47	91.9438063			

MEDIA GERAL = 7.031263 COEFICIENTE DE VARIACAO = 11.469 %

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 3ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
UMIDADE	2	4.2638005	2.1319003	5.2630	0.00990
TEMPERAT	1	0.0126513	0.0126513	0.0312	0.85489
MEIO	1	0.3434279	0.3434279	0.8478	0.63379
UMI*TEM	2	1.0756944	0.5378472	1.3278	0.27713
UMI*MEI	2	6.2266548	3.1133274	7.6859	0.00200
TEM*MEI	1	0.1290977	0.1290977	0.3187	0.58249
UMI*TEM*MEI	2	1.5727885	0.7863943	1.9414	0.15649
RESIDUO	36	14.5826008	0.4050722		
TOTAL	47	28.2067160			

MEDIA GERAL = 9.181949 COEFICIENTE DE VARIACAO = 6.932 %

7.4 Tabelas de análise de variância para o experimento de conservação em temperaturas sub-zero, período de armazenamento de 80 dias.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 1ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
UMIDADE	2	7.9677900	3.9838950	9.7246	0.00066
TEMPERAT	1	2.6803067	2.6803067	6.5426	0.01422
MEIO	1	215.2592444	215.2592444	525.4452	0.00001
UMI*TEM	2	0.1554927	0.0777463	0.1898	0.82931
UMI*MEI	2	7.2459646	3.6229823	8.8437	0.00104
TEM*MEI	1	2.0506087	2.0506087	5.0055	0.02973
UMI*TEM*MEI	2	0.6485829	0.3242915	0.7916	0.53534
RESIDUO	36	14.7481287	0.4096702		
TOTAL	47	250.7561187			

MEDIA GERAL = 5.428021 COEFICIENTE DE VARIACAO = 11.792 %

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 2ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
UMIDADE	2	35.8877108	17.9438554	22.7734	0.00001
TEMPERAT	1	1.1475711	1.1475711	1.4564	0.23359
MEIO	1	80.8346047	80.8346047	102.5909	0.00001
UMI*TEM	2	0.8709171	0.4354586	0.5527	0.58538
UMI*MEI	2	4.1279470	2.0639735	2.6195	0.08498
TEM*MEI	1	3.6119538	3.6119538	4.5841	0.03689
UMI*TEM*MEI	2	2.0062522	1.0031261	1.2731	0.29192
RESIDUO	36	28.3655241	0.7879312		
TOTAL	47	156.8524808			

MEDIA GERAL = 6.889224 COEFICIENTE DE VARIACAO = 12.885 %

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA 3ª fase

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
UMIDADE	2	22.0513767	11.0256883	16.9319	0.00004
TEMPERAT	1	2.0978491	2.0978491	3.2216	0.07761
MEIO	1	15.6302131	15.6302131	24.0030	0.00009
UMI*TEM	2	0.0648904	0.0324452	0.0498	0.95145
UMI*MEI	2	3.2719513	1.6359757	2.5123	0.09345
TEM*MEI	1	2.3907604	2.3907604	3.6714	0.06022
UMI*TEM*MEI	2	0.5827724	0.2913862	0.4475	0.64826
RESIDUO	36	23.4423802	0.6511772		
TOTAL	47	69.5321937			

MEDIA GERAL = 8.273285 COEFICIENTE DE VARIACAO = 9.754 %

CAPITULO II

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ALGODÃO-DO-CAMPO [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrenk) Pilger – Cochlospermaceae SOB REGIME DE CRESCIMENTO MÍNIMO.

RESUMO

Cochlospermum regium é uma planta de áreas de cerrado, caatinga e pantanal. Na medicina popular é conhecida por “algodão-do-campo” e suas raízes são utilizadas para o tratamento de infecções uterinas, intestinais, gastrite, úlceras e artrite. Atualmente, o extrativismo e a destruição dos habitats naturais colocaram o algodão-do-campo na lista de espécies medicinais nativas prioritárias para conservação *ex situ*. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para a conservação *in vitro* do algodão-do-campo e fornecer subsídios para estudos de micropropagação da espécie. Sementes de algodão-do-campo foram testadas quanto à germinação *in vitro* pela escarificação ou não das sementes em ácido sulfúrico e inoculação em meio de cultura MS. Para a conservação *in vitro*, microestacas retiradas das plântulas germinadas *in vitro* foram avaliados por 90 dias sob três regimes de temperatura (10°C, 20°C e 25°C) e em três concentrações de meio WPM (½, ¾ e pleno). Verificou-se que sementes escarificadas apresentaram percentual de germinação *in vitro* de 93,3% aos 30 dias, valor significativamente superior aos 13,3% observados nas sementes não escarificadas. A conservação da espécie *in vitro* mostrou-se viável, desde que os explantes sejam mantidas em câmara de crescimento a 20°C em meio de cultura ½ WPM. Sob estas condições os explantes mantiveram um crescimento mínimo e percentual de sobrevivência de 100%, após três meses de avaliação.

Palavras-chave: Algodão-do-campo, conservação *ex situ*, micropropagação, germinação, preservação, plantas medicinais.

CHAPTER II

***In vitro* conservation of *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrenk) Pilger – Cochlospermaceae under minimal growth storage**

ABSTRACT

Cochlospermum regium is a plant from Savanna, Caatinga and Pantanal biomes of Brazil. In the popular medicine is called “algodão-do-campo” and its roots are used for treatment of uterine and intestinal infections, gastritis, ulcers and arthritis. Actually, the extrativism and destruction of natural habitats turn the “algodão-do-campo” an important medicinal specie for *ex situ* conservation. The objective of this work was to develop a methodology for *in vitro* conservation and to carried out subsidies for studies of micropropagation of this specie. Seeds of “algodão-do-campo” were evaluated in relationship to the *in vitro* germination by scarification or not of the seeds in sulfuric acid and inoculation in MS culture medium. For *in vitro* conservation, shoots from plantlets developed *in vitro* were maintained by 90 days under three temperature of conservation (10°C, 20°C and 25°C) and three concentrations of salts of WPM medium ($\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ and full). It was verified that scarified seeds presented 93.3% of *in vitro* germination after 30 days of cultivation, a value significantly superior than 13.3% observed on non scarified seeds. The *in vitro* conservation of “algodão-do-campo” under minimal growth storage was shown viable, since the explants be maintained at 20°C and in $\frac{1}{2}$ WPM medium. Under these conditions the explants present 100% of survival after three months of evaluation.

Key words: Algodão-do-campo, *ex situ* conservation, micropropagation, germination, preservation, medicinal plants.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Micropropagação - Histórico e definição

Os trabalhos sobre cultura de tecidos vegetais datam de 1902, quando o botânico alemão Gottlieb Haberlandt cultivou células de tecidos somáticos de várias espécies em solução nutritiva. Seus experimentos não obtiveram êxito, mas constituíram o marco inicial da propagação de plantas *in vitro*. Porém, o primeiro trabalho com resultados concretos só foi publicado na década de 30 por Philip White com a elaboração de um meio capaz de manter o crescimento de ápices radiculares de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) por um longo período (White, 1939). A teoria que norteia a cultura de tecidos baseia-se na totipotencialidade celular, ou seja, que a célula vegetal é autônoma e contém toda a informação genética necessária para originar um organismo completo, desde que condições específicas ao cultivo desta sejam previamente estabelecidos (Kerbauy, 1997; Cid, 2001).

A cultura de tecidos de plantas é um processo por meio do qual fragmentos, propágulos ou partes vegetativas, denominadas explantes, são isolados de plantas matrizes, desinfestados e assepticamente cultivados em meio de cultura nutritivo apropriado e sob condições adequadas de temperatura e fotoperíodo. Depois de estabelecidos, a multiplicação é feita através de sucessivos sub-cultivos até que se obtenha o número suficiente de propágulos que se quer multiplicar. Em seguida os brotos multiplicados são então transferidos para outro meio de cultura para formação das raízes, obtendo-se assim, plantas completas. Essas são plantadas em substrato para a aclimatização e levadas à casa de vegetação, antes de serem transferidas para o campo definitivamente (Cid, 2001).

1.2 Aplicabilidades

As técnicas da cultura de tecidos podem ser empregadas para várias finalidades, como por exemplo, a produção de mudas em larga escala, limpeza clonal, propagação de híbridos e conservação de germoplasma vegetal, a qual é considerada parte de uma estratégia geral de conservação *ex situ*. Ressalta-se que em alguns casos, a conservação *in vitro* pode ser a única estratégia para conservar estas espécies, como no caso de plantas com sementes recalcitrantes e de difícil

propagação vegetativa por métodos convencionais (Roca *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1998).

Outra finalidade importante da cultura de tecidos é facilitar a propagação em larga escala de espécies de propagação vegetativa e de importância econômica, como é feito rotineiramente para culturas como a banana, batata e cana-de-açúcar. Mas a multiplicação em larga escala também pode ser útil para espécies de onde a obtenção da matéria prima se dá por extrativismo, e o número de indivíduos na população pode não ser suficiente para atender a demanda. Neste caso, o cultivo sistematizado *in vitro* pode garantir a produção regular e em larga escala. Mas para estabelecer estes cultivos é necessário dispor de material propagativo inicial, como sementes, tubérculos, estolões, ou alguma outra estrutura que permita a multiplicação da planta alvo (Pereira, 2003).

De modo geral, os explantes mais utilizados para o estabelecimento de cultivos *in vitro* são os meristemas, gemas apicais e axilares, segmentos nodais, sementes e embriões zigóticos, sendo a escolha de um ou outro tipo de explante dependente do objetivo do trabalho. Fragmentos de folhas, raízes e entrenós também podem ser utilizados como fonte de explantes, embora para estes tipos de explantes estratégias adequadas de regeneração devam ser desenvolvidas por tratar-se de materiais sem pontos ativos de crescimento, fato que leva a necessidade de induzir a desdiferenciação das células somáticas, seja pela via direta ou indireta (fase de calo) (Moraes *et al.*, 2007).

O uso de sementes como explante só é indicado nos casos em que a assepsia se torna viável. Seu uso proporciona algumas vantagens em relação aos demais tipos de explantes, como o rápido crescimento e, conseqüentemente, a disponibilidade de material mais rapidamente para as etapas seguintes do cultivo, bem como a facilidade de enraizamento da cultura, visto que vigor e enraizamento adventício são características naturais de tecidos em estado juvenil (Moraes *et al.*, 2007; Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998).

Um dos explantes mais rotineiramente utilizados para estabelecer cultivos *in vitro* são os meristemas, especialmente quando se quer eliminar contaminantes endofíticos, como fungos, bactérias e vírus. Plantas propagadas vegetativamente por meio de técnicas convencionais, como estaquia ou enxertia, uma vez infectadas por vírus, micoplasmas, bactérias e fungos endógenos, transmitem estes patógenos às gerações subseqüentes, provocando uma diminuição progressiva no rendimento

das culturas. Ressalte-se, que o fato de uma planta ter sido “limpa” de vírus, ou de outro patógeno em laboratório, não confere a ela imunidade a novas infecções. Porém, a substituição das populações de plantas, após alguns anos de cultivo em campo por novas matrizes produzidas em laboratório é condição essencial para uma boa qualidade e produtividade dos cultivos. O uso de meristemas é indicado pelo fato de que a distribuição de vírus e outros patógenos na planta não ser uniforme e devido ao tamanho reduzido e restrito contato das células meristemáticas com os tecidos adjacentes, fato que os tornam praticamente livres destes microrganismos. Por isso o isolamento cuidadoso de pequenas porções de regiões meristemáticas (0,1 a 0,3mm) e a cultura em meios de cultura apropriados, pode permitir a obtenção em escala econômica de plantas clonadas livres de patógenos (Kerbauy, 1997). Esta metodologia já foi empregada com sucesso na obtenção de clones livres de patógenos em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Flores *et al.*, 2006) e *Mentha viridis* L. (Lima *et al.*, 2007a), sendo rotineiramente empregada para a produção de mudas isentas de vírus em culturas como a batata, morango e cana-de-açúcar.

1.3 A cultura de tecidos com plantas medicinais

Na pesquisa com plantas medicinais, a cultura de tecidos pode auxiliar em inúmeros trabalhos de pesquisa, tais como: (a) facilitar a produção de clones, mais uniformes, em larga escala e livre de patógenos; (b) produzir híbridos, por hibridação somática, através de fusão de protoplastos; (c) produzir haplóides; (d) obter mutantes portadores de caracteres desejáveis, por meio do uso de agentes mutagênicos ou por variação somaclonal; (e) se utilizar de plantas como biorreatores para a expressão de genes específicos; (f) produzir plantas geradoras de vacinas e; (g) conservação de germoplasma vegetal *in vitro* e por criopreservação pela manutenção do material vegetal durante períodos prolongados sob condições específicas de crescimento e desenvolvimento (Amaral & Silva, 2003). Além disso, as diversas técnicas de cultura de tecidos permitem interferir nas rotas metabólicas dos vegetais, mediante o cultivo de plantas em meio preparado com agentes estressantes, elicitores e mutagênicos, que afetam a qualidade e a quantidade dos princípios ativos produzidos, bem como a composição e o teor dos mesmos (Amaral & Silva, 2003). Kagiki *et al.* (2004) estudaram a influencia de várias combinações de 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e Kinetina (KIN) em explantes de diferentes origens

no crescimento e produção de saponinas em calos de *Pfaffia glomerata*. De acordo com os resultados, foi possível observar que o conteúdo de saponinas totais na raiz e no caule de *P. glomerata in vivo* foi de 3,74% e 2,69% respectivamente. Em meio de cultura suplementado com altas concentrações de sacarose, as células em suspensão provenientes de calos de explantes radiculares e caulinares, a produção de saponinas aumentou para 5,92%.

Resultados satisfatórios também foram descritos por França (2003) para *Eclipta alba*, onde plantas cultivadas *in vitro* em meio de cultivo suplementado com BAP (benzilaminopurina), foram mais eficientes na produção de vedelolactona.

Por outro lado, Souza *et al.* (2003) desenvolveram protocolos para a micropropagação de *Lychnophora pinaster* Mart., uma planta medicinal do cerrado muito utilizada na medicina tradicional e ameaçada de extinção. Os resultados demonstraram que meios de cultura menos concentrados permitiram melhor germinação de embriões e crescimento de plantas. O meio ¼ MS proporcionou melhores condições de cultivo e, quando suplementado com sacarose e BAP, resultou em maior índice de multiplicação de plantas. Neste sentido, complementando o trabalho de micropropagação da *L. pinaster* Mart., Souza *et al.* (2004) desenvolveram protocolo para o enraizamento e aclimação da espécie. Os resultados evidenciaram que o melhor enraizamento ocorreu quando as plantas permaneceram durante 15 dias em presença de 2,0 mg.L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). Considerando-se que é uma espécie endêmica restrita ao bioma cerrado, a aclimação foi feita utilizando solo do local de ocorrência da espécie, e a sobrevivência das plantas foi de 100%.

Algumas espécies medicinais que são propagadas por sementes apresentam grande variabilidade quanto à morfologia e o teor de metabólitos, sendo o gênero *Maytenus* um exemplo clássico. Conforme descrito por Pereira (1998) a micropropagação é uma das formas de minimizar estes efeitos indesejados. Para *Maytenus aquifolium* Mart e *Maytenus ilicifolia* Mart a concentração de 3,0 mg.L⁻¹ de BAP produziu a maior proliferação de brotos, enquanto que 0,4 mg.L⁻¹ de BAP associado com 0,2 mg.L⁻¹ de AIA induziu maior crescimento em altura. Os explantes com maior potencial para o desenvolvimento *in vitro* nestas espécies foram gemas axilares, retiradas de ramos juvenis.

O objetivo deste trabalho foi adequar uma metodologia para a conservação *in vitro* do algodão-do-campo (*Cochlospermum regium*) e fornecer subsídios para estudos de micropropagação da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Conservação de Germoplasma Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília – DF. As sementes utilizadas como fontes primárias de explantes foram obtidas de frutos maduros, em plantas adultas de populações nativas de algodão-do-campo coletadas no entorno do Distrito Federal. As coletas foram realizadas semanalmente entre os meses de julho e setembro de 2006.

2.1 Germinação *in vitro*

Para o teste de germinação, as sementes foram retiradas dos capulhos, sendo o linter removido de forma manual, juntamente com outras impurezas, como restos de folhas, caules e cascas e armazenadas em sacos aluminizados em temperatura ambiente.

Após 48 horas de imersão em água destilada, a desinfestação foi realizada deixando-se as sementes mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% (água sanitária comercial) por 20 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada e depositadas em placas de Petri.

Para avaliar a existência de uma possível dormência das sementes, o lote inicial foi subdividido em dois outros menores contendo 30 sementes cada. No primeiro lote (T1), as sementes foram submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico (H_2SO_4) por 40 minutos, e no segundo lote (T2), as sementes foram inoculadas sem tratamento químico.

O meio de germinação foi formado pelos sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), reduzido da metade das concentrações de sais de macro e micronutrientes, suplementado com 20 g.L^{-1} de sacarose, 5 mg.L^{-1} de Agar e 2 g.L^{-1} de carvão ativado. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7\pm 0,1$ utilizando-se NaOH (Hidróxido de sódio) e/ou HCl (Ácido clorídrico) em solução de 0,5 N, antes da adição do geleificante ágar e autoclavagem. O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio (20 x 150 mm) na quantidade de 10 mL por tubo e esterilizados por autoclavagem à $120\text{ }^\circ\text{C}$ e 1,3 atm de pressão, durante 20 minutos.

As sementes foram inoculadas nos tubos de ensaio em câmara de fluxo laminar, com auxílio de placas de Petri e pinças. Após a inoculação das sementes, os tubos de ensaio foram tampados com papel alumínio, lacrados com parafilme e levados para sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornecidas por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia (Sylvania, 20W).

As observações referentes à germinação das sementes foram realizadas diariamente nos primeiros 30 dias de cultivo e mensalmente, durante cinco meses, totalizando seis meses de avaliação. O item avaliado foi apenas germinação, considerando-se como germinada toda semente que apresentou protusão da radícula com curvatura geotrópica positiva.

2.2 Sub-cultivos

Após 60 dias do início da germinação das sementes, microestacas com uma gema axilar e aproximadamente 1 cm de comprimento foram inoculadas em meio de cultura semelhante ao utilizado para a germinação das sementes, desprovido de reguladores de crescimento, para a multiplicação.

Para avaliar possíveis diferenças na capacidade de proliferação *in vitro* do algodão-do-campo, dez indivíduos provenientes de sementes foram selecionados ao acaso e avaliados comparativamente quanto ao crescimento e taxa de multiplicação. Para tanto, foram realizados três sub-cultivos sucessivos de 60 dias cada, sendo os dados de crescimento e taxa de multiplicação dos indivíduos avaliados quinzenalmente.

O material foi mantido em sala de crescimento, sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornecidas por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia (Sylvania, 20W).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 10×2 , sendo cinco repetições e cinco microestacas por parcela. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SANEST (Zonta & Machado, 1984).

2.3 Conservação *in vitro*

Microestacas provenientes da etapa de multiplicação *in vitro*, com uma gema axilar e medindo aproximadamente 0,5 cm foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo três diferentes concentrações de sais do meio de WPM ($\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ e Plena) (Lloyd & Mccown, 1980) suplementados com 10 g.L^{-1} de sacarose, 5 g.L^{-1} de ágar e 1 g.L^{-1} de carvão ativado, sendo o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem.

Uma vez inoculados, os materiais foram mantidos sob três regimes de temperatura de conservação: 10°C , 20°C e 25°C , em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecidas por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia (Sylvânia, 20W).

Dados sobre altura e número de gemas formadas foram obtidos mensalmente por um período de 90 dias. Ao final deste período, também foi avaliada a percentagem total de crescimento dos propágulos mantidos sob condições de conservação *in vitro*, obtendo este resultado pela relação: altura final – altura inicial/altura inicial x 100.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x3, sendo três tipos de meios quanto à concentração de sais de WPM e três temperaturas. Cada tratamento foi formado por 15 repetições, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio com uma brotação.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SANEST (Zonta & Machado, 1984).

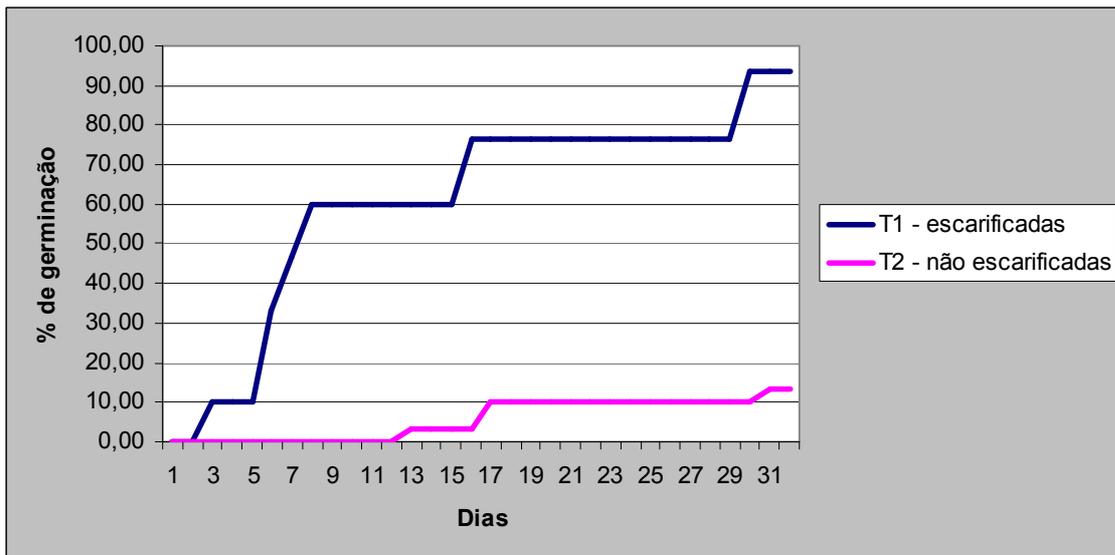
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinação *in vitro*

O teste de germinação *in vitro* de sementes escarificadas e não escarificadas possibilitou uma análise mais detalhada sobre o comportamento destas em duas situações diferentes. De modo geral, observou-se que o uso de escarificação química uniformizou e acelerou o processo de germinação *in vitro* das sementes de algodão-do-campo. O lote de sementes submetido à escarificação química com ácido sulfúrico (T1) apresentou percentual de germinação de 93,3% aos 30 dias após a inoculação, contrastando com apenas 13,3% de germinação no lote não escarificado (T2) (Figura 8).

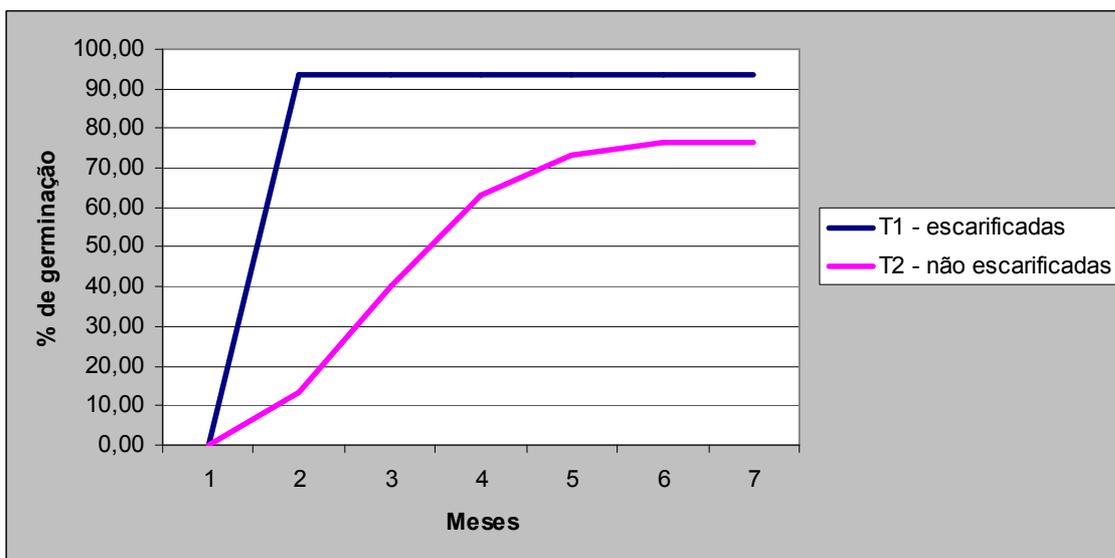
Quando se avaliou o percentual de germinação das sementes ao seis meses, verificou-se que a porcentagem de sementes germinadas em T1 permaneceu constante, porém o percentual obtido em T2 foi de 76,6%, sugerindo que as sementes de algodão do campo apresentam um tipo de dormência física, que pode ser superada pelo emprego de escarificação química, como o uso do ácido sulfúrico (Figura 9). Neste contexto, é possível que o menor percentual de germinação das sementes não escarificadas possa ser explicado pela resistência física que o tegumento oferece à absorção de água e, conseqüentemente, à germinação, como pôde ser observado pelos resultados obtidos. A remoção ou injúria do tegumento por escarificação química ou mecânica, além de aumentar a permeabilidade à água, pode ainda levar a outras mudanças tais como: aumento da sensibilidade à luz e temperatura, permeabilidade a gases, remoção de promotores ou inibidores do crescimento, afetando, assim, o metabolismo da semente e, conseqüentemente, a sua dormência (Khan, 1977).

No tratamento T1 a germinação teve início a partir do terceiro dia após a inoculação, com a emissão da radícula. O epicótilo das plântulas apresentou crescimento rápido, sendo possível observar o surgimento de plântulas a partir do sexto dia após a inoculação. Já no tratamento T2 a germinação teve início somente a partir do 13º dia e, apesar de baixo o índice de germinação, o desenvolvimento inicial das plântulas ocorreu de forma semelhante ao tratamento T1, não sendo observado diferenças morfológicas das plantas entre os dois tratamentos.



T1 – escarificação com imersão das sementes em ácido sulfúrico por 40 minutos
T2 – imersão em água destilada

Figura 8. Porcentagem de germinação *in vitro* das sementes de algodão-do-campo, obtida após 30 dias de avaliações diárias.



T1 – escarificação com imersão das sementes em ácido sulfúrico por 40 minutos
T2 – imersão em água destilada

Figura 9. Porcentagem de germinação *in vitro* das sementes de algodão-do-campo, obtida após seis meses da inoculação.

A ocorrência de dormência é um fenômeno bastante comum descrito em sementes de espécies nativas, havendo alguns trabalhos que descrevem diferentes formas de superar a dormência em sementes para o estabelecimento de cultivos *in vitro* (Coelho *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2007b;). As formas mais usuais de superação de dormência neste caso inclui o tratamento com água quente, escarificação com lixa e punção ou remoção do tegumento. Noleto & Silveira (2004) escarificaram mecanicamente sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) através de punção na região da testa da semente. Aos 22 dias após a inoculação *in vitro*, sobre ponte de papel filtro em água destilada obtiveram um percentual de germinação de 75%.

Lima *et al.* (2007) observaram um percentual de germinação *in vitro* em torno de 60% em sementes de urucu (*Bixa orellana* L.), após remoção do tegumento, em meio de MS. Coelho *et al.* (2001) relataram percentuais de germinação de até 96,7% em sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth] quando estas foram inoculadas em meio de MS líquido por 35 dias, após a remoção do tegumento.

Cordeiro *et al.* (2002) estudando a germinação *in vitro* de sementes de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber) descreveram que sementes escarificadas mecanicamente e germinadas *in vitro* em meio de cultura de MS $\frac{1}{2}$ apresentaram percentual de germinação superior a 90% e plântulas bem desenvolvidas no quinto dia após a inoculação. Os autores observaram que as diferentes concentrações de meio de cultura, bem como a adição de ácido giberélico (AG₃) ao meio, não proporcionaram diferença significativa na taxa de germinação da espécie.

Os resultados das observações relatadas neste trabalho estão de acordo com as descrições feitas por Grattapaglia & Machado (1998), de que a introdução de sementes *in vitro* apresenta vantagem em relação a muitos explantes, pois as plântulas resultantes apresentam bom enraizamento adventício, já que esta é uma característica de tecidos em estado juvenil. Ainda tem a vantagem de produzirem maior número de brotações devido a presença de gemas cotiledonares (Noleto & Silveira, 2004). A Figura 10 mostra uma plântula de *C. regium* com 30 dias, evidenciando o enraizamento como descrito na literatura e o espessamento de colo da raiz, ocorrência característica da família Cochlospermaceae (Kirizawa, 1981).

Neste trabalho, após 60 dias da inoculação, não foi observada a formação de plântulas anormais. Além disso, não foi constatado nenhum tipo de contaminação,

demonstrando a eficiência do protocolo utilizado inicialmente para a desinfestação das sementes.



Figura 10. Plantas de algodão-do-campo entre 10 e 30 dias após a germinação, com sistema radicular bem desenvolvido, e espessamento de colo característico da espécie.

3.2 Sub-cultivos

De modo geral, os resultados da análise de variância (Anexo 6.1) mostraram diferenças significativas para a altura das brotações quando estas foram comparadas aos 30 e 60 dias de cultivo. Na média, explantes mantidos por 60 dias, apresentaram altura de 3,4 cm, valor significativamente superior àqueles mantidos por 30 dias que apresentaram altura de 1,6 cm. Quando se comparou os plantas provenientes de sementes individualmente, também foram observadas diferenças, onde o Gp01, Gp03, Gp07, Gp12, Gp17, Gp20 e Gp22 foram os que apresentaram crescimento superior aos demais nos primeiros 30 dias de cultivo. Já quando esta avaliação foi feita aos 60 dias, verificou-se que, de modo geral, esta superioridade no crescimento destes indivíduos foi mantida, com exceção dos Gp12, Gp17 e Gp20 que apresentaram menor altura quando comparada àqueles de maior crescimento aos 30 dias (Tabela 18). Assim como observado para a altura, a taxa de multiplicação de algodão-do-campo apresentou diferença significativa entre os genótipos testados, de acordo com o teste de Tukey a 5%. Aos 60 dias após a inoculação foi obtida uma média de 4,6 gemas formadas, contra apenas 2,7 gemas aos 30 dias de avaliação.

O indivíduo Gp01 apresentou o melhor resultado quanto ao número de gemas formadas, com uma média de 5,8 gemas aos 60 dias de avaliação. O indivíduo Gp15 apresentou o pior resultado, com apenas 2,4 gemas em média.

Tabela 18. Comparação entre o desenvolvimento de indivíduos quanto a altura de plântulas, número de gemas formadas e porcentagem de sobrevivência de explantes aos 30 e aos 60 dias de avaliação. Erro! Vínculo não válido.

<i>Indivíduos</i>	<i>Altura (cm)</i>		<i>Gemas formadas (n)</i>		<i>Sobrevivência (%)</i>	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Gp01	2,6 a	5,0 a	4,4 a	7,4 a	83,7 aA	83,7 abA
Gp02	1,1 bc	3,4 bcd	2,6 abc	4,0 bc	87,4 aA	26,8 bcB
Gp03	1,9 abc	4,0 abc	3,1 abc	5,1 abc	100 aA	83,7 abB
Gp07	2,1 abc	4,7 ab	2,8 abc	5,6 ab	100 aA	60,8 abcB
Gp12	1,4 abc	2,7 cde	2,9 abc	4,5 bc	100 aA	92,4 aA
Gp15	1,0 bc	2,0 de	1,6 bc	3,4 c	100 aA	51,2 abcB
Gp17	1,4 abc	3,1 cd	2,3 bc	3,3 c	100 aA	26,0 cB
Gp20	1,8 abc	3,0 cd	2,6 abc	4,3 bc	99,1 aA	87,4 aA
Gp21	0,8 c	1,5 e	1,5 c	3,6 bc	96,6 aA	69,2 abcB
Gp22	2,4 ab	4,7 ab	3,2 ab	5,1 abc	100 aA	94,8 aA
Médias	1,6 B	3,4 A	2,7 B	4,6 A	96,7 A	67,6 B

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido vertical e as letras maiúsculas (A,B) no sentido horizontal.

Ao analisar a relação entre o número de gemas formadas e o tempo de avaliação, foi possível observar que, em média, aos 60 dias o número de gemas formadas foi significativamente maior que aos 30 dias. Contudo, a taxa de sobrevivência dos explantes que aos 30 dias foi em média de 96,7%, decresceu para 67,6% aos 60 dias. Esta diferença no percentual de sobrevivência sugere que é mais vantajoso realizar sub-cultivos em intervalos menores (30 dias), pois embora a quantidade de gemas obtidas seja menor, o percentual de explantes vivos resultará num maior número de plantas ao final do processo.

Este dado pode ser comprovado através de um cálculo estimado da taxa de multiplicação do material propagativo, elevando-se a média de gemas obtidas aos 30 dias (2,7) pelo número de sub-cultivos realizados (6). Neste cálculo é possível obter uma taxa estimada de multiplicação de 1.046 novas plantas. Entretanto, seguindo-se a mesma metodologia, mas com os sub-cultivos sendo realizados a cada 60 dias, a taxa de multiplicação estimada será de apenas 450 novos indivíduos. A Figura 11 ilustra o desenvolvimento das novas brotações nos explantes de algodão-do-campo.

Quando comparou-se os indivíduos em cada época de avaliação, foi verificado que aos 30 dias não houve diferença significativa na taxa de sobrevivência entre os genótipos estudados. No entanto, aos 60 dias diferenças significativas de sobrevivência entre os indivíduos foram observadas, sendo o GP02 e GP17 os únicos que apresentaram reduções significativas nas taxas de sobrevivência neste período, com 26,8% e 26%, respectivamente.

Neste experimento, não foi adicionado ao meio de cultura nenhum tipo de regulador de crescimento, pois resultados preliminares mostraram que a taxa de regeneração desta espécie na ausência de reguladores é muito próxima às taxas obtidas na regeneração de algodão comercial (*Gossypium hirsutum*) em condições semelhantes. Portanto para o objetivo estabelecido, que foi a conservação da espécie *in vitro*, o número de clones obtidos em cada sub-cultivo na ausência de reguladores foi considerado suficiente.

Carvalho *et al.* (2003) estudaram a regeneração de gemas de algodoeiro em diferentes meios de cultura. O percentual de sobrevivência dos explantes aos 21 dias após a inoculação foi superior a 90%. A taxa de regeneração para os explantes oriundos de ápices caulinares foi em média de um broto por explante. Já em

explantes oriundos de entrenós cotilédones, a média foi de 2 brotos por explantes, aos 28 dias de avaliação.



Figura 11. Explantes oriundos de sementes germinadas de *C. regium* após 30 dias de sub-cultivo.

3.3 Conservação *in vitro*

A análise de variância (Anexo 6.2) mostrou que houve interação significativa entre as temperaturas testadas (10°C, 20°C e 25°C), entre as diferentes concentrações de meio de cultura (1/2, 3/4 e Pleno de WPM) e meio de cultura x temperatura.

O melhor resultado para conservação *in vitro* foi obtido com a manutenção dos explantes em meio de cultura 1/2WPM e em câmara de crescimento com temperatura de 20°C. Não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de crescimento dos explantes nas demais concentrações do meio WPM (3/4 e Pleno). Assim, verificou-se que nestas condições a taxa média de crescimento dos explantes foi de 53,1% e a sobrevivência de 100% ao final de três meses (Tabela 19). Por outro lado, explantes mantidos sob temperatura de 25°C, apresentaram crescimento superior a 450% quando cultivados em concentração plena dos sais de WPM (Figura 12).

O meio de cultura utilizado para o experimento de conservação de *C. regium* foi o WPM, por possuir apenas 45% da concentração iônica total do meio de MS e concentrações menores de nitrato (MS 40 µM; WPM 9,7 µM) e amônio (MS 20 µM; WPM 4,9 µM). Apresenta ainda uma baixa concentração de nitrogênio total (14,7 µM) comparado ao MS (60,00 µM) (Nunes *et al.*, 2002), promovendo assim um crescimento mais lento dos explantes em algumas espécies.

Efeito similar foi observado por Rocha *et al.* (2007) na micropropagação de canjarana [*Cabralea canjerana* (Vell.) Mart.]. Ao comparar os meios de cultura MS e WPM, os autores observaram uma maior taxa de multiplicação (1,77) nos segmentos nodais tratados com 2,5 µM BAP em meio de cultura MS, em comparação a taxa de multiplicação obtida em meio WPM (1,2). No cultivo em meio WPM, as taxas de multiplicação foram inferiores a 1,2 em todos os sub-cultivos e nas duas concentrações de BAP (2,5 µM e 5,0 µM) testadas.

O meio WPM por suas características de menor concentrações de sais, foi utilizado com bons resultados na multiplicação e conservação de espécies nativas, como *Zeyheria montana* (Mart.) (Bertoni, 2003) e *Lychnophora pinaster* (Mart.) (Souza *et al.*, 2003).

Pereira *et al.* (2003) estabeleceram um protocolo para manutenção de um banco de germoplasma *in vitro* de catuaba [*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld

ex de Souza]. Os resultados mostraram que plantas cultivadas em meio de MS suplementando com 3% de sacarose e 4% de sorbitol, mantidas a temperatura de 18°C e fotoperíodo de 12 horas, podem permanecer no mesmo frasco por 6 meses, sem substituição do meio de cultura. Sob estas condições o desenvolvimento dos explantes foi lento e a porcentagem média de sobrevivência de 95%.

Bertoni (2003) mostrou que plantas de bolsa-de-pastor (*Zeyheria montana* Mart.) podem ser conservadas em banco de germoplasma *in vitro* à temperatura de 18°C, em meio de cultura WPM suplementado com 2% de sacarose e 4% de sorbitol. Nestas condições o índice de crescimento das plantas foi baixo e com sobrevivência superior a 95%.

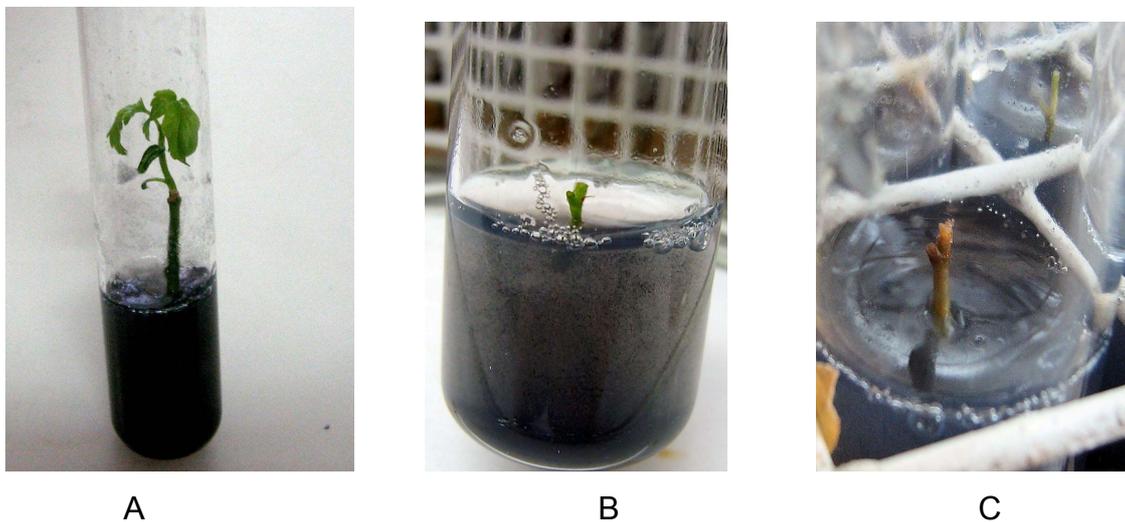


Figura 12. Desenvolvimento dos explantes de algodão-do-campo submetidos a diferentes regimes de temperatura, onde A mostra o desenvolvimento do explante a 25°C, B a 20°C e C a 10°C.

Tabela 19. Conservação *in vitro* de *C. regium* quanto ao percentual de crescimento, altura das plantas e sobrevivência dos explantes submetidos a três regimes de temperatura e três concentrações do meio de cultura WPM.

Meios	Crescimento (%)			Altura (cm)			Sobrevivência (%)		
	10°C	20°C	25°C	10°C	20°C	25°C	10°C	20°C	25°C
1/2 WPM	61,6 aB	54,5 aB	178,9 bA	0,7 aB	0,9 aA	1,5 bA	4,3 bB	100 aA	90,4 bA
3/4 WPM	55,8 aB	53,1 aB	174,5 bA	0,7 aB	0,9 aB	1,4 bA	25 bB	100 aA	100 aA
Pleno WPM	57,8 aB	69,1 aB	452,5 aA	0,7 aB	0,9 aB	3,1 aA	44,8 aB	100 aA	100 aA
Médias	58,3 B	58,9 B	268,6 A	0,7 B	0,9 B	2,0 A	24,7 B	100 A	96,8 A

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido vertical e as letras maiúsculas (A,B) no sentido horizontal.

4. Conclusões

A escarificação química das sementes de algodão-do-campo em ácido sulfúrico por 40 minutos, foi eficiente para superação de dormência e sincronização do processo de germinação *in vitro* da espécie;

O número de brotações regeneradas por explantes, mantidos em meio MS na ausência de reguladores de crescimento, foi considerado satisfatório para atender a demanda de explantes destinados a conservação *in vitro* de algodão-do-campo.

A temperatura de 20°C associado ao meio de cultura ½ WPM, foram as condições mais eficientes para a manutenção de explantes algodão-do-campo sob regime de crescimento mínimo, sendo as condições mais adequadas para a conservação de germoplasma *in vitro* da espécie.

5. Referencias bibliográficas

AMARAL, C.L.F.; SILVA, A.B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Biotecnologia**, 2003, n. 30, jan/fev., p. 55-59.

ASSIS, T.F. DE; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de plantas**. Vol. 1. Brasília: EMBRAPA Produção de Informação/Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia. 1998. p. 261-296.

BERTONI, B.W. **Propagação, variabilidade genética e química de *Zeyheria montana* Mart.** Genética e Melhoramento de Plantas. UNESP/Jaboticabal. 2003. 165 p. Tese Doutorado.

CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia**, n. 19, mar/abr., p. 16-21, 2001.

CARVALHO, J.M.F.C.; LOPES, K.P.; ALMEIDA, F.A.C.; SOUZA JUNIOR, R.L. **Regeneração de Gemas de Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) da Cultivar BRS 201.** Campina Grande, EMBRAPA: Comunicado Técnico 186, 2003.

COELHO, M.C.F.; PINTO, J.E.B.P.; MORAIS, A.R.; CID, L.P.B.; LAMEIRA, O.L. Germinação de sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.] *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v.25, n.1, p. 38-48, 2001.

CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; LOPES, S.C.; RIOS, M.S. Germinação *in vitro* de Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber). **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 27, p. 58-61, 2002.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA – SPI/EMBRAPA – CNPH, 1998, p.

FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p. 845-851, 2006.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5ª Ed. rev. e amp., Editoras UFSC/UFRGS, 2003.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de plantas**. Vol. 1. Brasília: EMBRAPA Produção de Informação/Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia. 1998. p. 183-260.

KAGIKI, F.O.; GONÇALVES, G.C.; OLIVEIRA, E.T.; CROCOMO, O.J.; GALLO, L.A. Indução de calos e produção de saponinas totais em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2004, Botucatu, v.7, n. 1, p. 43-50.

KHAN, A.A., Seed dormancy: changing concepts and theories. In: KHAN, A.A. (Ed.) **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. New York: North - Holland Publishing Company, 1977. 447p.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*: uma realidade. **Biotecnologia**, 1997, n.1, maio, p. 30-34.

KIRIZAWA M. **Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger - Cochlospermaceae**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1981. 437 p. Tese de Doutorado.

LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M.V.; BENITEZ, L.; PETERS, J.A.; BRAGA, J.E.B. Influencia de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aéreas de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p. 669-671, 2007a.

LIMA, R.V.; LOPES, J.C.; SCHIMIDT, E.R.; MAIA, A.R. Germinação *in vitro* de urucu. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p. 171-177, 2007b.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially – feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, v.30, p. 421–427, 1980.

MORAES, R.M.; CALDAS, L.S.; SILVEIRA, C.E.S.; SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagação e Banco de Germoplasma *in vitro* para produção e conservação de plantas nativas do cerrado. In: PEREIRA, A.M.S. (org). **Recursos Genéticos e Conservação de Plantas Mediciniais do Cerrado**. Ana Maria Soares Pereira. Ribeirão Preto, 2007, p. 185-212

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

NOLETO, L.G.; SILVEIRA, C.E.S. Micropropagação de copaíba. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.33, p. 109-120, jul/dez, 2004.

NUNES, E. de C.; CASTILHO, C.V.; MORENO, F.N.; VIANA, A.M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.70, n.3, 2002 , p. 259-268(10).

PEREIRA, A.M.S. Cultura de tecidos de plantas medicinais. In: COELHO, M.F.B.; COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J.L.D. (organizadores) Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais. **Anais do I Seminário Mato-**

grossense de Etnobiologia, Etnoecologia e II Seminário Centro-oeste de Plantas Mediciniais. Cuiabá: UNICEN, 2003, p. 183-194.

PEREIRA, A.M.S.; AMUI, S.F.; BERTONI, B.W.; MORAES, R.M.; FRANÇA, S.C. Micropropagation of *Anemopaegma arvense*: Conservation of an Endangered Medicinal Plant. **Planta Medica**, v.69, p. 571-573, 2003.

PEREIRA, A.M.S. Micropropagação de *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. (Espinheira Santa). In: MING, L.C.; SCHEFFER, M.C.; CORREA JUNIOR, C.; BARROS, I.B.I.; MATTOS, J.K.A. **Plantas Mediciniais Aromáticas e Condimentares – avanços na pesquisa agrônômica.** v. II, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998, p.19-32.

ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHÁVEZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (eds.) **Cultivo de tejidos en la agricultura.** Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Colombia, 1991, p.

ROCHA, S.C.; QUORIM, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v.31, n.1, 2007.

SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORREA, R.M.; CASTRO, E.M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, Edição especial, 2003, dez, p. 1532-1538.

SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; TEIXEIRA, R.N. Enraizamento *in vitro* de plantulas de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, 2004, v. 7, n. 1, p. 86-91.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores – SANEST.** Ilha Solteira: UNESP, 109 p., 1984.

WHITE, P.R. Potentially Unlimited Growth of Excised Plant Callus in an Artificial Nutrient. **Journal of Botany**, 1939, v. 26, n. 2, p. 59-64.

6. Anexos

6.1 Tabelas de análise de variância para comparação dos desempenhos de cada indivíduo em relação ao tempo de avaliação e quanto a altura das plantas

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA (indivíduo/tempo)

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
INDIVI.	9	5.2917304	0.5879700	9.9385	0.00001
TEMPO	1	5.6609186	5.6609186	95.6867	0.00001
IND*TEM	9	0.3266192	0.0362910	0.6134	0.78325
RESIDUO	80	4.7328802	0.0591610		
TOTAL	99	16.0121484			

MEDIA GERAL = 2.014641

COEFICIENTE DE VARIACAO = 12.073 %

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA (altura das plantas/época avaliação)

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
INDIVID.	9	67.2296058	7.4699562	14.7847	0.00001
EPOCA	1	77.0884077	77.0884077	152.5748	0.00001
IND*EPO	9	10.3335982	1.1481776	2.2725	0.02508
RESIDUO	80	40.4199886	0.5052499		
TOTAL	99	195.0716003			

MEDIA GERAL = 2.522000 COEFICIENTE DE VARIACAO = 28.184 %

6.2 Tabelas de análise de variância para comparação dos desempenhos dos meios de cultura e das temperaturas nos crescimento dos explantes para fins de conservação *in vitro*.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TEMPERAT	2	41.8151053	20.9075527	61.6617	0.00001
MEIOS	2	8.8813304	4.4406652	13.0967	0.00005
TEM*MEI	4	18.4302297	4.6075574	13.5889	0.00001
RESIDUO	126	42.7226656	0.3390688		
TOTAL	134	111.8493311			

MEDIA GERAL = 1.197778 COEFICIENTE DE VARIACAO = 48.615 %

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TEMPERAT	2	105240.0000000	52620.0000000	73.0833	0.00001
MEIOS	2	6240.0000000	3120.0000000	4.3333	0.01490
TEM*MEI	4	3840.0000000	960.0000000	1.3333	0.26023
RESIDUO	126	90720.0000000	720.0000000		
TOTAL	134	206040.0000000			

MEDIA GERAL = 67.333336 COEFICIENTE DE VARIACAO = 39.851 %

Considerações finais

Para otimizar o processo de conservação de sementes em temperatura sub-zero, será necessário determinar o teor de umidade mais favorável para o armazenamento de sementes de *C. regium* em nitrogênio líquido.

Na cultura de tecidos foi observado que, os explantes mantidos à 10°C também apresentaram reduzido crescimento, embora não tenham diferido estatisticamente daqueles mantidos à 20°C. Porém, verificou-se na média geral apenas 24,7% de sobrevivência dos explantes, valor significativamente inferior aos 100% e 96,8% observados nos tratamentos à temperatura de 20°C e 25°C. Neste contexto, Van den Houve *et al.* (1995) cita que o tempo e as condições sob as quais um material pode ser conservado depende da sua taxa de sobrevivência, e recomenda que no momento do resgate, o material deve apresentar pelo menos 60% de sobrevivência.

De modo geral, a análise dos dados mostraram que tanto a conservação de sementes em temperaturas sub-zero quanto a conservação *in vitro*, se mostraram viáveis e eficazes para a conservação *ex situ* de *C. regium*. Porém, por questões práticas, a conservação de sementes a -20°C foi considerada neste caso, a alternativa com melhor relação custo benefício. Pois, manter sementes nessas condições é economicamente mais viável, uma vez que demanda menos mão-de-obra e requer estrutura física mais simples. Poderia ser recomendado com base nestes dados, que os futuros trabalhos de cultura de tecidos com esta espécie sejam direcionados para outras finalidades como por exemplo, a microrpropagação com vistas a produção de raízes para obtenção de metabólitos *in vitro* ou a clonagem de matrizes para produção de mudas e domesticação da espécie.