

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE PAINEIRA-ROSA

Débora de Oliveira Prudente^{1*}; Fernanda Carlota Nery¹; Laís Silveira da Silva¹; Renato Paiva¹; Michele Valquíria dos Reis¹; Marcela Carlota Nery¹

SAP 11775 Data envio: 14/04/2015 Data do aceite: 10/06/2015
Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 3, jul./set., p. 272-276, 2016

RESUMO - A paineira-rosa (*Chorisia speciosa* St. Hil) é uma espécie arbórea de grande importância na recuperação de ecossistemas degradados e matas ciliares, porém, o armazenamento convencional das sementes aumenta a incidência de fungos, causando deterioração e lesões nas plântulas. Objetivou-se estabelecer protocolos de germinação *in vitro* e de criopreservação para o armazenamento em longo prazo das sementes de paineira-rosa. Para a germinação *in vitro*, testou-se os meios de cultura MS e WPM, três níveis de pH (4,8; 5,8 e 6,8) e três concentrações de sacarose (0; 15; 30 g L⁻¹). Para a criopreservação, as sementes foram submetidas à secagem em sílica gel e fluxo laminar por diferentes tempos (0, 1, 2, 3 e 4 h) e em seguida, foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) por 24 h, descongeladas em banho-maria (38 °C) por quatro min e inseridas em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM. As sementes de paineira-rosa apresentaram germinação superior em meio de cultura WPM (84%). O pH corrigido para 5,8 e a concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose favoreceram a germinação das sementes, com 82% e 79%, respectivamente. O teor de água inicial das sementes de paineira-rosa foi de 14%. Após 4 h de desidratação em sílica gel e fluxo laminar, o teor de água foi de 7,8% e 6,8%, respectivamente. Não houve perda significativa da viabilidade das sementes submetidas à 4 h de secagem em fluxo laminar, com germinação de 63,33%. Os resultados alcançados nesse estudo indicam que a germinação *in vitro* e a criopreservação de sementes de paineira-rosa podem ser obtidos com sucesso.

Palavras-chave: armazenamento em longo prazo, *Chorisia speciosa* St. Hil, dessecação, espécie florestal.

IN VITRO GERMINATION AND SEED CRYOPRESERVATION OF PAINEIRA-ROSA

ABSTRACT - The paineira-rosa (*Chorisia speciosa* St. Hil) is an arboreal species of great importance in restoring degraded ecosystems and riparian forests, however, the availability of seeds of this species is low. The objective was to establish *in vitro* germination protocols and cryopreservation of paineira-rosa seeds. For the *in vitro* germination, MS culture medium and WPM was tested three concentrations of sucrose (0, 15, 30 g L⁻¹) and three pH levels (4.8, 5.8 and 6.8). For cryopreservation, the seeds were dried on silica gel or laminar flow for different times (0, 1, 2, 3 and 4 h) and then were stored in liquid nitrogen (-196 °C) for 24 h, defrosted in a water bath (38 °C) for four minutes and they were inserted into test tubes containing WPM medium cultivation. The paineira-rosa seeds showed germination when inoculated in WPM (84%). The concentration of 15 g L⁻¹ sucrose and the pH adjusted to 5.8, favored seed germination with 79% and 82%, respectively. The initial water content rose from paineira-rosa seeds was 14%. After 4 h of dehydration on silica gel or laminar flow, the water content was 7.8% and 6.8%, respectively. There was no significant loss of viability of seeds subjected to 4 h of drying in laminar flow (63.33%). The results obtained in this study indicate that the *in vitro* germination and kapok pink seed cryopreservation can be successfully obtained.

Key words: long-term storage, *Chorisia speciosa* St. Hil, drying, forest species.

INTRODUÇÃO

O desmatamento que levou à fragmentação dos habitats naturais em todo o mundo tem contribuído para as mudanças climáticas e o desequilíbrio de muitas espécies (DORNELES et al., 2013). No Brasil, no bioma Mata Atlântica, as pressões antrópicas que causaram erosões nos solos, poluição aquífera e desagregação nas fitofisionomias proporcionaram fragilidade na biodiversidade local (KLINK; MACHADO, 2005).

Para a manutenção de diversas espécies nativas da Mata Atlântica, a conservação *ex situ*, por meio de bancos de sementes e bancos de germoplasma em campo poderiam ser adotados (ROCHA et al., 2014). Entretanto, essa última forma de conservação está suscetível a desastres naturais e ocorrência de pragas e doenças que podem dizimar uma coleção inteira, repentinamente (RAI et al., 2009). Outras limitações dos bancos de germoplasma em campo estão relacionadas à limitada abrangência da diversidade genética que pode ser

¹Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário s/n, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: deoliveira_bq@hotmail.com. *Autor para correspondência

conservada devido à necessidade de grandes áreas e o alto custo de manutenção (DULLOO et al., 2009). Essas estratégias de conservação *ex situ* são consideradas complementares à conservação *in situ* e servem para assegurar a conservação de espécies ameaçadas ou que estão sofrendo erosão genética (VOLIS; BLECHER, 2010; ENGELMANN, 2011).

A paineira-rosa é uma espécie arbórea nativa do Brasil, encontra-se presente nas regiões sul, sudeste, centro-oeste e em partes do Estado da Bahia (LORENZI, 2002). No bioma Mata Atlântica, devido aos impactos ocasionados pelo desmatamento, introdução de pastagens e fogo, diversas espécies têm um patrimônio genético de valor inestimável para as futuras gerações devastado (PINTO et al., 2006), incluindo a paineira-rosa, espécie recomendada para a reconstituição de matas ciliares e para plantios em áreas degradadas (CARVALHO, 2003). Por se tratar de uma planta com crescimento rápido e com características ornamentais, principalmente na fase de florescimento, é muito utilizada também para o paisagismo de áreas públicas (LORENZI, 2002; PACHECO et al., 2013).

Na indústria, sua paina serve para enchimento de almofadas, cobertores e travesseiros. Sua madeira é utilizada na fabricação de aeromodelos, flutuadores, forros de móveis e, ainda, como material isolante (LORENZI, 2002). Quando empregada em projetos paisagísticos, a produção de mudas é dependente de sementes saudáveis, entretanto, a disponibilidade de sementes com elevado vigor após o armazenamento convencional é limitado, devido a incidência de fungos como *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp. e *Penicillium* sp. (SILVA et al., 2003), o que justifica a propagação *in vitro* e o armazenamento em longo prazo através de técnicas de criopreservação. De acordo com LÉDO et al. (2007), a germinação *in vitro* é a forma mais comum de estabelecimento de material e apresenta como vantagens, explantes mais viáveis e responsivos.

Neste cenário, vem crescendo a necessidade de otimizar a propagação *in vitro* de diversas espécies, visando também sua conservação em longo prazo em criobancos (OLIVEIRA-FILHO, 1994; SOUZA, 2003). A técnica de criopreservação tem sido vista como uma ferramenta promissora para o armazenamento em longo prazo dos recursos genéticos vegetais (SANTOS, 2000). Oferece vantagens como inibir totalmente as reações químicas que podem causar danos às células (MAZUR, 1984) e a ação dos agentes internos e externos que podem afetar a integridade das sementes, mantendo também a integridade genética do material criopreservado (STANWOOD, 1985). Diante do exposto, objetivou-se estabelecer um protocolo de germinação *in vitro* e criopreservação das sementes de paineira-rosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Germinação *in vitro*

Após a coleta das sementes, estas foram levadas à câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% por 60 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 2% de cloro ativo por 10 min.

Posteriormente, as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada autoclavada e inoculadas em diferentes meios de cultura. Os meios de cultura utilizados foram o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e Woody Plant Medium (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1981). Foram testados três níveis de pH (4,8; 5,8 e 6,8) e três concentrações de sacarose (0,0; 15 e 30 g L⁻¹), suplementado ao meio de cultura WPM, acrescidos de 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar. Após inoculadas, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h. Cada tratamento foi composto por 25 sementes, avaliando-se a porcentagem de germinação em cada tratamento, sendo consideradas germinadas sementes com radícula protruída (± 2 mm).

Criopreservação de sementes

Foi determinado o teor de água inicial das sementes em estufa a 105 °C ± 2 °C durante 24 h, utilizando-se cinco sub-amostras com 10 sementes cada. As sementes foram submetidas à secagem em sílica gel (100 g) e fluxo laminar por diferentes tempos (0, 1, 2, 3 e 4 h). Para cada tratamento foram utilizadas 35 sementes. Dessas 35, 10 foram colocadas em criotubos e imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) por 24 h, 10 foram colocadas em meio de cultura WPM (como controle da germinação) e 10 foram utilizadas para determinação do teor de água. Após 24 h imersas em nitrogênio líquido, as sementes passaram pelo processo de reaquecimento em banho-maria a 38 °C ± 2 °C por 4 min. Foram inoculadas em meio WPM e mantidas em sala de crescimento sob a irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 h e a temperatura de 25 °C ± 2 °C. A avaliação foi realizada aos 30 dias após o cultivo *in vitro*, sendo avaliada a porcentagem de sementes germinadas em cada tratamento.

Aclimatização

Plantas obtidas por meio da germinação *in vitro* e oriundas de sementes criopreservadas, após 30 dias de cultivo *in vitro* passaram por um período de 7 dias de pré-acclimatização (passagem para recipientes contendo Plantmax® e envoltas com saco plástico transparente para manutenção da umidade relativa). A bandeja com os recipientes foi mantida em sala de crescimento à temperatura controlada de 25 ± 2 °C e irradiância de fótons de 67 μmol m⁻² s⁻¹, e após 15 dias os recipientes com as plântulas foram levados para viveiro e o saco plástico foi retirado. As plantas permaneceram por mais 15 dias sob sombrite 30%, antes do transplante para sacos de polietileno preto contendo substrato Plantmax®. Aos 30 dias, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plântulas.

Análises estatísticas

Todos os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 30 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) utilizando-se o software estatístico SISVAR (FERREIRA,

2011) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, com probabilidade de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação *in vitro*

As sementes de paineira-rosa apresentaram maior porcentagem de germinação quando inoculadas em meio

de cultura WPM, com porcentagem de germinação de 84%, diferindo significativamente do meio de cultura MS (54%), como mostrado na Figura 1.

As sementes de paineira-rosa germinaram em meio WPM a partir do 4º dia, com plântulas formadas ao 16º dia após a germinação (Figura 2).

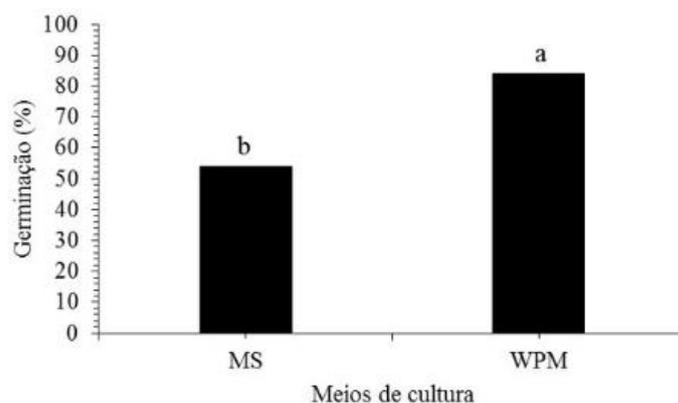


FIGURA 1 - Porcentagem de germinação de sementes de paineira-rosa em diferentes meios de cultura (MS e WPM).

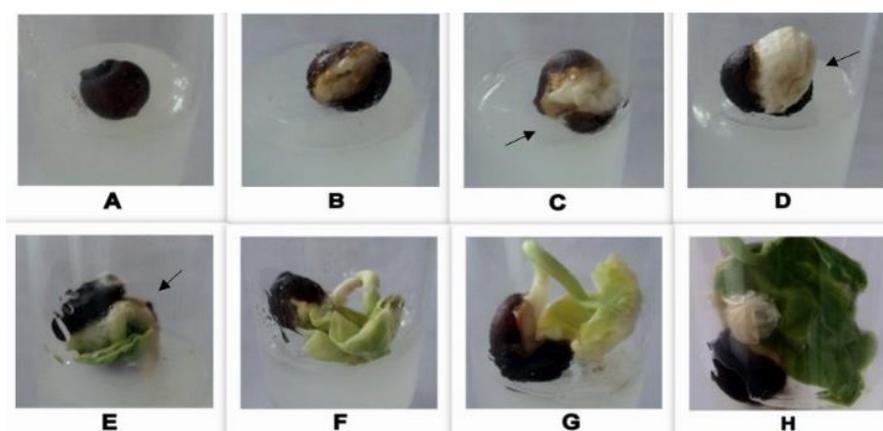


FIGURA 2 - Sementes de paineira-rosa após inoculação em meio de cultura WPM, sendo observado o desenvolvimento das sementes ao longo do tempo: (A) inoculação, (B) segundo dia após a inoculação, (C) Quarto dia após a inoculação, com a radícula protruída (seta), (D) sexto dia após a inoculação, sendo observado o crescimento do embrião (seta), (E) oitavo dia após a inoculação, sendo observado o desenvolvimento da parte aérea (seta), (F) décimo dia após a inoculação, (G) décimo segundo dia após a inoculação, e, (H) décimo sexto dia após a inoculação, observando a formação da plântula. Barra = 0,5 cm.

Os efeitos do nível de pH e da concentração de sacarose no meio de cultura foram significativos para a avaliação de germinação de sementes. As sementes de paineira-rosa apresentaram-se com germinação superior quando inoculadas em meio WPM em pH 5,8 (82%) (Figura 3A) e com 15 g L⁻¹ de sacarose, com porcentagem de germinação de 79% (Figura 3B). O nível de pH ideal pode resultar em maior aproveitamento dos macro e micronutrientes do meio de cultura, influenciando diretamente na otimização da propagação *in vitro*.

Os dados obtidos neste trabalho corroboram com os observados por Pasqual (2001) e Nogueira et al. (2004), os quais relatam que, para espécies lenhosas, o meio WPM se mostra satisfatório por apresentar 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato. No

entanto, Nery et al. (2008) não observou diferenças significativas entre os meios de cultura MS e WPM para todos os parâmetros avaliados para *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson.

Já para a concentração de sacarose no meio de cultura, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação. Porém, ao se adicionar sacarose ao meio de cultura, a plântula é mantida *in vitro* por um período de tempo maior (SOUZA, 2003). No presente estudo, provavelmente, a concentração completa dos sais do meio de cultura WPM, juntamente com a sacarose, afetou o balanço osmótico, prejudicando o processo germinativo na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose. Assim, é importante conhecer os fatores que afetam a germinação de sementes de cada espécie para se obter sucesso no processo de estabelecimento de plântulas *in vitro*.

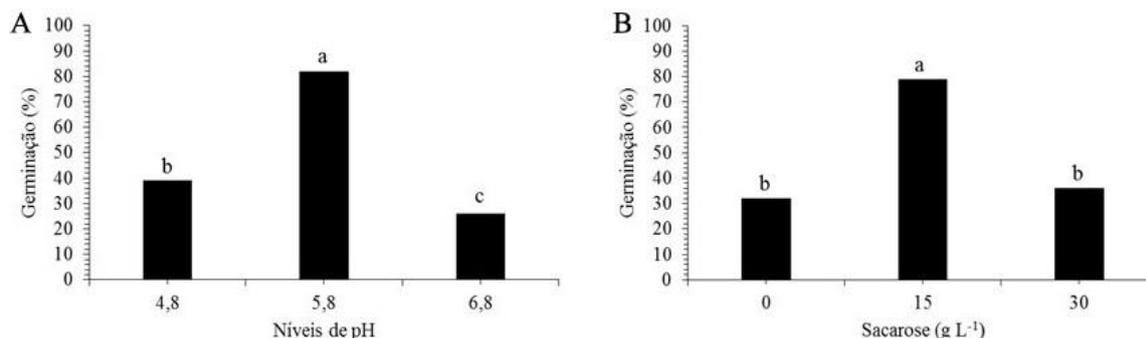


FIGURA 3 - Porcentagem de germinação de sementes de paineira-rosa inoculadas em meio de cultura WPM com diferentes níveis de pH (4,8; 5,8 e 6,8) (A) e diferentes concentrações de sacarose (0,0; 15,0 e 30,0 g L⁻¹) (B).

Já para a concentração de sacarose no meio de cultura, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação. Porém, ao se adicionar sacarose ao meio de cultura, a plântula é mantida *in vitro* por um período de tempo maior (SOUZA, 2003). No presente estudo, provavelmente, a concentração completa dos sais do meio de cultura WPM, juntamente com a sacarose, afetou o balanço osmótico, prejudicando o processo germinativo na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose. Assim, é importante conhecer os fatores que afetam a germinação de sementes de cada espécie para se obter sucesso no processo de estabelecimento de plântulas *in vitro*.

Criopreservação de sementes

O teor de água inicial das sementes de paineira-rosa foi de 14%. Após 4 h de desidratação em sílica gel e câmara de fluxo laminar, a umidade foi de 7,8% e 6,8%, respectivamente. Não houve perda significativa da viabilidade das sementes submetidas a 4 h de secagem em fluxo laminar, com germinação de 63,3% após a criopreservação, como mostrado na Figura 4.

Na Tabela 1 estão representadas as porcentagens de germinação nos diferentes tratamentos, com e sem o tratamento de criopreservação.

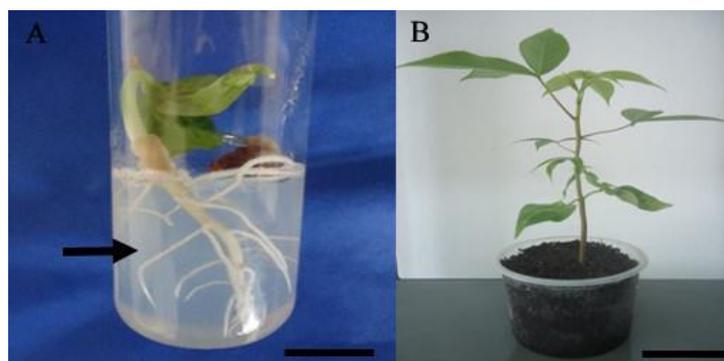


FIGURA 4 - Sementes de paineira-rosa germinadas em meio de cultura WPM após a dessecação em câmara de fluxo laminar e criopreservação (-196 °C), evidenciando o sistema radicular bem desenvolvido aos 30 dias de cultivo *in vitro* (A). Planta de paineira-rosa aclimatizada após a dessecação em câmara de fluxo laminar e criopreservação (B). Barra = 5 cm.

TABELA 1. Teor de água (%) e germinação (%) das sementes de paineira-rosa submetidas a secagem em sílica gel e em câmara de fluxo laminar por diferentes tempos.

Tempo	Teor de água (%)			Germinação (%)		
	Sílica	Fluxo	Sílica (27 ± 2 °C)	Sílica (27 ± 2 °C)	Fluxo (-196 °C)	Sílica (-196 °C)
Controle	14,0	14,0	-	-	-	-
1 hora	13,6	12,0	35,0 Ab	22,7 Cc	36,4 Aa	18,5 Dd
2 horas	11,9	10,7	25,0 Bc	27,2 Ba	18,2 Cd	25,9 Bb
3 horas	9,8	9,4	25,0 Ba	18,2 Dc	13,6 Dd	22,2 Cb
4 horas	7,8	6,8	15,0 Cd	31,8 Ab	32,7 Bb	63,3 Aa

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott, a 5% de significância.

Aclimatização

As plantas de paineira-rosa, mantidas em casa de vegetação obtiveram 100% de sucesso na aclimatização em ambiente *ex vitro*.

As sementes de paineira-rosa inoculadas em meio WPM após 4 h de dessecação na sílica e na câmara de fluxo laminar, anteriormente submetidas a criopreservação, iniciaram a germinação ao 6º dia após a inoculação, não diferindo significativamente das sementes que não foram submetidas à dessecação em temperatura ambiente, as quais iniciaram sua germinação ao 4º dia após a inoculação, como mostrado na figura 4.

Pelos dados observados, pode-se inferir que as sementes de paineira-rosa toleram baixos níveis de água, sendo a criopreservação um método eficiente de conservação à longo prazo para sementes desta espécie. O fluxo laminar promove uma desidratação mais lenta e mais uniforme do que a desidratação por sílica gel, evitando a formação de cristais de gelo, resultando diretamente no sucesso da técnica de criopreservação.

Resultados semelhantes foram encontrados por Althoff (1999), trabalhando com sementes de mamão (*Carica papaya* L.), onde verificaram que as sementes de mamão podem ser dessecadas até grau de umidade em torno de 5%, sem perda da viabilidade. Rocha et al. (2009) também constataram que o teor de água limite para a criopreservação de diferentes cultivares de algodão, encontra-se entre 6% e 8%.

CONCLUSÕES

O meio de cultura WPM é eficiente na germinação *in vitro* de sementes de paineira-rosa.

As sementes podem ser dessecadas até 6,8% de umidade sem perda do poder germinativo.

A criopreservação é um método eficiente para conservação em longo prazo de sementes de paineira-rosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTHOFF, M.A.; CARMONA, R. Conservação de sementes de mamão (*Carica papaya* L. Caricaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.21, n.1, p.151-156, 1999.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa-CNPQ, 2003.
- DORNELES, M.C.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschut, Fabaceae, estabelecida em fragmentos florestais do Cerrado, MG. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.23, n.3, p.291-304, jul./set. 2013.
- DULLOO, M.E.; EBERT, A.W.; DUSSERT, S.; GOTOR, E.; ASTORGA, C.; VASQUEZ, N.; SNOOK, L. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, Madison, v.49, n.6, p.2123-2138, dec. 2009.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, New York, v.47, n.4, p.5-16, 2011.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, dez. 2011.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B.A. Conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.147-155, 2005.
- LÉDO, A.D.S.; SECA, G.S.V.; BARBOZA, S.B.S.C.; SILVA JUNIOR, J.F.D. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.4, p.989-993, 2007.
- LLOYD, G.; MC COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, Alexandria, v.15, n.3, p.416, 1980.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 352p.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and applications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, Bethesda, v.247, n.3, p.125-142, 1984.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NERY, M.C.; CARVALHO, M.L.M.; OLIVEIRA, L.M.; NERY, F.C.; SILVA, D.G. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. **Cerne**, Lavras, v.14, n.1, p.1-8, 2008.
- NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; CASTRO, A.D.; VIEIRA, C.V.; ABBADE, L.C.; ALVARENGA, A.A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.1, p.1053-1059, 2004.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T.; ALMEIDA, R.J.; MELLO, J.M.; GAVILANES, M.L. Estrutura fitossociológica e variáveis ambientais em um trecho da mata ciliar do córrego dos Vilas Boas, Reserva Biológica do Poço Bonito, Lavras (MG). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.17, n.1, p.67-85, 1994.
- PACHECO, F.V.; PEREIRA, C.R.; SILVA, R.L.; ALVARENGA, I.C.A. Initial growing of *Dalbergia nigra* (Vell.) Ilemão ex. Benth. (Fabaceae) and *Chorisia speciosa* A. St.-Hil (Malvaceae) at different levels of shade. **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n.5, p.945-953, 2013.
- PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. v.1, 74p.
- PINTO, E.P.P.; AMOROZO, M.C.M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica-Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.20, n.4, p.751-762, 2006.
- RAI, M.K.; ASTHANA, P.; SINGH, S.K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. The encapsulation technology in fruit plants: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v.27, n.6, p.671-679, nov./dec. 2009.
- ROCHA, M.D.S.; MATA, M.E.C.; CARVALHO, J.M.; LOPES, K.P. Criopreservação de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, João Pessoa, v.13, n.3, p.312-318, 2009.
- ROCHA, R.B.; SANTOS, D.V.; RAMALHO, A.R.; TEIXEIRA, A.L. Caracterização e uso da variabilidade genética de banco ativo de germoplasma de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. **Coffee Science**, Lavras, v.8, n.4, p.478-485, 2014.
- SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.12, n.1, p.70-94, 2000.
- SILVA, R.T.V.; HOMECHIN, M.; PÁDUA FONSECA, E.; SANTIAGO, D.C. Tratamento de sementes e armazenamento na sanidade de sementes de paineira (*Chorisia speciosa* St. Hil). **Seminá: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.2, p.255-260, 2003.
- SOUZA, A.D.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M.; CASTRO, E.D. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, ed. especial, p.1532-1538, 2003.
- STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation In: KARTHA, K.K. (ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Rotan: CRC Press, 1985. p.199-225.
- VOLIS, S.; BLECHER, M. Quasi *in situ*: a bridge between *ex situ* and *in situ* conservation of plants. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v.19, n.9, p.2441-2454, 2010.