

**INSTITUTO FEDERAL DE MINAS GERAIS
CAMPUS SÃO JOÃO EVANGELISTA
NATANIELLY RODRIGUES AVELINO**

**TRATAMENTOS TÉRMICOS NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Leucaena
leucocephala* (LAM.) R. DE WIT (FABACEAE-MIMOSOIDEAE)**

**SÃO JOÃO EVANGELISTA
2015**

NATANIELLY RODRIGUES AVELINO

**TRATAMENTOS TÉRMICOS NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Leucaena*
leucocephala (LAM.) R. DE WIT (FABACEAE-MIMOSOIDEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto Federal de Minas Gerais – Campus
São João Evangelista como exigência parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Agronomia.

Orientador: Alisson José Eufrásio de Carvalho

SÃO JOÃO EVANGELISTA

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

A949t Avelino, Natanielly Rodrigues
2015

Tratamentos térmicos na germinação in vitro de *Leucaena leucocephala* (LAM.) R. de Wit (fabaceae-mimosoideae) / Natanielly Rodrigues Avelino. – 2015.

27 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista, 2015.

Orientador: Me. Alisson José Eufrásio de Carvalho.

1. Propagação. 2. Pré-tratamentos. 3. Sementes. I. Avelino, Natanielly Rodrigues. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista. III. Título.

CDD 630

Elaborada pela Biblioteca Professor Pedro Valério – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista.

Bibliotecário Responsável: Veríssimo Amaral Matias – CRB-6/3266

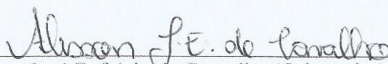
NATANIELLY RODRIGUES AVELINO

TRATAMENTOS TÉRMICOS NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Leucaena*
leucocephala (LAM.) R. DE WIT (FABACEAE-MIMOSOIDEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto Federal de Minas Gerais – Campus
São João Evangelista como exigência parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Agronomia.

Aprovado em: 21 / 12 / 2015

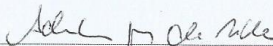
BANCA EXAMINADORA



Prof. Me. Alisson José Eufrásio de Carvalho (Orientador) - Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia de Minas Gerais - Campus São João Evangelista.



Prof. Me. Bruno Oliveira Lafetá - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de
Minas Gerais - Campus São João Evangelista.



Prof. Dr. Aderlan Gomes da Silva - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de
Minas Gerais - Campus São João Evangelista.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, o mentor da minha vida, que me auxilia em todos os momentos de súplica. Que me guia, rege e fortalece. Pai amado, ao qual devo respeito e obediência.

Agradeço com grande amor a meus pais, irmãos e familiares, pelo apoio durante minha trajetória de vida, possibilitando a realização desse sonho.

Um muito obrigada especial à minha mãe, espelho de vida, exemplo de mulher, a qual dedico de todo coração essa conquista.

A todos os docentes do Instituto que contribuíram para minha formação ao longo desses 5 anos. Vocês além de me formarem Agrônoma, me educaram e contribuíram com meu crescimento. Um agradecimento especial e em memória ao professor Dr. Elton Valente, que ministrou em nosso primeiro período da graduação a disciplina “Introdução a Agronomia”, ensinando-nos o encanto dessa profissão.

Ao meu orientador Me. Alisson José Eufrásio de Carvalho, por sua paciência, dedicação e incentivo incondicional na orientação, fazendo-me acreditar que sempre podemos mais.

Ao Sr. Paulo Modesto Campos, pela orientação e apoio durante a execução desse projeto.

A aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a concretização desse trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – *campus* São João Evangelista pelo apoio estrutural e logístico para o desenvolvimento do presente trabalho.

Muito obrigada!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o
que era antes”.*

(Marthin Luther King)

RESUMO

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. À medida que aumentou a temperatura da água, mais plântulas foram obtidas em menor tempo. 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 *L. leucocephala*.

Palavras-chave: propagação; pré-tratamentos; sementes.

ABSTRACT

Leucena (*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. With increasing water temperature, more seedlings were obtained in shorter time. 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 *L. leucocephala*.

Keywords: propagation; pretreatments; seeds.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resumo da análise de variância com os dados transformados dos atributos avaliados durante a germinação <i>in vitro</i> da <i>L. leucocephala</i>	17
Tabela 2.	Estatísticas dos ajustes realizados para estimar os atributos avaliados durante a germinação <i>in vitro</i> da <i>L. leucocephala</i> em função da temperatura de imersão.....	17

LISTA DE FIGURAS

- 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), Germinação (G), Parte Aérea (PA), Raiz Secundária (RS) e Oxidação do Meio de Cultivo (OMC)..... 18
- Figura 2.** Representação gráfica da evolução dos atributos avaliados durante a germinação *in vitro* de *Leucaena leucocephala*. Embebição (E), Germinação (G), Parte Aérea (PA), Raiz Secundária (RS) e Oxidação do Meio de Cultivo (OMC)..... 20
- Figura 3.** Imagens da germinação *in vitro* de *L. leucocephala*. a) sementes no dia da semeadura *in vitro* em tubo de ensaio vedado com papel alumínio e filme plástico; b) semente embebida após 1 dia; c) protrusão da radícula e parte aérea emitida após 6 dias; d) e e) plântulas formando raízes secundárias após 12 dias; f) plântula formada após 30 dias; g) plântula com folhas compostas e h) sistema radicular pivotante com raízes secundárias..... 21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	A ESPÉCIE <i>Leucaena leucocephala</i> (LAM.) R. DE WIT	11
2.2	SEMENTES DORMENTES	12
2.3	GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5	CONCLUSÕES.....	22
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1 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; LORENZI et al., 2003). 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; LORENZI et al., 2003; PRATES et al., 2000).

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 (BORGES et al., 2006; FICK et al., 2007). Diante à dificuldade de se estabelecer indivíduos adultos em laboratório, pesquisas podem ser viabilizadas com plântulas obtidas por meio da semeadura *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; LENCINA et al., 2014). Condições ambientais apropriadas para a germinação podem ser fornecidas em laboratórios destinados à multiplicação *in vitro* (BRAUN et al., 2010; COELHO et al., 2001).

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 (DUTRA et al., 2009; 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; DUTRA et al., 2009).

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*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A ESPÉCIE *Leucaena leucocephala* (LAM.) R. DE WIT

Leucaena leucocephala (Lam.) R. de Wit, conhecida popularmente como leucena, é uma Fabaceae-Mimosoideae semidecídua de rápido crescimento e com capacidade nitrificadora (JUBE e BORTHAKUR, 2010). É de interesse econômico e ambiental, possuindo aptidão para a rebrota e rusticidade a diversas condições edafoclimáticas (COSTA

e DURIGAN, 2010; FONSECA e JACOBI, 2011). A árvore apresenta um tronco com casca lisa de cor parda, folhas alternas compostas com folíolos elítico-lineares e frutos do tipo vagens achatadas lineares e deiscentes, com sementes planas de cor amarronzada (LORENZI et al., 2003). As raízes permitem a absorção de água nas camadas profundas do solo, fazendo com que a planta se mantenha verde durante todo o ano, perdendo somente os folíolos quando sujeita a déficit hídrico prolongado (KLUTHCOUSKI, 1982; OLIVEIRA, 2008).

O sistema radicular da espécie é profundo, propicia reciclagem de nutrientes do subsolo e se desenvolve em simbiose com bactérias e fungos dos gêneros *Rhizobium* e *Mycorrhizae*, respectivamente, viabilizando o uso do fósforo não disponível para as demais culturas em rotação (KLUTHCOUSKI, 1982). Assim, é comumente empregada na adubação verde, no consórcio com culturas anuais em sistemas silviagrícolas e para a proteção do solo e água em programas para a recuperação de áreas degradadas (MENDES et al., 2011). Suas folhas são consideradas forrageiras para a alimentação animal e a madeira pode ser aproveitada como lenha (LORENZI et al., 2003)

2.2 SEMENTES DORMENTES

A dormência é um fenômeno inerente à semente, que funciona como mecanismo natural de resistência às condições adversas do meio (ALBUQUERQUE et al., 2007). Trata-se de uma característica evolucionária adaptativa que garante a sobrevivência e perpetuação de determinadas espécies e, em alguns casos, mantém as sementes viáveis por um longo período de tempo até a germinação em condições ambientais favoráveis (FLORIANO, 2004). Por outro lado, os aspectos negativos desse fenômeno para o silvicultor relacionam-se à desuniformidade da produção de mudas e, devido ao retardo da germinação, contribui para a longevidade de plantas invasoras quando adotado o plantio direto (OLIVEIRA, 2008).

A dormência pode se manifestar de três maneiras distintas ou combinadas segundo Albuquerque et al. (2007): tegumentar (impedimento físico imposto pelo tegumento), fisiológica (embrião com algum mecanismo fisiológico específico que impede a protrusão radicular) e o desequilíbrio entre substâncias inibidoras e promotoras da germinação. Sementes dormentes são comuns nas famílias Fabaceae, Anarcadiaceae, Cannaceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Graminaceae, Malvaceae, Solanaceae e Rhamnaceae (SAMPAIO et al., 2001; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

As sementes de *L. leucocephala* apresentam dormência natural, causada pela impermeabilidade do tegumento à água, prejudicando seu estabelecimento em campo (TELES et al., 2000). É conveniente a superação desse bloqueio por meio da escarificação do tegumento com pré-tratamentos físicos, químicos ou mecânicos (BRASIL, 2009; KLUTHCOUSKI, 1982). Na escarificação física, as sementes são imersas em água aquecida ou fria por um dado período de tempo; a química consiste na imersão das sementes em álcool, ácidos ou bases e; a mecânica fundamenta-se na fricção do tegumento das sementes em superfícies abrasivas (BRASIL, 2009). Todos os pré-tratamentos anteriormente citados visam o enfraquecimento do tegumento e permitem o fluxo aquoso e troca de gases, essenciais para iniciar o processo germinativo (FLORIANO, 2004). A eficiência de cada pré-tratamento depende do tipo e grau da dormência.

A escarificação física baseada na imersão das sementes em água aquecida ou fria é um método simples e pouco oneroso, utilizado com sucesso para superação de dormências tegumentares (AZEDED O et al., 2010). Além do que, a temperatura da água pode ser facilmente manipulada a fim de maximizar a germinação e obtenção de plântulas vigorosas. Salienta-se que a eficiência do tratamento térmico depende do tipo e grau da dormência, que é variável entre espécies e procedências (AZEREDO et al., 2010).

2.3 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

O cultivo *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica que oferece um conjunto de técnicas para a propagação de plantas; exemplos: germinação e crescimento *in vitro*, embriogênese somática, organogênese e proliferação de gemas axilares (MALDANER et al., 2014; XAVIER et al., 2013). Em cada técnica é usado um tipo de explante, que são fragmentos de tecido vegetal vivo, podendo ser originados de porções da planta como folhas, caules, raízes, sementes ou anteras.

A germinação *in vitro* por sua vez, é uma técnica de propagação que consiste no uso de sementes para formar plântulas inteiras com controle fitossanitário. As plântulas produzidas podem ser conservadas em bancos de germoplasma para futuras pesquisas, melhoramento genético e, como fonte de explantes, para a multiplicação e produção massal de mudas (OLIVEIRA et al., 2014).

Explantes oriundos de espécies lenhosas podem apresentar infestações interna e externa por micro-organismos, dificultando o estabelecimento *in vitro* (COUTO et al., 2004).

Plântulas oriundas da germinação *in vitro* são livres de fitopatógenos e são uma alternativa vantajosa para o sucesso da fase de multiplicação na micropropagação. Laboratórios destinados à multiplicação *in vitro* fornecem condições adequadas aos processos germinativos e desenvolvimento inicial da plântula, podendo apresentar maiores porcentagens de germinação do que em viveiros (NOLETO e SILVEIRA, 2004).

No cultivo *in vitro*, é realizado um controle rigoroso da nutrição, fotoperíodo, umidade, temperatura e, principalmente, assepsia (DUTRA et al., 2009). É comum o uso de meios de cultura na germinação *in vitro* de sementes, as formulações mais conhecidas são MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), JADS (CORREIA, 1993) e WPM (*Wood Plant Medium*) (LLOYD e MCCOWN, 1980). Um meio adequado deve fornecer ao explante nutrientes minerais, aminoácidos, vitaminas, açúcares e reguladores de crescimento, além de apresentar solidez para o crescimento radicular, sustentação vegetal e mobilidade de seus constituintes (HOPPE et al., 2004). Ressalta-se que durante o cultivo *in vitro*, os constituintes do meio possuem papel nutritivo e osmótico, influenciando o crescimento celular e morfogênese (NOGUEIRA et al., 2004).

3 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; CHAVES e USBERTI, 2003).

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}), polivinilpirrolidona (1000 mg.L^{-1}), sacarose (30 g.L^{-1}), ágar bacteriológico ISO FAR (6 g.L^{-1}), $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina) e $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA (ácido naftalenoacético), com pH ajustado para $5,75 \pm 0,05$. 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;

N_1 = número de sementes germinadas na 1ª contagem;

D_1 = número de dias para a 1ª 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 ($\text{arc sen } \sqrt{x/100}$) 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).

4 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) e Oxidação do Meio de Cultivo (OMC).
 *Significativo ($p \leq 0,05$).
 nsNão significativo ($p > 0,05$).

Todos os parâmetros das equações abaixo 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), Oxidação do Meio de Cultivo (OMC)
 FA = Falta de ajuste. $\bar{R}^2$ = Coeficiente de determinação ajustado.

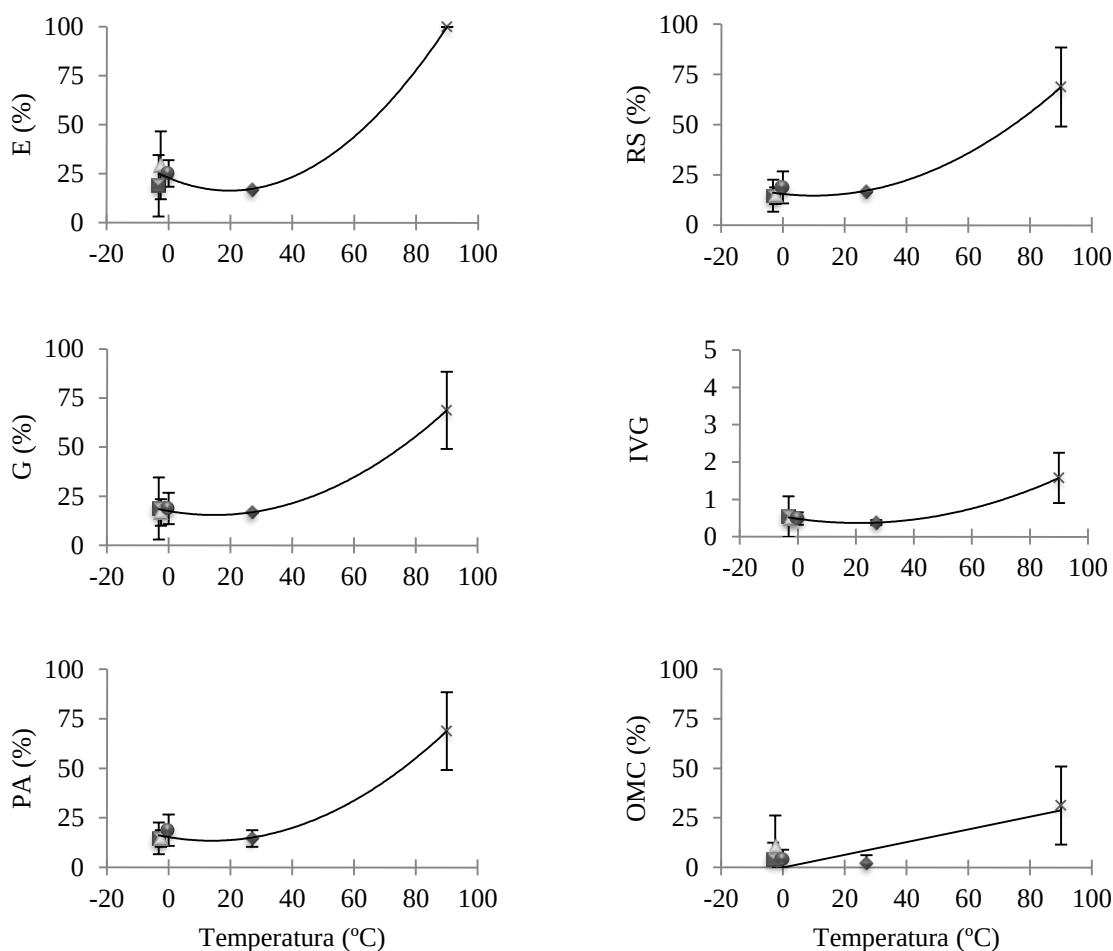
*Significativo ($p \leq 0,05$).

^{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), Germinação (G), Índice de velocidade de Germinação (IVG), Parte Aérea (PA), Raiz Secundária (RS) e Oxidação do Meio de Cultivo (OMC). Quadrado = -3,2°C; Triângulo = -2,5°C; Círculo = 0,0°C; Losango = 27,0°C e x = 90,0°C.

Fonte: o autor.

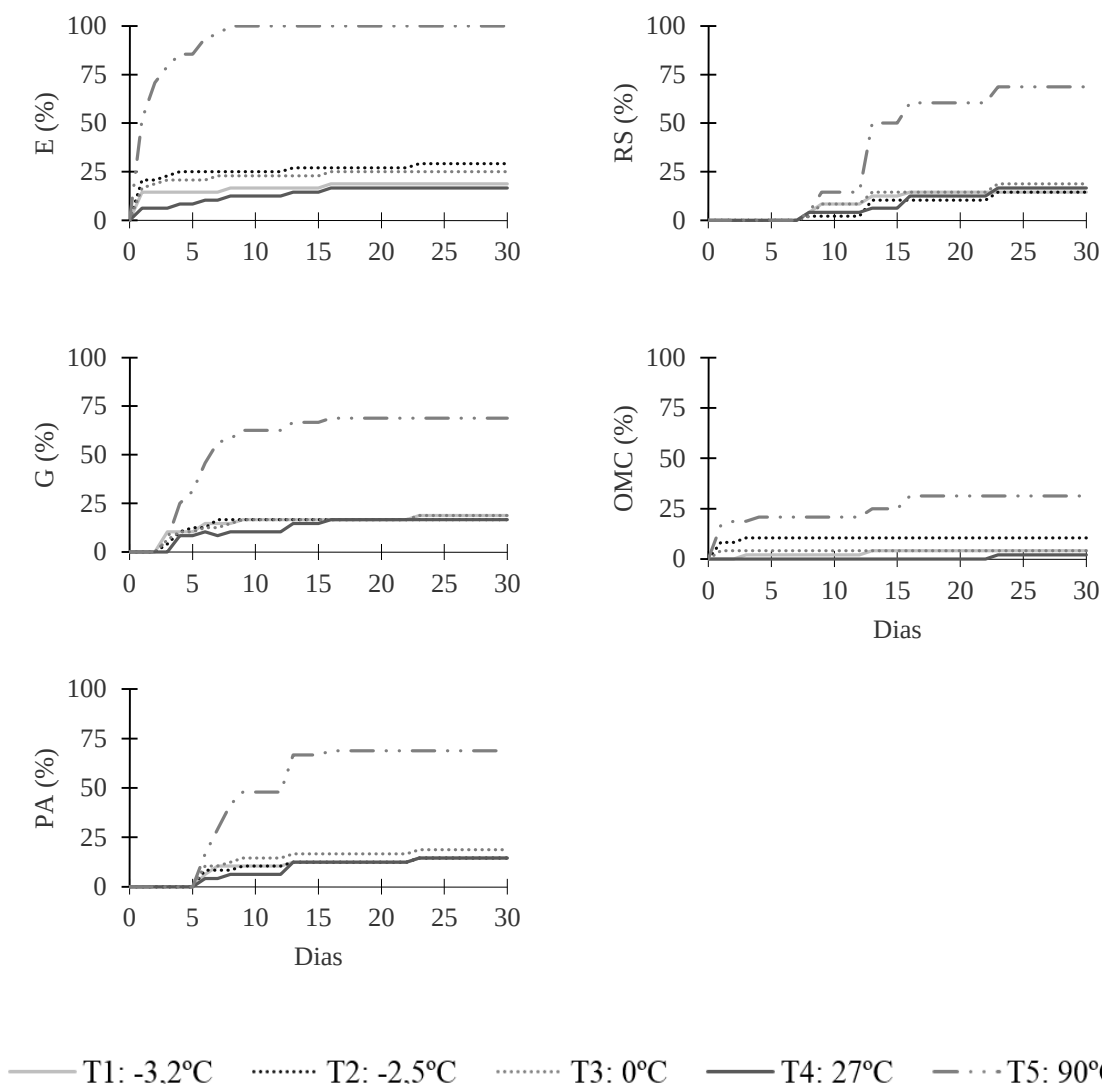
As temperaturas estudadas se correlacionaram positivamente com a embebição ($r = 0,87$; $p \leq 0,05$), germinação ($r = 0,83$; $p \leq 0,05$), emissões de parte aérea ($r = 0,87$;

$p \leq 0,05$) 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 e 2). A temperatura cardinal 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.

Figura 2 - Representação gráfica da evolução dos atributos avaliados durante a germinação *in vitro* de *L. leucocephala*.



Embebição (E), Germinação (G), Parte Aérea (PA), Raiz Secundária (RS) e Oxidação do Meio de Cultivo (OMC).

Fonte: o autor.

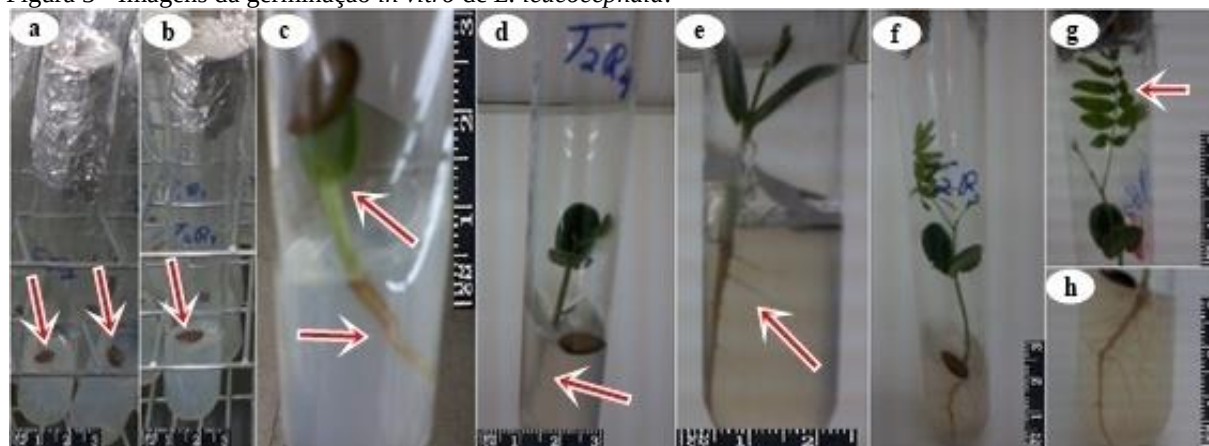
A dormência tegumentar das sementes de *L. leucocephala* foi evidenciada pelo aumento expressivo de unidades embebidas (346,5 %) e germinadas (288,2 %,) quando sujeitas à imersão em água aquecida à 90 °C, no que se refere à média aritmética dos demais pré-tratamentos (T1 ao T4). Ressalta-se que a germinação *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), de 4,3 % por Áquila e Fett Neto (1988) 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; HUBNER et al., 2007).

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. Na Figura 3, é possível observar as fases que envolveram a embebição das sementes até o completo desenvolvimento de uma plântula de *L. leucocephala*, com sistema radicular pivotante e distribuído ao longo do tubo de ensaio.

Figura 3 - Imagens da germinação *in vitro* de *L. leucocephala*.



a) sementes no dia da sementeira *in vitro* em tubo de ensaio vedado com papel alumínio e filme plástico; b) semente embebida após 1 dia; c) protrusão da radícula e parte aérea emitida após 6 dias; d) e e) plântulas formando raízes secundárias após 12 dias; f) plântula formada após 30 dias; g) plântula com folhas compostas e h) sistema radicular pivotante com raízes secundárias.

Fonte: o autor.

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 (Figura 3). 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 (GOLLE et al., 2010; SATO et al., 2001; COSTA et al., 2006). 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 a 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).

5 CONCLUSÕES

Nas condições metodológicas em que foi conduzido o experimento, pode-se concluir que:

- 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 BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVES, E. U.; BRAGA JÚNIOR, J. M.; BRUNO, R. L. A.; OLIVEIRA, A. P.; CARDOSO, E. A.; ALVES, A. U.; ALVES, A. U.; SILVA, K. B. Método para quebra de dormência de unidades de dispersão de *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Revista Árvore**, v 32, n. 3, p. 407-415, 2008.

ÁQUILA, M. E. A.; FETT NETO, A. G. Influência de processos de escarificação na germinação e crescimento inicial de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 10, n. 1, p. 73-85, 1988.

ARAÚJO, T. V.; JOAQUIM, W. M.; BARJA, P. R. Técnicas de quebra de dormência e estudo de substratos orgânicos para produção de mudas de leucena. **Revista Univap**, São José dos Campos-SP, v. 18, n. 32, p. 89-99, 2012.

AZEREDO, G. A.; PAULA, R. C.; VALERI, S. V.; MORO, F. V. Superação de dormência de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 49-58, 2010.

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 canafistula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BORGES, N. S. S.; BENBADIS, A. K.; MARCO, C. A.; SOMBRA, J. N. S. Avaliação da descontaminação, germinação e respostas morfogênicas do mamão cultivado *in vitro* (*Carica papaya* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 2, p. 308-313, 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.

CHAVES, M. M. F.; USBERTI, R. Previsão da longevidade de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 4, p. 557-564, 2003.

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

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, 1993.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e n⁶-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, CV. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

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.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v. 28, n. 5, p. 633-642, 2004.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, 2009.

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.

FLORIANO, E. P. Germinação e dormência de sementes florestais. Caderno Didático nº 2, 1 ed. Santa Rosa, 2004. 19p.

FLORIANO, E. P. **Germinação e dormência de sementes florestais**. Santa Rosa: Caderno didático, n. 2, 1ª ed., 2004, 19 p.

FONSECA, N. G.; JACOBI, C. M. Desempenho germinativo da invasora *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. e comparação com *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. e *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. (Fabaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 1, p. 191-197, 2011.

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.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; HANAUER, J. G.; WALDOW, D. A. G. Substratos alternativos e tratamentos pré-germinativos na germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, v. 34, n. 1, p. 39-48, 2010.

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.

HOPPE, J. M. et. al. **Produção de sementes e mudas florestais**. Caderno didático, Santa Maria, n 1, 2ª ed. 2004, 388 p.

HUBNER, H. I.; SILVA, L. V.; CAPATTI, I.; FUMAGALI, E.; SOUTO, E. R.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B. Multiplicação *in vitro* de *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 29, n.1, p. 63-66, 2007.

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.

JUBE, S. L. R.; BORTHAKUR, D. Transgenic *Leucaena leucocephala* expressing the Rhizobium gene *pyda* encoding a meta-cleavage dioxygenase shows reduced minosine conten. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 273-278, 2010.

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

LENCINA, K. H.; BISOGNIN, D. A.; KIELSE, P.; PIMENTEL, N.; FLEIG, F. D. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grápia. **Ciência Rural**, v. 44, n. 6, p. 1025-1030, 2014.

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

LOPES, J. C.; CAPUCHO, M. T.; MARTINS FILHO, S. M.; REPOSSI, P. A. Influência de temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de bortalha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 18-24, 2005.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil**: madeireiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2003, 385p.

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.

MALDANER, J.; SCHWALBERT, R.; SALDANHA, C. W.; CONTERATO, I. F.; STEFFEN, G. P. K. Procedimentos para cultivo *in vitro* de *Desmonium incanum*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 2533-2542, 2014.

MARTINELLI-SENEME, A.; POSSAMAI, E.; SCHUTA, L. R.; VANZOLINI, S. Germinação e sanidade de sementes de *Bahinia variegata*. **Revista Árvore**, v. 30, n. 5, p. 719-724, 2006.

MENDES, S. S.; MESQUITA, J. B.; MARINO, R. H. Qualidade sanitária de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit armazenadas em câmara fria. **Natural Resources**, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2011.

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 rigida* Benth (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 141-143, 2007.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.33, p.109-120, 2004.

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.

OLIVEIRA, K. S.; OLIVEIRA, M. S.; PEREIRA, E. C.; LIMA, S. C.; ALOUFA, M. A. I. Efeito de diferentes meios de cultura na germinação *in vitro* de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Árvore**, v. 38, n. 4, p. 601-607, 2014.

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.

PRATES, H. T.; PAES, J. M.V.; PIRES, N. M.; PEREIRA FILHO, I. A.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 35, n. 5, p. 909-914, 2000.

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.

RASTOGI, S.; RIZVI, S. M. H.; SINGH, R. P.; DWIVEDI, U. N. *In vitro* regeneration of *Leucaena leucocephala* by organogenesis and somatic embryogenesis. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 4, p. 743-748, 2008.

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.

SAMPAIO, L. S. V.; PEIXOTO, C. P.; PEIXOTO, M. F. S. P.; COSTA, J. A.; GARRIDO, M. S.; MENDES, L. N. Ácido sulfúrico na superação da dormência de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* H. B. K. – Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 184-190, 2001.

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.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas de propagação vegetativa**. 2 ed. Viçosa-MG: Editora UFV, 2013, 272p.