

TRATAMENTOS TÉRMICOS NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE LEUCENA

Natanielly Rodrigues Avelino¹; Michelle Maylla Viana de Almeida²; Bruno Oliveira Lafeta³

¹Engenheira Agrônoma. E-mail: nataniellyavelino@hotmail.com. Instituto Federal de Minas Gerais, Campus São João Evangelista – IFMG-SJE – São João Evangelista/MG – Brasil.

²Graduanda em Agronomia. E-mail: michllemaylla@outlook.com. Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Unidade Acadêmica de Garanhuns-UAG.

³Professor Mestre. E-mail: bruno.lafeta@ifmg.edu.br. Instituto Federal de Minas Gerais, Campus São João Evangelista – IFMG-SJE – São João Evangelista/MG – Brasil.

RESUMO (TRATAMENTOS TÉRMICOS NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE LEUCENA) – A leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) R. de Wit) é utilizada para fins comerciais e conservacionistas do solo e da água, porém suas sementes apresentam dormência tegumentar. Diante a premissa que laboratórios de culturas de tecidos permitem melhor controle das condições experimentais, objetivou-se avaliar o efeito de tratamentos térmicos na germinação *in vitro* dessa espécie. O experimento foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por 5 temperaturas da água para a imersão das sementes por 5 minutos (T1: -3,2°C; T2: -2,5°C; T3: 0,0°C; T4: 27,0°C e T5: 90,0°C). Cada unidade experimental foi composta por 12 tubos de ensaio contendo uma semente inoculada em meio MS meia força. Avaliaram-se a embebição, germinação e o desenvolvimento das plântulas durante 30 dias. Verificou-se germinação em todos os pré-tratamentos. O T5 apresentou mais sementes embebidas (100,0 %), germinadas (68,8 %), maior índice de velocidade de geminação (1,6) e emissões de parte aérea (68,8 %) e de raízes secundárias (68,8 %). Conclui-se que o pré-tratamento de imersão das sementes em água aquecida a 90,0°C por 5 minutos promove a germinação *in vitro* de leucena.

Termos para indexação: *Leucaena leucocephala*, propagação, pré-tratamentos, sementes, temperatura.

ABSTRACT (HEAT TREATMENTS IN VITRO GERMINATION OF LEUCAENA) – *Leucaena leucocephala* (Lam) R. de Wit) is used for commercial purposes and conservation of soil and water, but its seeds have tegumental dormancy. On the premise that tissue culture laboratories allows better control of experimental conditions, aimed to evaluate the effect of thermal treatments on the germination of this species. The experimental was established in a completely randomized design with four repetitions. The treatments consisted of five water temperatures for the immersion of seeds for 5 minutes (T1: -3.2°C, T2: -2.5°C, T3: 0.0°C, T4: 27.0°C and T5: 90.0°C). Each experimental unit was composed of 12 test tubes containing inoculated seed in half-strength MS medium. Were evaluated imbibition, germination and seedling development for 30 days. There was germination in all pretreatments. The T5 presented more imbibited seeds (100.0%), germinated (68.8%), most Twinning speed index (1.6) and shoot emissions (68.8%) and secondary roots (68.8%). It was conclude that pretreatment immersion of seeds in heated water at 90.0°C for 5 minutes promotes germination *in vitro* of leucena.

Keywords: *Leucaena leucocephala*, propagation, pretreatments, seeds, temperature.

INTRODUÇÃO

Leucaena leucocephala (Lam.) R. de Wit (Fabaceae-Mimosoideae), conhecida popularmente por leucena, é uma espécie arbórea exótica, originária do México e amplamente distribuída em toda a região tropical (OLIVEIRA, 2008). Apresenta rápido crescimento e simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, comportando-se como ruderal e melhorando a fertilidade dos solos (COSTA e DURIGAN, 2010). É empregada em programas de reflorestamento de áreas degradadas, arborização urbana, adubação verde, energia e, de forma incipiente nos trópicos brasileiros, alimentação animal (GAMA et al., 2009). A produção de mudas de *L. leucocephala* é realizada geralmente via seminal e a germinação ocorre apenas quando se utiliza sementes viáveis, não dormentes e sob condições ambientais favoráveis. Suas sementes são fotoblásticas neutras e apresentam impermeabilidade tegumentar, conferindo resistência física ao desenvolvimento embrionário (OLIVEIRA, 2008). Este fenômeno retarda e torna desuniforme a germinação, prejudica sua propagação em viveiros florestais e, em campo, contribui para a longevidade de plantas invasoras.

Lotes de sementes duras podem ter sua viabilidade subestimada quando baixas porcentagens de germinação são verificadas (OLIVEIRA e MEDEIROS FILHO, 2007). Metodologias são recomendadas para superar esse bloqueio físico e promover a germinação (RAMPIM et al., 2014), um exemplo é a escarificação física do tegumento por meio da imersão das sementes em água aquecida ou fria. Contudo, a amplitude e eficiência desses tratamentos dependem do tipo e grau de dormência (FERREIRA et al., 2012). A imersão de sementes de *L. leucocephala* em água aquecida por 20 minutos nas temperaturas de 60, 80 e 100 °C pode aumentar a germinação em 56, 185 e até 178 % em relação à ausência de pré-tratamentos (OLIVEIRA e MEDEIROS FILHO, 2007).

O cultivo *in vitro* é uma estratégia biotecnológica que permite acelerar programas de melhoramento genético, formar bancos de germoplasma e propagar vegetais de forma contínua, independente das condições ambientais inerentes às diferentes épocas do ano (FICK et al., 2007). Diante à dificuldade de se estabelecer indivíduos adultos em laboratório, pesquisas podem ser viabilizadas com plântulas obtidas por meio da sementeira *in vitro* (FICK et al., 2007). Além disso, a recalcitrância de espécies arbóreas pertencentes à família Fabaceae é comum na cultura de tecidos (JHA et al., 2004), justificando o emprego da técnica de germinação *in vitro*. Nesse contexto, pesquisas que aplicam esta técnica para a propagação de *L. leucocephala* são, praticamente, inexistentes.

A germinação *in vitro* é um método de propagação sexuado, cujas plântulas formadas podem ser utilizadas como fonte de propágulos para a multiplicação e produção de mudas com características genéticas desejáveis em larga escala e com alto padrão fitossanitário (FERMINO JÚNIOR e SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012). Condições ambientais apropriadas para a germinação podem ser fornecidas em laboratórios destinados à multiplicação *in vitro* (BRAUN et al., 2010).

Os meios de cultura se baseiam nas exigências de crescimento e desenvolvimento vegetal e, em alguns casos, modificações são realizadas para atender às necessidades específicas de determinada espécie (ROSA et al., 2012). As formulações mais utilizadas no cultivo *in vitro* de espécies florestais são MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), JADS (CORREIA, 1993) e WPM (*Wood Plant Medium*) (LLOYD e MCCOWN, 1980). A primeira é a mais divulgada para diferentes processos da cultura de tecidos, sendo recomendada a

redução dos seus componentes à metade ($\frac{1}{2}$ MS), ou meia força, quando se trabalha com o estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas (ROSA et al., 2012).

A baixa porcentagem de germinação em condições naturais, característica comum na família Fabaceae, pode prejudicar a propagação *in vitro*. Logo, a associação de tratamentos térmicos com a germinação *in vitro* é uma alternativa na busca de informações para aumentar o número, velocidade e uniformidade de sementes germinadas, possibilitando a obtenção de plântulas sadias e livres de patógenos.

Mediante o exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de tratamentos térmicos na germinação *in vitro* de *Leucaena leucocephala*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas árvores (médias de diâmetro de 20, 1 cm a partir de 1, 30 m de altura do solo, e altura total de 6,8 m) de *L. leucocephala* para a coleta de frutos em área de zona rural no município de Montes Claros - MG em novembro de 2014. Este local insere-se na região norte mineira, que expressa peculiaridades ligadas à deficiência hídrica e precipitação anual baixa (em torno de 650 mm), caracterizando seu tipo climático como tropical semi-árido (Bsh), conforme classificação internacional de Köppen (GUSMÃO et al., 2006).

A coleta manual dos frutos foi realizada diretamente no terço inferior da copa das árvores, posteriormente, acondicionados em sacos de papel Kraft e conduzidos ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IFMG - Campus São João Evangelista para beneficiamento. Este foi realizado manualmente, isolando as sementes dos frutos e eliminando aquelas que possuíam alguma atrofia ou injúria oriunda do ataque de insetos e doenças, a fim de se obter um lote uniforme e de melhor pureza física (CAVALCANTE e PEREZ, 1995).

O teor de umidade em base úmida das sementes foi determinado pelo método da estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas, com quatro repetições de 25 unidades, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

As sementes após o beneficiamento passaram por uma sanitização com hipoclorito de sódio (NaClO), com 2,0 % de cloro ativo, a 5,0 % (v/v) durante três minutos, depois lavadas com água destilada e colocadas para secar durante dez minutos sobre papel toalha. Optou-se pelo NaClO pois se trata de um composto químico contra proliferação fúngica e bacteriana, que propicia aumento no total de sementes germinadas (NASCIMENTO, FRANCO e FRASSETTO, 2007).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo os tratamentos assim constituídos: T1) Sementes resfriadas por imersão em água a -3,2 °C; T2) Sementes resfriadas por imersão em água a -2,5 °C; T3) Sementes resfriadas por imersão em água a 0,0 °C; T4) Imersão das sementes em água aquecida a 27,0 °C e T5) Imersão das sementes em água aquecida a 90,0 °C. O tempo de exposição das sementes foi de 5 minutos. Foram utilizados para o resfriamento e aquecimento da água o banho refrigerado e o Banho Maria, respectivamente. Adicionou-se 10 mL de álcool etílico (96 %, v/v) na água utilizada em cada tratamento, para evitar o congelamento da água naqueles tratamentos submetidos a baixas temperaturas.

O meio de cultura utilizado foi composto pelos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) meia força, vitaminas de White (1943), acrescidos de mio-inositol (100 mg.L⁻¹

¹), polivinilpirrolidona (1000 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹), ágar bacteriológico ISO FAR (6 g.L⁻¹), 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,3 mg.L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético), com pH ajustado para 5,75 ± 0,05. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave por 20 minutos à temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm. Cada unidade experimental foi constituída por 12 tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo, aproximadamente, 10 mL do meio previamente preparado.

Foi inoculada uma semente por tubo de ensaio, depois vedado com papel alumínio e filme plástico. Após a inoculação, o material experimental foi mantido em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 horas luz e a uma temperatura de 25 ± 2 °C.

As avaliações foram realizadas diariamente até a contagem final (trigésimo dia), registrando o número de sementes Embebidas (E), Germinação (G), emissões de Parte Aérea (PA) e de Raiz Secundária (RS) e Oxidação do Meio de Cultivo (OMC, amarelecimento do meio). As sementes não embebidas foram consideradas mortas ou dormentes. Calculou-se o índice de velocidade de germinação (IVG) conforme Maguirre (1962), utilizando a fórmula abaixo.

$$IVG = \frac{N_1}{D_1} + \dots + \frac{N_n}{D_n}$$

Em que:

IVG = índice de velocidade de germinação;

N₁ = número de sementes germinadas na 1^o contagem;

D₁ = número de dias para a 1^o contagem;

N_n = número de sementes germinadas na última contagem;

D_n = número de dias para a última contagem.

Todos os dados expressos em porcentagem foram transformados em valor angular ($\arcsen \sqrt{x/100}$) e o IVG em raiz quadrada ($\sqrt{x}$) a fim de atenderem aos critérios de normalidade segundo teste de Lilliefors e homogeneidade por Cochran (BANZATTO e KRONKA, 2006; RIBEIRO JÚNIOR, 2012). Realizaram-se teste F, regressão linear quadrática, teste de falta de ajustes, teste *t* para dados pareados e correlação linear de Pearson. Na regressão, foi utilizado o método dos mínimos quadrados ordinários (MQO). Quando algum parâmetro não foi significativo, o modelo foi novamente ajustado sem a variável ligada ao coeficiente. Para diagnóstico de efeito significativo, adotou-se 5 % de probabilidade em todas as análises estatísticas. Estas foram realizadas com auxílio dos *softwares* Excel® e SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de umidade em base úmida das sementes de *L. leucocephala* foi de 14,6 %. O efeito estatístico pelo teste F ($p \leq 0,05$) foi observado em nível de tratamento para todos os atributos avaliados (Tabela 1). A temperatura de imersão das sementes proporcionou uma germinação e desenvolvimento vegetal em condição *in vitro* diferenciada pelo material experimental utilizado. A influência da temperatura na germinação dessa espécie, também, foi constatada por Teles et al. (2000), porém trabalhando com diferentes tempos de imersão a 80°C.

Tabela 1. Resumo da análise de variância com os dados transformados dos atributos avaliados durante a germinação *in vitro* da *L. leucocephala*.

F.V.	G.L.	Q.M.					
		E	G	PA	RS	IVG	OMC
Tratamentos	4	3165,46*	836,22*	919,56*	895,15*	0,26*	560,07*
Resíduo	15	56,24	67,84	51,12	48,45	0,05	148,10
CV _{exp} (%)		18,73	26,71	24,10	23,17	28,63	93,71

CV_{exp} = Coeficiente de variação experimental. Embebição (E), Germinação (G), Parte Aérea (PA), Raiz Secundária (RS), Índice de velocidade de germinação (IVG) e Oxidação do Meio de Cultivo (OMC).

*Significativo ($p \leq 0,05$).

^{ns}Não significativo ($p > 0,05$).

Todos os parâmetros das equações apresentaram significância estatística, demonstrando a dependência da embebição, germinação, emissões de raiz secundária e de parte aérea, IVG e oxidação do meio de cultivo quanto às variações de temperatura de imersão como pré-tratamento (Tabela 2). O comportamento quadrático foi observado em todos os atributos, exceto na oxidação do meio de cultivo, cuja tendência foi linear. O teste de falta de ajuste apresentou valor de F calculado não significativo, comprovando que as equações encontradas foram capazes de descrever satisfatoriamente o comportamento dos dados experimentais. Em geral, os coeficientes de determinação ajustados foram elevados (superior a 0,70). Os valores estimados pelas equações foram semelhantes aos observados conforme teste t ($p > 0,05$). Isto possui grande importância prática, pois podem ser utilizadas como ferramenta de apoio no planejamento logístico de programas que visem o melhoramento genético e a produção de mudas da *L. leucocephala*.

Tabela 2. Estatísticas dos ajustes realizados para estimar os atributos avaliados durante a germinação *in vitro* da *L. leucocephala* em função da temperatura de imersão.

Atributos	E	G	PA	RS	IVG	OMC
β_0	22,8001*	16,6214*	14,4934*	14,9860*	0,4477*	-
β_1	-0,6660*	-	-	-	-	0,3199*
β_2	0,0169*	0,0064*	0,0066*	0,0066*	0,0001*	-
Teste FA (F)	1,12 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,33 ^{ns}	1,47 ^{ns}
$\bar{R}^2$	0,89	0,76	0,82	0,83	0,57	0,48
Erro padrão	10,99	11,45	10,04	9,70	0,38	12,81
Teste t (p)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,25

$Y_x = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 T^2$. Em que T = Temperatura (°C) e x = E (%); G (%); PA (%); IVG e OMC (%). Embebição (E), Germinação (G), Parte Aérea (PA), Raiz Secundária (RS), Índice de velocidade de germinação (IVG), Oxidação do Meio de Cultivo (OMC). FA = Falta de ajuste. $\bar{R}^2$ = Coeficiente de determinação ajustado.

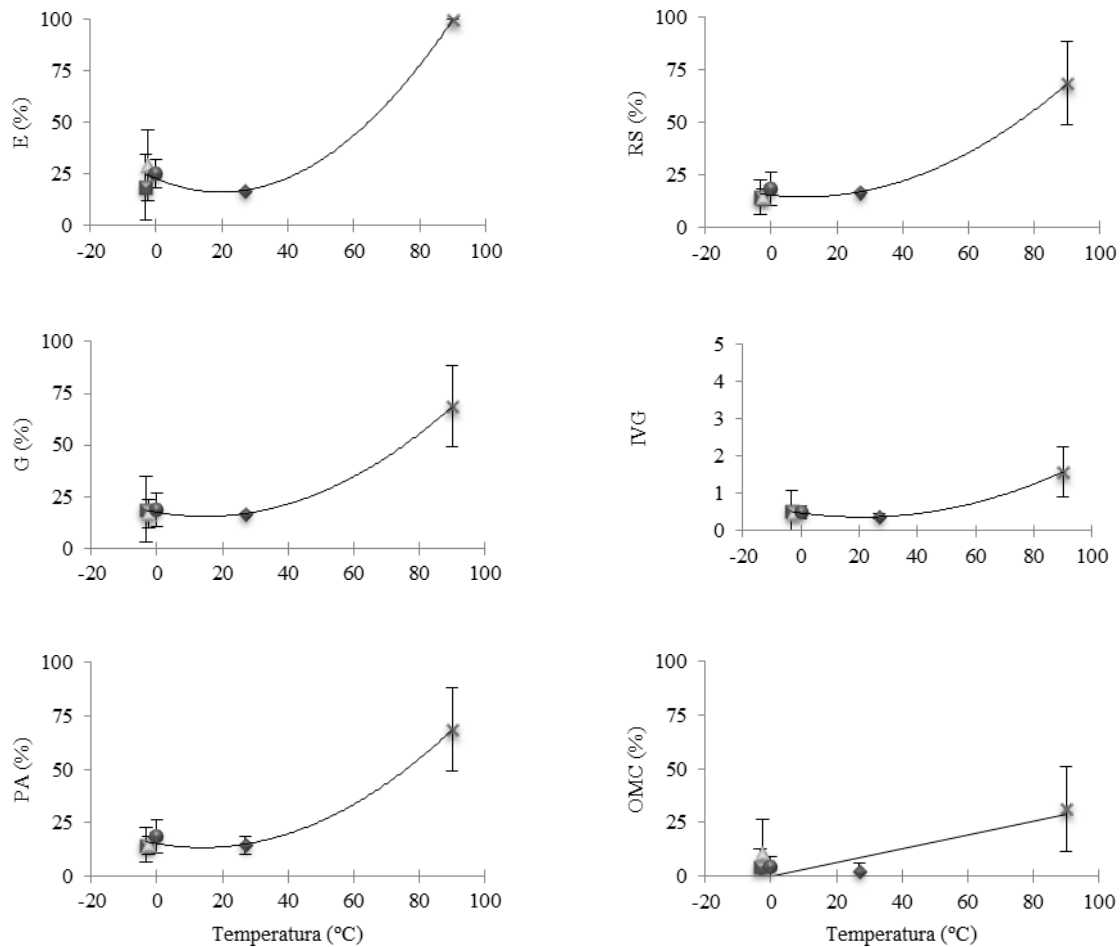
*Significativo ($p \leq 0,05$).

^{ns}Não significativo ($p > 0,05$).

De acordo com o comportamento das curvas geradas pela análise de regressão e o intervalo estudado de -3,2 a 90°C, o pré-tratamento de imersão das sementes em água aquecida a 90 °C por 5 minutos (T5) apresentou mais sementes embebidas (100,0 %), germinadas (68,8 %), maior IVG (1,6) e emissões de parte aérea (68,8 %) e de raízes secundárias (68,8 %) na contagem final (Figura 1). Este pré-tratamento foi o mais eficiente para aumentar a permeabilidade das sementes à água; evento relevante para desencadear o processo germinativo, hidratando o tegumento que amolece e se rompe, por consequência, o

embrião cresce e ocorre a protrusão radicular que se fixa no substrato (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Além disso, é um pré-tratamento de baixo custo e de fácil aplicação, com potencial para ser usado em larga escala desde que sejam tomadas medidas preventivas para proteção individual.

Figura 1. Representação gráfica das equações obtidas para estimar os atributos avaliados, com barra de desvio-padrão, durante a germinação *in vitro* da *L. leucocephala* em função da temperatura de imersão. Embebição (E), Raiz Secundária (RS), Germinação (G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Parte Aérea (PA), Oxidação do Meio de Cultivo (OMC).



As temperaturas estudadas se correlacionaram positivamente com a embebição ($r = 0,87$; $p \leq 0,05$), germinação ($r = 0,83$; $p \leq 0,05$), emissões de parte aérea ($r = 0,87$; $p \leq 0,05$) e de raiz secundária ($r = 0,88$; $p \leq 0,05$), IVG ($r = 0,72$; $p \leq 0,05$) e oxidação do meio de cultivo ($r = 0,62$; $p \leq 0,05$). À medida que aumentou a temperatura da água para a imersão das sementes, mais plântulas foram obtidas em menor tempo. O T5 apresentou maior homogeneidade e frequência relativa de partes aéreas emitidas, importante para a multiplicação dos propágulos em sucessivos subcultivos e enraizamento *in vitro* e *ex vitro*. Entretanto, salienta-se que a viabilidade da micropropagação de *L. leucocephala* deve ser avaliada considerando todos os custos de produção e não somente em função de pré-tratamentos para sementes dormentes.

As sementes de *L. leucocephala* germinaram em todas as temperaturas de imersão em estudo, demonstrando potencial para se adaptar a diversos ambientes com diferentes temperaturas. A germinação ocorreu em uma ampla faixa de temperatura (-3,2 a 90,0 °C) e pode ter sido resultado de um alto vigor fisiológico do lote de sementes avaliado. Esta afirmação se baseou na relação direta da qualidade fisiológica de sementes com a amplitude de faixas ótimas de temperatura (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Os resultados obtidos fornecem indícios de que a germinação dessa espécie possa ocorrer, ainda, além da faixa de temperatura da água estudada (Figuras 1). A temperatura cardeal mínima da água para que as sementes sejam imersas e que haja germinação, provavelmente, está abaixo de -3,2 °C e a temperatura ótima e a máxima, acima de 90 °C. Em resumo, os resultados indicaram que a *L. leucocephala* é uma espécie tropical, correlacionando-se bem com sua distribuição geográfica. Mesma consideração foi realizada por Cavalcante e Perez (1995), todavia trabalhando com a germinação dessa espécie sob diferentes temperaturas em câmara climática. Mais pesquisas para a definição das temperaturas cardiais da água utilizada no processo de imersão de sementes são recomendadas para melhor compreensão da distribuição geográfica da espécie e fisiologia envolvida nos processos de dormência e germinação, além da redução no tempo para a produção de mudas.

A dormência tegumentar das sementes de *L. leucocephala* foi evidenciada pelo aumento expressivo de unidades embebidas (346,5 %) e germinadas (288,2 %,) quando sujeitas à imersão em água aquecida à 90 °C, no que se refere à média aritmética dos demais pré-tratamentos (T1 ao T4). Ressalta-se que a germinação *ex vitro* e sem pré-tratamentos dessa espécie é normalmente inferior a 50,0 % (KLUTHCOUSKI, 1982); foram encontrados valores de 32,7 % de germinação por Teles et al. (2000) e de 27,0 %, por Oliveira e Medeiros Filho (2007) e Oliveira (2008).

Considerando apenas o T5, a distribuição da oxidação do meio de cultivo no tempo se correlacionou com a germinação ($r = 0,78$; $p \leq 0,05$) e emissões de parte aérea ($r = 0,82$; $p \leq 0,05$) e de raiz secundária ($r = 0,86$; $p \leq 0,05$). Uma hipótese que deve ser considerada é a de que ocorreu liberação de compostos fenólicos precursores da síntese de lignina pelos propágulos em desenvolvimento, haja vista que, tecidos em fase de multiplicação, crescimento e diferenciação celular podem acumular polifenóis que participam da constituição química da parede celular. A origem desses compostos pode ser consequência da presença de reguladores de crescimento no próprio tecido vegetal; a auxina por sua vez, pode induzir a síntese de compostos de natureza fenólica (BASSAN et al., 2006). O elevado coeficiente de variação verificado para oxidação do meio de cultivo não impediu o efeito significativo das fontes de variação e, não necessariamente, foi gerado pela falta de um controle das condições experimentais (Tabela 1). A oxidação do meio nas unidades experimentais dos tratamentos T1 a T4 variou de 2,1 a 10,4 %. Estes valores foram baixos em relação ao T5 (31,3 %), principalmente, por ter sido realizado um cultivo direto após desinfestação e não ambientação no escuro; práticas que normalmente promovem a oxidação e reduz a sobrevivência de explantes (FREITAS et al., 2011). Assim, confirmando a provável influência da germinação e desenvolvimento vegetal na oxidação do meio.

As formulações adotadas para o meio de cultura propiciaram uma germinação e obtenção de plântulas saudáveis de *L. leucocephala*. A formulação de ágar foi adequada para o crescimento vegetal, mantendo as plântulas firmes ao substrato e permitindo o desenvolvimento radicular. Menores concentrações de auxina e maiores de antioxidantes,

como o polivinilpirrolidona, carvão ativado ou ácido ascórbico, são indicados para minimizar problemas com a oxidação fenólica. Esta oxidação deve ser controlada, visto que, o crescimento de explantes pode ser inibido devido à produção de substâncias como quinona durante a ação de polifenases (SATO et al., 2001). Recomenda-se ainda a substituição do meio de cultivo após germinação *in vitro* por outro com maior relação citocinina/auxina para estimular a multiplicação da parte aérea e propagação massal dessa espécie.

A germinação *in vitro* associada à pré-tratamentos podem ser indicados para a propagação de *L. leucocephala*, sobretudo, quando se objetiva a obtenção de propágulos vegetativos sadios e livre de patógenos. É importante enfatizar a necessidade de mais pesquisas sobre a embebição e fisiologia da germinação de *L. leucocephala* visando complementar informações sobre sua propagação, que ainda não se encontram descritas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

CONCLUSÕES

A germinação *in vitro* de *Leucaena leucocephala* se verifica quando as sementes são sujeitas a pré-tratamentos de imersão em água a uma ampla faixa de temperatura, com temperatura extrema mínima de germinação abaixo de -3,2 °C e máxima, assim como a ótima, acima de 90,0 °C.

A oxidação do meio de cultivo pode ser influenciada pela germinação e desenvolvimento da plântula de *Leucaena leucocephala*.

REFERÊNCIAS

- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. ed. 4 Jaboticabal: Funep, 2006, 237p.
- BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.
- BRASIL. Regras para análise de sementes – RAS. Ministério de, Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009, 395p.
- BRAUN, H.; LOPES, J. C.; SOUZA, L. T.; SCHMILDT, E. R.; CAVATTE, P. Q.; CAVATTE, P. C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 539-546, 2010.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. 4. ed. Jaboticabal - SP: UNESP, 2000, 588 p.
- CAVALVANTE, A. M. B.; PEREZ, S. C. J. G. A. Efeitos da temperatura sobre a germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 1995.

CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido**. 1993. 113f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba.

COSTA, J. N. M. N.; DURIGAN, G. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae): invasora ou ruderal? **Revista Árvore**, v. 34, n. 5, p. 825-833, 2010.

FERMINO JÚNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith – Fabaceae). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.

FERREIRA, C. D.; SOUTO, P. C.; LÚCIO, A. M. F. N.; SOUTO, J. S.; SOUZA, B. V. Avaliações biométricas e germinação de sementes de coaçu (*Triplaris surinamensis* Cham). **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 5, n. 1, p. 147-162, 2012.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FICK, T. A.; BISOGNIN, D. A.; QUADROS, K. M.; HORBACH, M.; REINIGER, L. R. S. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 4, p. 343-349, 2007.

FREITAS, D. V.; CONTIM, L. A. S.; DIAS, D. P.; FERREIRA, W. C.; SANTOS, R. C. Estabelecimento *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): efeito do benomyl como regulador de crescimento. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 489, 496, 2011.

GAMA, T. C. M.; ZAGO, V. C. P.; NICODEMO, M. L. F.; LAURA, V. A.; VOLPE, E.; MORAIS, M. G. Composição bromatológica, digestibilidade *in vitro* e produção de biomassa de leguminosas forrageiras lenhosas cultivadas em solo arenoso. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 3, p. 560-572, 2009.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; FONSECA, E. M. **Biometria de frutos e endocarpos de murici** (*Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex A. Juss.). *Cerne*, Lavras, v. 12, n. 1, p. 84-91, 2006.

JHA, A. K.; PRAKASH, S.; JAIN, N.; NANDA, K.; GUPTA, S. C. Micropropagation of *Sesbania rostrata* from the cotyledonary node. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 2, p. 289-292, 2004.

KLUTHCOUSKI, J. **Leucena: alternativa para a pequena e média agricultura**. 2 ed. Brasília-DF: EMBRAPA-DID, 1982, 12p.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **Hort Science**, v.15, n.3, p.416-417, 1980.

MAGUIRRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling and vigour. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

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

NASCIMENTO, P. K. V.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rígida* Benth (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 141-143, 2007.

OLIVEIRA, A. B. Germinação de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.) var. K-72. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 2, p. 166-172, 2008.

OLIVEIRA, A. B.; MEDEIROS FILHO, S. Influência de tratamentos pré-germinativos, temperatura e luminosidade na germinação de sementes de leucena, cv. Cunningham. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 4, p. 268-274, 2007.

PEREZ, S. C.J. G.; PRADO, C. H. B. A. Efeito de diferentes tratamentos pré-germinativos e da concentração de alumínio no processo germinativo de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 15, n. 1, p. 115-118, 1993.

RAMPIM, L.; KLEIN, J.; TSUTSUMI, C. Y.; MARCHIOTTI, B. G.; GUIMARÃES, V. F. Desenvolvimento inicial de plântulas de *Peltophorum dubium* e *Leucaena leucocephala* inoculadas com bactérias diazotróficas. **Floresta**, v. 44, n. 4, p. 597-606, 2014.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Métodos estatísticos aplicados à melhoria da qualidade**. 1 ed., Viçosa: Editora UFV., 2012, 385p.

ROSA, F. C.; REINIGER, L. R. S.; GOLLE, D. P.; MUNIZ, M. F. B.; CURTI, A. R. Superação da dormência e germinação *in vitro* de sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth). **Seminana: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1021-1026, 2012.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

TELES, M. M.; ALVES, A. A.; OLIVEIRA, J. C. G.; BEZERRA, M. E. Métodos para quebra da dormência em sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 387-391, 2000.

WHITE, P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, v.30, p.33-36, 1943.