

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
UFVJM**

MARCONE MOREIRA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FRUTOS, SEMENTES E
PLÂNTULAS, GERMINAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE *Terminalia*
fagifolia e *Terminalia argentea* (COMBRETACEAE)**

**DIAMANTINA
2014**

MARCONE MOREIRA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FRUTOS, SEMENTES E
PLÂNTULAS, GERMINAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE *Terminalia*
fagifolia e *Terminalia argentea* (COMBRETACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, nível de mestrado, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Miranda Titon - UFVJM
Co-orientador: Prof. Marcio Leles Romarco de Oliveira - UFVJM
Co-orientador: Prof. Marcelo Luiz de Laia - UFVJM

DIAMANTINA, 2014

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nathália Machado Laponez Maia – CRB6/3002

S237c 2014	<p>Santos, Marcone Moreira. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas, germinação e micropropagação de <i>Terminalia fagifolia</i> e <i>Terminalia argentea</i> (Combretaceae) / Marcone Moreira Santos. – 2014. 60 p. : il., gráfs.</p> <p>Orientadora: Prof^a. Dr^a. Miranda Titon Coorientadores: Prof. Dr. Márcio Leles Romarco de Oliveira Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia.</p> <p>Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, 2014.</p> <p>1. Sementes florestais. 2. Germinação. 3. Micropropagação. I. Titon, Miranda. II. Oliveira, Márcio Leles Romarco de. III. Laia, Marcelo Luiz de. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. V. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 631.531</p>
---------------	---

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FRUTOS, SEMENTES E
PLÂNTULAS, GERMINAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE *Terminalia*
fagifolia e *Terminalia argentea* (COMBRETACEAE)**

MARCONE MOREIRA SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, nível de mestrado, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

Aprovada em:

Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges - UFV

Prof. Miranda Titon- UFVJM

Prof. Marcio Leles Romarco de Oliveira- UFVJM

Prof. Marcelo Luiz de Laia - UFVJM

DIAMANTINA
2014

**Dedico a Deus, meus pais,
familiares e amigos que
torceram e de alguma
forma contribuíram para
essa conquista**

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e por me conduzir na realização dos meus sonhos.

A minha mãe M^a Geralda, que me permite voar às nuvens e ao meu pai José Luíz, que me mantém com os pés no chão. Meus exemplos de honestidade, força e amor incondicional. À vocês e a Deus, dedico tudo que sou, tudo que tenho.

Aos meus irmãos Mislene, Marlúcio e Márcia que sempre me apoiaram e me deram meus sobrinhos que alegram meus dias.

Aos meus demais familiares, em especial minha avó pelo apoio e orações, meus padrinhos e ao Trakinas, que se tornou um grande irmão.

A minha orientadora Profa. Miranda Titon pelos ensinamentos, paciência, atenção e principalmente pelo respeito e contribuição às minhas ideias.

Aos professores membros da banca Marcio L. Romarco, Marcelo Laia e Eduardo Borges pela disponibilidade e atenção prestadas.

Ao Breno e à Auwdréia pelos ensinamentos e ajuda prestados durante essa trajetória.

A todos os amigos do mestrado com quem convivi e troquei experiências.

A toda equipe do Laboratório de Melhoramento Florestal.

Aos meus amigos de Caetanópolis em especial Frank (Juh), Vanessa, João, Paulo, Gleisson e Adécio, o encorajamento e torcida de vocês foram primordiais.

Aos SPQNGS por sempre estarem ao meu lado e proporcionar momentos maravilhosos, Amanda (Carminha), Rodrigo, Kamilla, Lorena (Des), Lili, Maiume, Lady Daia, Petter, Letícia e Dirceu. Obrigado pela companhia, companheirismo e amizade.

Aos meus amigos que a anos vêm me acompanhando, apoiando e me proporcionando um novo conceito de família, em especial a Luciana, David, Paulo, Gabi, Rebecca, Macella, Mari, Ludmila, Laís, Any, Fillipe, Amanda, Raíssa e Luíra.

Aos amigos que mesmo de longe sempre se fizeram presentes em especial Raíra, Camile, Natália, Kell, Isamala, Liliane, Alessandra, Rosado, Febre, Vitor Batista e Diego.

Aos amigos que esse tempinho extra em Diamantina me trouxe: Karla (Cristiane), Rafael, Felipe, Maurício, Bebel, Jô, Túlio e Raquel. A convivência foi curta, mas o amor, cumplicidade e momentos foram simplesmente indescritíveis.

Aos meus alunos da Sociologia, Extensão Rural e Fisiologia vegetal, que a cada dia me fizeram redescobrir minha paixão e me incentivarem a continuar na busca desse sonho.

A CAPES pela concessão da bolsa e a UFVJM pela oportunidade e auxílio financeiro.

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 1	
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas.	21
2.2. Grau de umidade	21
2.3. Experimentos de Germinação	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.1. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas.	22
3.1.1. Caracterização morfológica de frutos.....	22
3.1.2. Caracterização morfológica das sementes.....	24
3.1.3. Caracterização morfológica das plântulas.....	25
3.2. Grau de umidade.....	27
3.3. Experimentos de Germinação	29
4. CONCLUSÕES	34
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

CAPÍTULO 2

RESUMO....	39
ABSTRACT	40
1. INTRODUÇÃO.....	41
2.- MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1. Desinfestação e Germinação in vitro de <i>T. fagifolia</i> e <i>T. argentea</i>	43
2.2. Multiplicação de <i>Terminalia argentea</i>	44
2.3. Enraizamento	45
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1. Desinfestação e germinação in vitro de <i>Terminalia fagifolia</i> e <i>T. Argentea</i>	46
3.2. Germinação in vitro de <i>T. argentea</i>	51
2.3. Multiplicação de <i>Terminalia argentea</i>	51
2.4. Enraizamento	55
3- CONCLUSÕES	57
4- CONCLUSÕES GERAIS	57
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

RESUMO

SANTOS, Marcone Moreira. **Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas, germinação e micropropagação de *Terminalia fagifolia* e *Terminalia argentea* (Combretaceae)**. 60f. (Dissertação - Mestrado em Ciência Florestal). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

O trabalho teve por objetivos caracterizar morfológicamente frutos, sementes e plântulas de *Terminalia fagifolia* e *Terminalia argentea*, avaliar o percentual de germinação das sementes em resposta ao armazenamento e tratamentos de superação de dormência, e desenvolver uma metodologia de micropropagação a partir de plântulas germinadas *in vitro* para ambas espécies. Para a caracterização morfológica, foram amostrados 100 frutos e 100 sementes, dos quais foram avaliadas características como coloração, textura, comprimento, largura e estruturas morfológicas. A umidade foi determinada pelo método de estufa a $103\pm 2^{\circ}\text{C}$. A germinação foi realizada em câmara de germinação tipo BOD, utilizando caixas tipo Gerbox (15x15 cm) contendo areia esterilizada e água destilada, sob temperatura de 30°C e fotoperíodo de 16 horas. Foram testados os seguintes tratamentos para superação da dormência: Controle; escarificação em esmeril, escarificação com ácido sulfúrico P.A por 5 minutos; imersão em água fervente por 5 minutos; e embebição em água em temperatura ambiente por 24 horas. A umidade e germinação foram realizados em sementes recém colhidas e com 2, 4 e 6 meses de armazenamento em câmara fria. Para a desinfestação foram instalados quatro experimentos *in vitro*. No primeiro, as sementes de *T. fagifolia* foram lavadas, escarificadas em ácido sulfúrico por 5 minutos e posteriormente imersas em solução de álcool 70% por 30 segundos e, logo após, em solução de hipoclorito de sódio a 5%, sendo adicionado 4 a 5 gotas de Tween 20 para cada 100 ml de solução. Foram utilizados os tempos de imersão de 5, 10, 15, 20 e 25 minutos em hipoclorito de sódio a 5%, os quais constituíram cinco tratamentos. No experimento II, os procedimentos foram semelhantes aos descritos no experimento I, diferindo com relação aos tratamentos utilizados. Foram testados os tempos de imersão de 5, 10, 15, 20 e 25 minutos em solução de Digluconato de Clorexidina a 5 mgL^{-1} . Nos experimentos III e IV, para *T. argentea*, os procedimentos foram semelhantes as experimento I, no entanto, no experimento IV, as sementes tiveram seu tegumento retirado. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas e tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultura MS. Na fase de multiplicação, para cultivo inicial, plântulas de *T. argentea* obtidas no experimento IV da etapa anterior foram segmentadas e seus segmentos nodais foram inoculadas em Meio de cultivo MS acrescidos de $0,03\text{ mgL}^{-1}$ de ANA e BAP nas concentrações de 0,1; 0,15; 0,2; 0,4; e $0,6\text{ mgL}^{-1}$. Para os subcultivos 1 e 2, gemas axilares oriundas das brotações do cultivo inicial e subcultivo 1, respectivamente, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura básico adicionado de $0,15\text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,03\text{ mg L}^{-1}$ de ANA. Na fase de enraizamento, os explantes do subcultivo 2 com comprimento superior a 2 cm, foram

inoculados em tubos contendo 10 ml do meio MS acrescido de 0; 1,0; 2,0 e 4,0 mgL⁻¹ de AIB. De modo geral, o tempo de armazenamento e os tratamentos pré-germinativos não influenciaram a germinação de *T. fagifolia*. Para *T. argentea* o armazenamento por 60 dias e a imersão em água por 24 horas proporcionou maiores percentuais de germinação. Para a desinfestação *in vitro* o hipoclorito de sódio e o digluconato de clorexidina não foram eficientes para promover a descontaminação das sementes de *T. fagifolia*, no entanto, a retirada do tegumento e a imersão das sementes por 25 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% se mostrou eficiente para promover a desinfestação e germinação *in vitro* de *T. argentea*. Na fase de multiplicação, a adição de 0,15 mgL⁻¹ de BAP favoreceu o surgimento de brotações em segmentos nodais de *T. argentea*, enquanto a adição de 4,0 mgL⁻¹ de AIB ao meio de cultivo favoreceu o enraizamento para a espécie.

Palavras chave: sementes florestais, , cultura de tecidos, armazenamento de sementes

ABSTRACT

The study aimed to, morphologically characterize fruits, seeds and seedlings of *Terminalia fagifolia* and *Terminalia argentea* and evaluate the physiological quality of seeds and develop a method for micropropagation for both species. For morphological, 100 and 100 fruit seeds, including features such as color, texture , length , width and morphological structures were evaluated were sampled . Moisture was determined by oven method at 103 ° C ± 2 . Germination was carried out in a germination chamber BOD using type Gerbox (15x15 cm) boxes containing sterilized sand and distilled water with a temperature of 30 ° C and 16 h photoperiod . , Scarification on Emery , PA scarification with sulfuric acid for 5 minutes, immersion in boiling water for 5 minutes , and soaking in water at room temperature for 24 hours Control : The following treatments to break dormancy were tested. The moisture and germination were performed on freshly harvested and 2 , 4 and 6 months of storage in cold camera seeds . For disinfection were mounted four experiments . At first, the seeds of *T. fagifolia* were washed, scarified in sulfuric acid for 5 minutes and then immersed in 70% alcohol for 30 seconds and, subsequently , in a solution of sodium hypochlorite 5 % with added 4 to 5 drops of Tween 20 per 100 ml of solution. Immersion times of 5 , 10, 15 , 20 and 25 minutes in a sodium hypochlorite 5 % , which constitute five treatments were used. In experiment II, the procedures were similar to those described in experiment I, differing with respect to treatments. Immersion times of 5, 10, 15, 20 and 25 minutes in a solution of chlorhexidine gluconate to 5 mgL⁻¹ were tested. In the experiments III and IV, *T. argentea*, the procedures were similar to the experiment, however, in Experiment IV, the seeds were removed from their integument. After disinfection seeds were inoculated and test tubes with 10 ml of MS medium. In the multiplication phase, for the first subculture, seedlings of *T. argentea* obtained in the previous step experiment IV were segmented and their nodal segments were inoculated in MS medium plus 0.03 mg L⁻¹ and BAP at concentrations of 0.1, 0.15, 0.2 , 0.4 and 0.6 mg L⁻¹. For 1 and 2 subcultures , shoots

originating from the initial subculture and 1, respectively, growing axillary buds were inoculated into test tubes containing 10 ml of the basic culture medium added 0.15 mg L⁻¹ BAP and 0.03 mg L⁻¹ NAA. For rooting, the plantlets subculture of 2 longer than 2 cm were inoculated in studies containing 10 ml of MS medium supplemented with 0, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ IBA. Generally, the storage time and the pre-germination treatment did not affect the germination of *T. fagifolia*. *T. argentea* storage for two months and immersion in water for 24 hours resulted in the highest germination percentages. For in vitro disinfection with sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate were not effective to promote decontaminating seeds, however, the removal of the seed coat and soaking the seeds for 25 minutes in a solution of sodium hypochlorite at 2.5% proved to promote efficient disinfection and germination in vitro of *T. argentea*. In the multiplication phase the addition of 0.15 mg L⁻¹ BAP favored the emergence of shoots in nodal segments of *T. argentea* while the addition of 4.0 mg L⁻¹ BAP to the culture medium favored rooting for this species.

Keywords: Forest seeds, tissue culture, seed stored.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Valores médios para biometria das plântulas de *Terminalia. fagifolia* e *T. argentea*27

Tabela 2: Percentual de germinação de *Terminalia argentea* em função dos tempos de armazenamento e tratamentos de superação de dormência (Controle; Lixa –Escarificação em esmeril; H₂SO₄–escarificação em ácido sulfúrico; A.F – imersão em água fervente; E.A –Embebição em água por 24 horas).31

CAPÍTULO II

Tabela 1: Percentual de explantes com emissão de brotações e número de brotações por explante de *Terminalia argentea*, em função das concentrações de benzilaminopurina (BAP), no cultivo inicial.....52

Tabela 2: Percentual de enraizamento, número de raízes adventícias, comprimento da maior raiz e percentual de plântulas sem clorose, para plântulas de *T. argentea* propagadas *in vitro*.54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frutos de <i>Terminalia fagifolia</i>	23
Figura 2: Frutos de <i>Terminalia argentea</i> em diferentes estágios de maturação (esquerda) e fruto maduro (direita).....	24
Figura 3: Semente de <i>Terminalia fagifolia</i>	24
Figura 4: Sementes de <i>Terminalia argentea</i>	25
Figura 5: Plântulas de <i>Terminalia fagifolia</i>	26
Figura 6: Plântulas de <i>Terminalia argentea</i>	27
Figura 7: Teor de água em função do tempo de armazenamento em sementes de <i>Terminalia fagifolia</i> e <i>T. argentea</i>	28
Figura 8: Curvas de germinação de <i>Terminalia fagifolia</i> em função dos tempos de armazenamento (0, 2, 4 e 6 meses) e dos tratamentos para superação da dormência (Controle; Lixa–Escarificação em esmeril; H ₂ SO ₄ –escarificação em ácido sulfúrico; A.F– imersão em água fervente; E.A - Embebição em água por 24 horas)	29
Figura 9: Curvas de germinação de <i>Terminalia argentea</i> em função dos tempos de armazenamento (0, 2, 4 e 6 meses) e dos tratamentos para superação da dormência(Controle; Lixa–Escarificação mecânica; H ₂ SO ₄ –escarificação em ácido sulfúrico; A.F– imersão em água fervente; E.A–Embebição em água por 24 horas).....	32
Figura 10: Presença de fungos na germinação de <i>T. argentea</i> (A) e <i>T. fagifolia</i> (B).....	33

CAPÍTULO II

Figura 1: Percentual de contaminação de sementes de <i>Terminalia fagifolia</i> em função dos tempos de imersão em hipoclorito de sódio, durante 14 dias.....	45
Figura 2: Percentual de contaminação de sementes de <i>Terminalia fagifolia</i> em função dos tempos de imersão em digluconato de clorexidina, durante 12 dias.	46
Figura 3: Contaminação por fungos em sementes de orelha-de-cachorro (<i>Terminalia fagifolia</i>) inoculadas em meio de cultura.....	46
Figura 4: Percentual de contaminação de sementes de <i>Terminalia argentea</i> inoculadas com tegumento, em função dos tempos de imersão em hipoclorito de sódio, durante 12 dias.....	47

Figura 5: Figura 5: Percentual de contaminação de sementes de <i>Terminalia argentea</i> inoculadas sem o tegumento, em função dos tempos de imersão em hipoclorito de sódio, durante 50 dias.....	47
Figura 6: Figura 6: Percentual de germinação de sementes de <i>Terminalia argentea</i> sem tegumento, em função dos tempo de desinfestação em hipoclorito de sódio, aos 60 dias.	50
Figura 7: Figura 7: Aspecto geral das plântulas de <i>Terminalia argentea</i> germinadas <i>in vitro</i>	51
Figura 8: Explantes de <i>Terminalia. argentea</i> do subcultivo 1 da fase de multiplicação, em meio de cultura acrescido de 0,15 mg L ⁻¹ de BAP.....	53
Figura 9: Brotações de <i>Terminalia argentea</i> alongadas e enraizadas no subcultivo 2 da fase de multiplicação	53
Figura 10: Aspecto geral das raízes e plantas de <i>T. argentea</i> obtidas na fase de enraizamento <i>in vitro</i>	55

INTRODUÇÃO GERAL

Com cerca de 56000 espécies vegetais, o Brasil é considerado o país com maior biodiversidade do mundo, contendo aproximadamente 19% das espécies existentes (GIULIETTI, 2005). Essa grande diversidade está contida em diferentes paisagens, que de acordo com características peculiares qualifica a natureza brasileira em cinco grandes biomas: Floresta amazônica, Pantanal, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado, além de 3,5 milhões de km² de costa marinha. A grande variedade de espécies no país pode ser explicada pela variedade existente dentro dos biomas (BRASIL, 2010).

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando 21% do território nacional, superado em área apenas pela Floresta Amazônica. É considerado a última fronteira agrícola do planeta (KLINK, 2005). Embora o cerrado contenha uma das mais ricas floras das savanas mundiais, é recente o reconhecimento de sua importância, assim as paisagens naturais desse bioma vêm dando lugar à urbanização, cultivos agrícolas e pastagens. Devido ao grande número de espécies, ainda é muito limitado o conhecimento sobre o potencial das espécies florestais, necessitando assim de mais estudos.

A orelha-de-cachorro (*Terminalia fagifolia* Mart & Zucc) e o capitão-do-campo (*Terminalia argentea* Mart & Zucc) são espécies brasileiras nativas dos cerrados do Planalto Central e do Pantanal Mato-grossense, da caatinga do Vale do São Francisco e do norte de Minas Gerais até Pernambuco. São espécies de grande importância para recuperação de áreas degradadas, além de usos artesanais e ornamentais (LORENZI, 2002).

O plantio de espécies nativas, seja com finalidade econômica ou conservacionista, requer conhecimento de suas características fisiológicas nas diversas etapas de seu biociclo. Dentre os principais aspectos necessários para a implantação e o manejo de florestas nativas, destaca-se o processo de germinação das sementes, que pode fornecer subsídio para a compreensão da regeneração natural e para a tecnologia de produção de mudas.

Embora ainda sejam incipientes os estudos sobre a propagação dessas espécies, sabe-se que a germinação é baixa e, portanto, trabalhos que abordem a fisiologia, a tecnologia de sementes e as técnicas de micropropagação podem contribuir para a produção de mudas de *T. fagifolia* e *T. argentea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. 2010. Cerrado e Pantanal. Disponível em:
<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=201&idConteudo=8447&idMenu=8981>>

Acessado em: 03/09/2011

GIULIETTI, A. M., Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, Vol. 1, Nº 1, p.52-61, 2005.

KLINK, C.A; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro, **Megadiversidade**, vol 1, n 01, p. 147-155, 2005.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil. 2ª Ed. São Paulo: Nova Odessa. 2002

Capítulo I:

Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas e germinação de *Terminalia fagifolia* e *Terminalia argentea*.

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram caracterizar morfológicamente frutos, sementes e plântulas de *Terminalia fagifolia* e *Terminalia argentea*, bem como avaliar o percentual de germinação das sementes em resposta ao armazenamento e a tratamentos de superação de dormência . Para a caracterização morfológica, foram amostrados 100 frutos e 100 sementes, dos quais foram avaliadas características como coloração, textura, comprimento, largura e estruturas morfológicas. A umidade foi determinada pelo método de estufa a $103\pm 2^{\circ}\text{C}$. A germinação foi realizada em câmara de germinação tipo BOD, utilizando caixas tipo Gerbox (15x15 cm) contendo areia esterilizada e água destilada, sob temperatura de 30°C e fotoperíodo de 16 horas. Foram testados os seguintes tratamentos para superação da dormência: Controle; escarificação em esmeril, escarificação com ácido sulfúrico P.A por 5 minutos; imersão em água fervente por 5 minutos; e embebição em água em temperatura ambiente por 24 horas. A umidade e a germinação foram realizados em sementes recém colhidas e com 2, 4 e 6 meses de armazenamento em câmara fria. Para *T. fagifolia*, o tempo de armazenamento e tratamento de superação de dormência não influenciaram significativamente na germinação. Para *T. argentea* verificou-se que o tratamento de embebição em água por 24 horas e o período de 2 meses de armazenamento em câmara fria possibilitaram maior germinação. A avaliação da germinação e umidade ao longo do tempo de armazenamento possibilitou classificar as sêmenes de *T. argentea* como intermediarias quanto à tolerância ao armazenamento e dessecação.

Palavras-chave: sementes florestais, armazenamento de sementes, dormência

ABSTRACT

The objectives of this study were to characterize morphologically fruits, seeds and seedlings of *Terminalia argentea* and *Terminalia fagifolia* , as well as evaluating the percentage of seed germination in response to storage and dormancy breaking treatments . For morphological studies, 100 and 100 fruit seeds , including features such as color, texture , length , width and morphological structures were evaluated were sampled . Moisture was determined by oven method at $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Germination was carried out in

a germination chamber BOD using type Gerbox boxes (15x15 cm) containing sterilized sand and distilled water with a temperature of 30 ° C and 16 h photoperiod . The following treatments to break dormancy were tested : control ; scarification on Emery , PA scarification with sulfuric acid for 5 minutes ; immersion in boiling water for 5 minutes; and soaking in water at room temperature for 24 hours. The moisture and germination was performed on freshly harvested and 2 , 4 and 6 months of storage in cold camera seeds. *T. fagifolia* , storage time and treatment of scarification did not influence significantly the *T. argentea* it was found that treatment by immersion in water for 24 hours and 2 months in cold storage enabled camera higher germination . Keywords : tree seeds , seed storage , dormancy

1. INTRODUÇÃO

A orelha-de-cachorro (*Terminalia fagifolia* Mart & Zucc) é uma árvore brasileira da família Combretaceae, nativa dos cerrados do Planalto Central e do Pantanal Mato-grossense, e da caatinga do Vale do São Francisco, do norte de Minas Gerais até Pernambuco. É uma espécie decidual, heliófita, seletiva xerófito, pioneira, ótima para plantios mistos visando à recuperação de áreas degradadas. Além do uso ornamental, a árvore possui usos artesanais, potencial madeireiro, medicinal, melífero e tanífero. O fruto é seco, indeiscente, monospermico e alado. Sua germinação é relativamente baixa, cerca de 20%, embora a viabilidade ocorra em aproximadamente 79% das sementes (ALMEIDA et al., 1998).

A *Terminalia argentea* Mart. & Zucc, conhecida vulgarmente como capitão-do-campo é uma árvore da família Combretaceae, ocorre nas regiões centro-oeste e sudeste, nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, sendo característica do cerrado e da sua transição para a floresta semidecidual (LORENZI, 2002). Assim como a orelha-de-cachorro, o capitão do campo é uma espécie decidual, heliófita, seletiva xerófito, pioneira, ótima para plantios mistos em áreas degradadas. A árvore apresenta características ornamentais e a madeira pode ser empregada na construção civil. O fruto é seco, indeiscente, monospermico e alado. A característica alada do fruto confere à espécie adaptação para a dispersão anemocórica (POTT & POTT, 1994).

O estudo da biometria e estruturas morfológicas de frutos e sementes é fundamental para a identificação das espécies, obtenção de informações sobre germinação, armazenamento, viabilidade e métodos de semeadura (MATHEUS & LOPES, 2007). A biometria também constitui um importante instrumento para detectar a variabilidade genética dentro de populações de uma mesma espécie, e as relações entre esta variabilidade e os fatores ambientais, como também em programas de melhoramento genético (GONÇALVES et al., 2013).

A preservação da qualidade fisiológica das sementes é fundamental para a manutenção dos bancos de germoplasma e no processo de repovoamento da vegetação em áreas degradadas, pois permite o uso de espécies vegetais em períodos diferentes ao de dispersão do fruto (KOHAMA et al., 2006). Tanto para a preservação quanto para a utilização racional da orelha-de-cachorro e do capitão-do-campo, a produção,

beneficiamento e manutenção de sementes com elevado potencial fisiológico assumem papel fundamental.

De acordo com ROBERTS(1973), as sementes podem ser classificadas em dois grupos distintos em relação ao comportamento durante o armazenamento. Sementes ortodoxas são aquelas que se mantêm viáveis após dessecação até um grau de umidade em torno de 5% e podem ser armazenadas sob baixas temperaturas por um longo período. Já as recalcitrantes são sensíveis à dessecação, assim não sobrevivem com baixos níveis de umidade, dificultando o seu armazenamento por longo prazo. Além destes grupos há um terceiro, no qual as sementes apresentam um comportamento de armazenamento intermediário ao ortodoxo e ao recalcitrante (ELLIS et al., 1990).

Segundo ALMEIDA et al.(2010), diversas técnicas são estudadas em busca de melhores condições de armazenamento visando manter a viabilidade das sementes. A principal técnica de conservação de sementes durante o armazenamento é a redução do seu metabolismo, seja através da redução do teor de água ou da diminuição da temperatura. No entanto, várias espécies tropicais, principalmente arbóreas nativas do Brasil, são intolerantes à dessecação aos níveis desejáveis para conservação em armazenamento, o que requer o desenvolvimento de tecnologias específicas para sua conservação, como exemplo a Criopreservação.

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram caracterizar morfológicamente frutos, sementes e plântulas de *T. fagifolia* e *T. argentea*, bem como avaliar o percentual de germinação das sementes em resposta ao armazenamento e a tratamentos de superação de dormência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos de *Terminalia argentea* e *T. fagifolia* foram coletados diretamente nas matrizes, no período de setembro e outubro de 2012, no município de Diamantina, Minas Gerais. Posteriormente, foram levados ao laboratório de Sementes III do Centro Integrado de Propagação de Espécies Florestais (CIPEF), do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), onde as sementes foram beneficiadas, colocadas em sacos plásticos, tambores de celulose e

armazenadas em câmara fria com temperatura de 6°C e 40% de umidade relativa, até o momento da instalação dos experimentos.

2.1. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas.

Para ambas as espécies, os frutos foram descritos considerando-se os seguintes parâmetros: tipo, coloração, dimensões, textura e consistência do pericarpo e presença de ala. Para as sementes, as características morfológicas observadas e descritas foram: coloração, textura e consistência do tegumento, forma e bordo das sementes, posição do hilo e da micrópila, rafe e o embrião. Foram avaliados 100 frutos e 100 sementes escolhidos aleatoriamente. Para a obtenção das dimensões utilizou-se um paquímetro digital.

Para a caracterização das plântulas, foram utilizadas plântulas normais obtidas na germinação (descrita no item 2.3). Foram avaliadas a coloração, textura e dimensões da plúmula, parte aérea, parte radicular, hipocótilo e diâmetro do coleto de 12 plântulas de *T. fagifolia* e 13 de *T. argentea*.

2.2. Grau de umidade

No Laboratório de Análises de Sementes do Departamento de Agronomia da UFVJM, foram pesadas 3 repetições com cinco gramas de sementes para cada espécie. Posteriormente, foram colocadas em estufa a 103±2°C por 17 horas (BRASIL, 1992). Os procedimentos foram realizados aos 0, 2, 4 e 6 meses após a coleta. O grau de umidade foi calculado através da expressão:

$$U = (P_i - P_f) / P_i$$

Onde:

U= Grau de umidade

P_i= Peso inicial

P_f= Peso final

2.3. Experimentos de Germinação

No Laboratório de Sementes I do CIPEF, foram instalados dois experimentos simultâneos, para ambas as espécies. Foram considerados os tempos de armazenamentos em câmara fria de 0, 2, 4 e 6 meses após a coleta das sementes.

A germinação foi realizada em câmara de germinação tipo BOD (modelo NI 1718, fabricada pela marca NOVA INSTRUMENTS), utilizando caixas tipo Gerbox (15x15x3 cm) contendo areia esterilizada por 2 horas a 200° C e água destilada, sob temperatura de 30°C e fotoperíodo de 16 horas.

Foram testados os seguintes tratamentos para superação da dormência: sem tratamento prévio (Controle)); escarificação em esmeril (Lixa), escarificação com ácido sulfúrico P.A. por 5 minutos (H₂SO₄); imersão em água fervente por 5 minutos (A.F.); e embebição em água em temperatura ambiente por 24 horas (E.A.). Posteriormente as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 5% por 15 minutos e lavadas com água destilada.

Tanto para orelha-de-cachorro quanto para o capitão-do-campo, utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC) em esquema fatorial 4 x 5 (quatro períodos de armazenamento e cinco tratamentos para superação da dormência), com quatro repetições de 25 sementes. As avaliações da germinação foram realizadas a cada três dias por um período de 60 dias para cada tempo de armazenamento. Foram consideradas germinadas as sementes que emitiram radícula. Os dados obtidos foram submetidos a Análise de Variância e, quando observadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Utilizou-se também de estatísticas descritivas. As análises estatísticas foram realizadas nos softwares SISVAR (FERREIRA, 1998) e STATISTICA 10.0 (STATSOFT, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas

3.1.1. Caracterização morfológica de frutos

Os frutos de *T. fagifolia* são secos, indeiscentes, monosperímicos e com alas estriadas nas laterais, com forma transverso-oblonga, ápice emarginado e base reta ou pouco emarginada, bordo irregular, levemente ondulado, coloração de ocre a tabaco, opaca com manchas ferrugíneas, textura rugosa, superfície ondulada (depressões) no fruto e nas alas. O pericarpo é bem distinto: epicarpo fino, expandido lateralmente formando as alas; mesocarpo é constituído de uma camada fibrosa (sentido transversal), corticosa, expandida nas laterais do fruto, no local de inserção das alas; endocarpo é espesso com superfície irregular em formas de pequenas crateras. Na base do fruto há uma cicatriz circular, deixada quando o pedúnculo é removido. O pedúnculo é longo, fino e lenhoso.

A característica alada do fruto confere à espécie, adaptação para a dispersão anemocórica (Figura 1).

Os valores de comprimento médio encontrados foram de 14,17 mm (variando de 12,4 a 16,1mm); largura média de 19,8mm (11,2 a 23,4 mm).



Figura 1: Frutos de *Terminalia fagifolia*. Fonte: o autor

Os frutos de *T. argentea* são caracterizados como drupa; seca, indeiscente, monospermica e alada (Figura 2); com forma transverso-oblonga, ápice emarginado e base reta ou pouco emarginada, bordo irregular, levemente ondulado, coloração de ocre a tabaco, opaca com manchas ferrugíneas, textura rugosa, superfície levemente ondulada (depressões) no fruto e nas alas. O pericarpo é bem distinto: epicarpo fino, expandido lateralmente, formando as alas; após a sua remoção, é perceptível a presença de quatro feixes vasculares principais, no sentido longitudinal e os secundários formando um reticulado; mesocarpo é constituído de uma camada fibrosa (sentido transversal), corticosa, expandida nas laterais do fruto, no local de inserção das alas; endocarpo é espesso, lenhoso, de coloração cromo suave, quando rompido (seção transversal) tem superfície irregular em formas de pequenas crateras. Na base do fruto há uma cicatriz circular, deixada quando o pedúnculo é removido. O pedúnculo é longo, fino e lenhoso. A característica alada do fruto confere à espécie adaptação para a dispersão anemocórica. Os valores de comprimento médio encontrados foram de 16,35 mm (variando de 13,7 a 22,1mm); largura média de 42,7mm (31,7 a 53,2).



Figura 2: Frutos de *Terminalia argentea* em diferentes estágios de maturação (esquerda) e fruto maduro (direita). Fonte: o autor

3.1.2. Caracterização morfológica das sementes

As sementes de *T. fagifolia* tem formato fusiforme, ápice e base estreitados, textura rugosa, tegumento de coloração amarelo-dourada nas bordas e amarronzada no centro, hilo circular, pequeno, homocromo, localizado na base da semente. Bordas onduladas e expressivas, resultante da protuberância das alas (Figura 3). Os valores médio de comprimento e largura foram de 7,23 mm ($\pm 1,04$) e 4,74 mm ($\pm 0,6$) respectivamente.

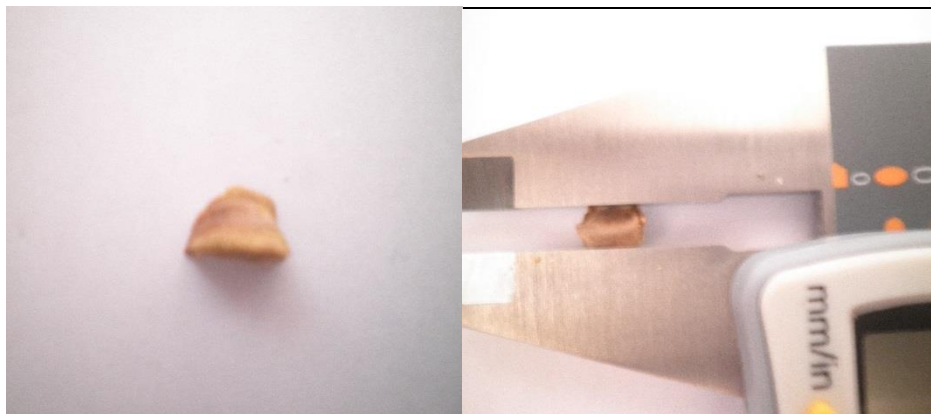


Figura 3: Semente de *Terminalia fagifolia*. Fonte: o autor

As sementes de *T. argentea* tem formato fusiforme, ápice e base estreitados, textura rugosa, tegumento de coloração amarelo-dourada, hilo circular, pequeno, homocromo, localizado na base da semente. Micrópila inconspícua, rafe de cor marrom-clara ou marrom-escura que vai do hilo até a calaza. Embrião axial, com cotilédones

amarelo-claros, enrolados; apresentando pólo radicular bem visível. O eixo embrionário é curto reto, cilíndrico, com plúmula rudimentar (Figura 4). Os valores médio de comprimento e largura foram de 13,66mm ($\pm 1,57$) e 9,87mm ($\pm 0,94$), respectivamente, ambos superiores encontrados pelo referido autor.



Figura 4: Sementes de *Terminalia argentea*. Fonte: o autor

3.1.3. Caracterização morfológica das plântulas

As plântulas de orelha-de-cachorro apresentam raiz primária longa, fina, cilíndrica, de consistência tenra, de coloração marrom na base e esbranquiçada no ápice; raízes secundárias longas, finas, cilíndricas, coloração amarronzadas; raízes terciárias curtas, finas, cilíndricas, tenras, da mesma coloração das raízes secundárias. Coleto em forma de joelho. Hipocótilo e cotilédones cilíndricos de coloração variando do verde ao marrom. Epicótilo longo, fino, cilíndrico, de consistência herbácea e de coloração verde-clara, simples, longos, brancos, adpressos no epicótilo. Protófilo simples, discolor (roxo na face dorsal e verde escuro na parte ventral) (Figura 5). As dimensões médias do comprimento da parte aérea, parte radicular, hipocótilo e diâmetro do coletor estão descritos na Tabela 1.



Figura 5: Plântulas de *Terminalia fagifolia*. Fonte: o autor

As plântulas de capitão-do-campo apresentam raiz primária longa, fina, cilíndrica, de consistência tenra, de coloração marrom na base e esbranquiçada no ápice; raízes secundárias longas, finas cilíndricas, coloração branca, tenra; raízes terciárias curtas, finas, cilíndricas, tenras, da mesma coloração das raízes secundárias. Verifica-se a presença de pêlos simples, translúcidos, em forma de agulha, ao longo da raiz primária e raízes secundárias; à medida que a raiz se desenvolve, ocorrem descamações na epiderme, no sentido longitudinal. Coleto em forma de joelho. Hipocótilo e cotilédones semelhantes aos descritos no processo de germinação. Epicótilo longo, fino, cilíndrico, de consistência herbácea e de coloração verde-clara, densamente piloso, simples, longos, brancos, adpressos no epicótilo. Protófilo simples, discolor (verde-claro na face dorsal e verde escuro na face ventral) ou ainda verde-avermelhado, forma elíptica, ápice agudo, base acunhada e bordo inteiro, nervação peninérvea bem evidente, sendo as nervuras impressas na face dorsal e imersas na ventral; de consistência membranácea, com densa pilosidade em ambas as faces, sendo mais acentuado nas margens conferindo-lhe textura macia; pecíolo curto, cilíndrico e densamente piloso. Plúmula em desenvolvimento, podendo-se visualizar a gema que originará a nova folha, densamente pilosa, antes da completa expansão do protófilo (Figura 6). As dimensões médias do comprimento da parte aérea, parte radicular, hipocótilo e diâmetro do coleto estão descritos na Tabela 1.



Figura 6: Plântulas de *Terminalia argentea*. Fonte: o autor

Tabela 1: Valores médios e desvio padrão dos dados de biometria das plântulas de *Terminalia fagifolia* e *T. argentea*

Dimensões (mm)	<i>T. fagifolia</i>	<i>T. argentea</i>
Plúmula	10,75 ± 4,23	13,88 ± 5,3
Hipocótilo	14,37 ± 4,34	10,23 ± 2,83
Diâmetro do Coleto	0,93 ± 0,29	1,75 ± 0,42
Parte aérea	25,13 ± 7,43	21,52 ± 6,21
Parte radicular	34,89 ± 16,16	35,66 ± 11,44

3.2. Grau de umidade

O teor de água das sementes de *T. fagifolia* e *T. argentea* sofreram reduções ao longo do período de armazenamento. Para *T. fagifolia* o teor de água reduziu de 9,88% para 8,88% e para *T. argentea* a umidade reduziu de 29,42% para 22,45%, após 6 meses de armazenamento (Figura 7). Observa-se que a redução do teor de água para *T. argentea* foi mais acentuada, sendo este de 24% em relação à avaliação realizada logo após a coleta das sementes. Já para *T. fagifolia* esse decréscimo foi de 10%. No entanto, mesmo considerando a maior redução para *T. argentea*, as sementes desta espécie ainda apresentaram maior teor de água aos 6 meses em relação a *T. fagifolia*.

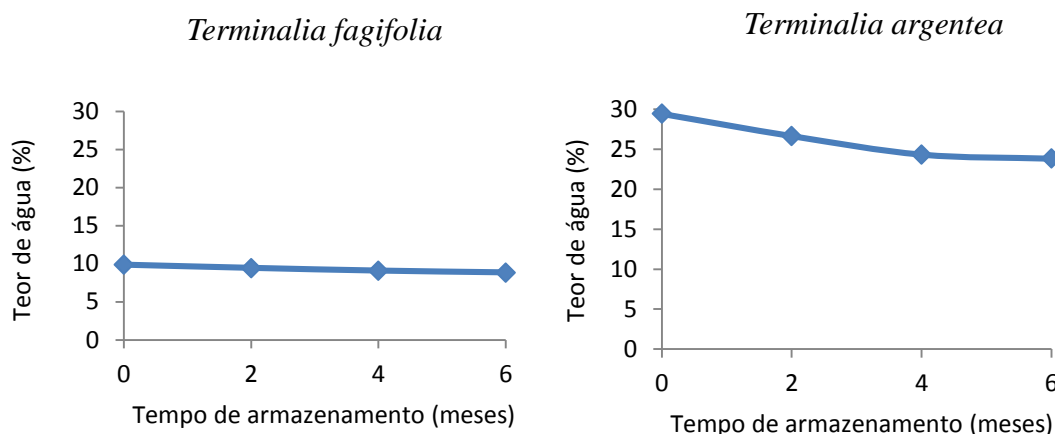


Figura 7: Teor de água em função do tempo de armazenamento em sementes de *Terminalia fagifolia* e *T. argentea*.

Para ambas as espécies, as curvas de umidade em função do tempo reduziram a inclinação. Isso ocorre pelo fato das sementes tenderem a atingir o equilíbrio higroscópico, ponto em que a umidade da semente entra em equilíbrio com a do ambiente. As condições de umidade relativa e de temperatura durante o armazenamento, onde as sementes alcançarão o equilíbrio higroscópico específico, determinarão a manutenção de sua qualidade fisiológica (BORGES et al., 2009). Segundo esses mesmos autores, sementes de Angico Vermelho (*Anadenanthera peregrina*) podem levar até 80 dias para atingir o equilíbrio higroscópico.

Em trabalhos similares, após um mês de armazenamento, sementes de pau-santo (*Kielmeyera coriacea*) haviam atingido o equilíbrio higroscópico. Quando colocadas no ambiente de laboratório (17,5°C e 78% UR) as sementes atingiram o equilíbrio higroscópico em torno de 8 a 10%. Entretanto, quando colocadas em câmara fria (4°C e 96% UR) o equilíbrio foi mantido em torno de 13 a 15% (BOTELHO et al. 1992).

3.3.Experimentos de Germinação

Observou-se, de acordo com a ANOVA, que não houve efeito significativo ($p > 0,05$) com relação ao percentual de germinação de *T. fagifolia* em função da interação tempo de armazenamento x tratamento para superação da dormência, bem como para os fatores isoladamente. Embora não se observou diferença significativa entre os tratamentos, é possível perceber através das curvas de germinação, que a escarificação química com Ácido Sulfúrico aos 4 meses de armazenamento proporcionou maior taxa

de germinação (12%). No entanto, esse mesmo tratamento não proporcionou germinação quando o tempo de armazenamento das sementes foi de 2 meses (Figura 8).

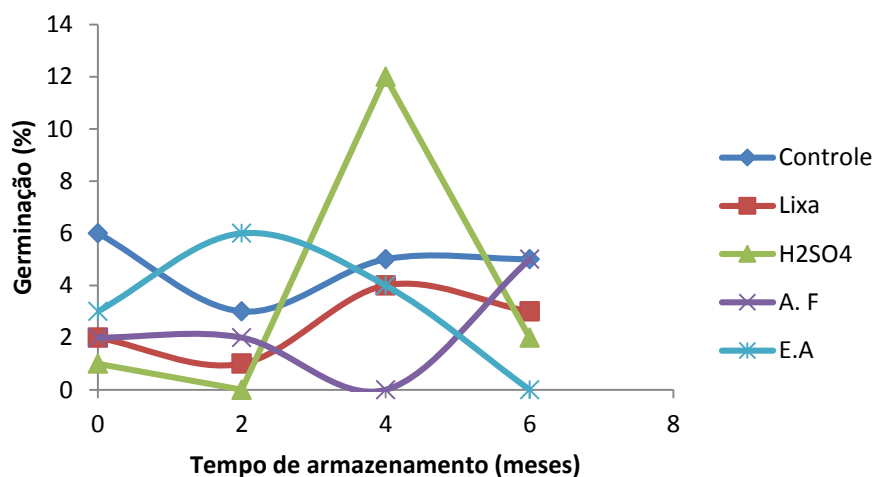


Figura 8: Curvas de germinação de *Terminalia fagifolia* em função dos tempos de armazenamento (0, 2, 4 e 6 meses) e dos tratamentos para superação da dormência (Controle; Lixa–Escarificação em esmeril; H2SO4–escarificação em ácido sulfúrico; A.F– imersão em água fervente; E.A - Embebição em água por 24 horas).

Na literatura, são escassos os trabalhos referentes à germinação de *T. fagifolia*. NETTO & FAIAD (1995) verificaram ausência de germinação em sementes recém colhidas, embora a viabilidade ocorresse em 79% das sementes, detectada pelo teste de tetrázólio. Para *Terminalia catappa*, a germinação pode ser influenciada pela presença do pericarpo do fruto, que quando retirado possibilitou uma germinação de 69%, valor muito superior aos 9% obtidos em tratamentos com frutos inteiro (IVANI et al., 2008).

Embora as taxas de germinação sejam consideradas baixas quando comparadas a outras espécies florestais, o fato do período de armazenamento não influenciar significativamente sobre a germinação e valores de umidade entre 11 e 8% permitem classificar as sementes de *T. fagifolia* como ortodoxas.

Diversos trabalhos abordando tolerância de sementes ortodoxas à dessecação e armazenamento são descritos na literatura. Sementes de *Pinus elliotti*, com umidade entre 7 e 8%, obtiveram resultados satisfatórios de germinação após 40 dias de armazenamento. No entanto, após 80 dias ocorreu decréscimo na germinação (FONSECA et al., 2012).

SILVA (2008) verificou que sementes de Mulungu (*Erythrina velutina*) permanecem viáveis com umidade próximo a 7%. Resultados similares foram encontrados por SILVA et al. (2013).

O baixo percentual de germinação pode estar relacionado a outros fatores, como a presença de algum tipo de dormência. Devido à baixa eficiência dos tratamentos pré-germinativos utilizados, é pouco provável que a dormência esteja relacionada à impermeabilidade do tegumento.

No entanto, fatores endógenos podem influenciar negativamente na germinação. Em casos de dormência fisiológica, tratamentos com giberelinas influenciam de modo positivo na germinação. A dormência endógena pode ainda estar ligada à imaturidade do embrião, denominada dormência morfológica, fazendo-se necessário a utilização de técnicas mais específicas para superação de dormência, como exemplo, a estratificação.

Para *T. argentea*, a interação tempo de armazenamento x tratamentos para superação da dormência, assim como o fator tempo de armazenamento isoladamente foram significativos de acordo com a ANOVA ($p < 0,05$), com relação ao percentual de germinação. Os valores de germinação variaram entre 1 e 28%, sendo estes resultados semelhantes aos encontrados por OLIVEIRA e FARIAS (2009), que verificou germinação de 22% em substrato a base de solo arenoso e 26% em substrato a base de solo argiloso para a mesma espécie. Quando semeadas em canteiro de sementes em casa de vegetação, FERREIRA et al. (1998) obtiveram germinação de 42% para a referida espécie.

Verificou-se, pelo desdobramento da interação entre os fatores tempo de armazenamento e tratamentos para superação da dormência, que a embebição em água por 24 horas em sementes armazenadas por 2 meses, foi superior aos demais tratamentos, sendo que o referido tempo de armazenamento também foi favorável para os tratamentos de escarificação com lixa e controle (Tabela 2). Para os demais tratamentos, o tempo de armazenamento não influenciou estatisticamente na germinação. Através das curvas de germinação é possível analisar o comportamento da germinação em função do tempo de armazenamento (Figura 9).

Tabela 2: Percentual de germinação de *Terminalia argentea* em função dos tempos de armazenamento e tratamentos de superação de dormência (Controle; Lixa –Escarificação em esmeril; H₂SO₄–escarificação em ácido sulfúrico; A.F – imersão em água fervente; E.A –Embebição em água por 24 horas)

Tratamentos de superação de dormência	Armazenamento (meses)			
	0	2	4	6
Controle	2 a	20 abc	13 a	6 a
Lixa	8 a	22 ab	4 a	8 a
H ₂ SO ₄	11 a	9 bc	7 a	12 a
A.F.	8 a	5 c	6 a	6 a
E.A.	1 a	28 a	14 a	3 a

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste deTukey, a 5% de significância.

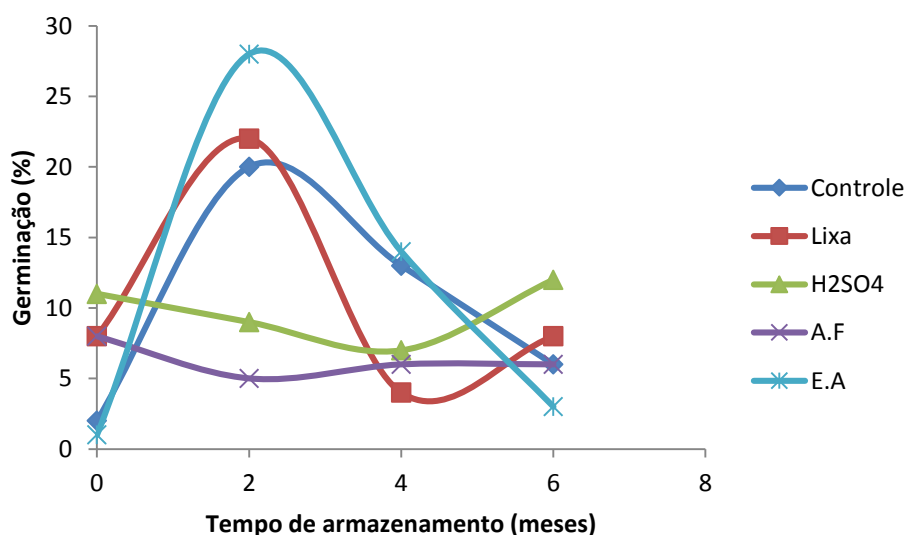


Figura 9: Curvas de germinação de *Terminalia argentea* em função dos tempos de armazenamento (0, 2, 4 e 6 meses) e dos tratamentos para superação da dormência(Controle; Lixa–Escarificação mecânica; H₂SO₄–escarificação em ácido sulfúrico; A.F– imersão em água fervente; E.A–Embebição em água por 24 horas).

Diante dos resultados, é possível verificar que as sementes de capitão-do-campo tendem comportamento intermediário quanto a tolerância à dessecação e ao armazenamento. Os valores de umidade permaneceram acima de 22%, característica de sementes recalcitrantes. A manutenção da viabilidade por períodos de tempo superior a 60 dias, caracteriza a espécie como intermediária., No entanto, a classificação precisa só pode ser verificada através da utilização de metodologias específicas.

Espécies do mesmo gênero podem obter classificação diferentes quanto ao comportamento na dessecação. No gênero *Podocarpus*, sementes de *P. lambertii* toleram dessecação a níveis de 5,7% de água, sendo caracterizadas como ortodoxas. No entanto, sementes de *P. sellowii* tiveram redução significativa na viabilidade quando dessecadas 26,8% de umidade, sendo caracterizadas como intermediárias (GARCIA & NOGUEIRA, 2008).

Em casos mais específicos, as sementes intermediárias podem tolerar altos níveis de dessecação por um curto período de tempo. GOMES et al.(2013) verificaram que sementes de *Acca sellowiana* tem maior taxa de germinação, 83%, quando tem seu teor de água reduzido a 5% em estufa por 19 horas logo após o beneficiamento. No entanto, quando são dessecadas e armazenadas por 90 dias, a germinação reduz para 38%.

A perda do vigor das sementes durante o período de armazenamento pode estar ligada a outros fatores, incluindo a presença de microrganismos, principalmente fungos. A ocorrência de fungos nas sementes pode acarretar o aparecimento de várias doenças. Sendo assim, o entendimento da associação fungos-sementes é de extrema importância, tendo em vista que a semente é o propágulo vegetal de maior viabilidade no tempo (BEZERA, 2012).

Diversos gêneros de fungos são encontrados em sementes de várias espécies florestais no Brasil, entre eles: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Lasiodiplodia*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Cylindrocladium*, *Diplodia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Drechslera*, *Macrophomina*, *Monocillium*, *Nigrospora*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Pithomyces*, *Peyronellacea*, *Rhizoctonia* e *Trichoderma* (CARNEIRO, 1986; LASCA et al., 1971; MUCCI & LASCA, 1986).

Durante a germinação, foi detectada a presença e proliferação de fungos (Figura 10), que embora não identificados, podem ter causado prejuízos à germinação.



Figura 10: Presença de fungos na germinação de *T. argentea* (A) e *T. fagifolia* (B).

Fungos dos gêneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Helmithosporium*, *Nigrospora*, *Pestalotia*, *Phomae*, *Phomopsis* foram encontrados em sementes de *T. fagifolia* incubadas por 8 dias a 25°C em substrato de papel filtro umedecido (NETTO E FAIAD, 1995). Para *T. argentea* não foram encontrados trabalhos relacionados a sanidade de suas sementes.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e as condições experimentais adotadas, conclui-se que:

- Tratamentos pré-germinativos e armazenamento em câmara fria até 6 meses não influenciaram a germinação de *Terminalia fagifolia*.
- O armazenamento pelo período de 60 dias em câmara fria e a embebição em água em temperatura ambiente por 24 horas foi o melhor tratamento para promover a germinação de *Terminalia argentea*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. DE A. C.; JERÔNIMO, E. S.; ALVES, N. M. C.; GOMES, J. P.; SILVA, A. S. Estudo de técnicas pra o armazenamento de cinco oleaginosas em condições ambientais e criogênicas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, p.189-202, 2010.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: Espécies úteis. Planaltina: EMBRAPA- CPAC, p. 381-384, 1998.

BORGES, S.; BORGES, E. E. L.; CORREA, C.; BRUNE, A. Equilíbrio higroscópico e viabilidade de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina* (L.) Speng) em diferentes condições ambientais de armazenamento. **Scientia Florestalis**, v. 37, n. 84, p. 475-481, 2009.

BOTELHO, S.A.; CARNEIRO, J. G. A. Influência da umidade, embalagens e ambiente sobre a viabilidade e vigor de sementes de Pau-Santo (*Kielmeyera coriacia* MART.). **Revista Brasileira de Sementes**, Vol. 14, n 1, p 41-46, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análises de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 1992.

CARNEIRO, J.S. Micoflora associada a sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, vol 11, n 3, 557-556- 1986.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p 1167-1174, 1990.

FERREIRA, D. F. **Sisvar** - sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 19 p, 1998.

FERREIRA, R. A., BOTELHO, S. A., MALAVASI, M. M. & DAVIDE, A. C. Caracterização morfológica de fruto, semente, plântula e muda de capitão-do-campo

(*Terminalia argentea* Mart.&Zucc. - Combretaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, 20(2): 202-209, 1998.

FONSECA, A. G.; MATUDA, J.J.; ALMEIDA, J. O.; NUNES, U. R.; MACHADO, E. L. M. Qualidade fisiológica de sementes de *Pinus elliotti* Engelm. submetidas a diferentes métodos de armazenamento. **Cerne**, v. 18, n. 3, p. 457-463, 2012.

GARCIA, L.C.; NOGUEIRA, A. C. Resposta de sementes de *Podocarpus lambertii* e *Podocarpus sellowii* – (Podocarpaceae) a dessecação. **Ciência Florestal**, Vol. 18, No. 3, pp. 347-352, 2008.

GOMES, J. P.; OLIVEIRA, L. M.; SALDANHA, MANFREDI, S.; FERREIRA, P.I. Secagem e Classificação de Sementes de *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret – Myrtaceae quanto à Tolerância à Dessecação e ao Armazenamento. *Floresta e Ambiente*, vol 20 n 2):207-215, 2013.

GONÇALVEL, L.G.V.; ANDRADE, F.R; JUNIOR, B.H.M.; SHOSSLER, T.R.; LENZA, E; MARIMOM, B.P. Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, vol.36. n 1. P 31-40. 2013

IVANI, S. A., SILVA E SILVA, B. M., OLIVEIRA, C. & MÔRO, F. V. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de castanheira (*Terminalia catappa* L. - Combretaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 30 n 2 p 517-522, 2008.

KOHAMA, S.; MALUF, A.M.; BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.1, p.72-78, 2006.

LASCA, C. C., SAMPAIO, A. S., CINTRA, A. F. Condições fitossanitárias de sementes importadas de *Pinus* spp. **O Biológico**, v.37, n.11, p.287-92, 1971

LEONEL, S.; GONÇALVES B. H. L.; TECCHIO M. A.; FERRAZ R. A.; SOUZA J. M. A. Germinação de sementes de porta-enxerto de pessegueiro com o uso de biorregulador. **Scientia Plena**. Vol 9, n 5, p. 1-6, 2013.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas

arbóreas do Brasil. 2ª Ed. São Paulo: Nova Odessa. 2002.

MATHEUS, M.T.; LOPES, J.C. Morfologia de frutos, sementes e plântulas e germinação de sementes de *Erythrina variegata* L. **Revista Brasileira de Sementes**, vol.29. n 3. P 8-15. 2007.

MUCCI, F. E. S.; LASCA, C. C. Flora fúngica de sementes de essências florestais nativas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 352, 1986.

NETTO, D.A.M.; FAIAD, M.G.D. Viabilidade e sanidade de sementes de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 17, n 1, p 75-80, 1995.

OLIVEIRA, A. K. M.; FARIAS, G. C. Efeito de diferentes substratos na germinação de sementes de *Terminalia argentea* (Combretaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 3, p. 320-323, 2009.

POTT, A. & POTT, V. J. 1994. Plantas do pantanal. Brasília: EMBRAPA/CPAP/SPI. 320 p. 1994.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 12, p. 499-514, 1973.

SILVA, K.B. Tecnologia de sementes de *Erythrina velutina* Willd. 2008. 138f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2008.

SILVA, L. W.; COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S; SILVA, R. C. P.; CÂNDIDO, W. S.; SILVA, A. C. Armazenamento e métodos para a superação da dormência de sementes de mulungu. **Ciências Agrárias**. vol. 34, n. 1, p. 171-178, 2013.

SOUZA, O.A.; NASCIMENTO, J. L.; NOVAES, R. V. BORGES, J. D.; Propagação sexuada de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) efeito da procedência do fruto e ácido giberélico na emergência de plântulas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, vol 33, n 3, p 131-136, 2007.

STATSOFT, Inc. (2010). STATISTICA (data analysis software system), version 10.

Capítulo II:

Micropropagação de *Terminalia fagifolia* e *Terminalia argentea*

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia de micropropagação de *Terminalia fagifolia* e *Terminalia argentea* a partir de plantas germinadas *in vitro*. Para a desinfestação, foram instalados quatro experimentos. No primeiro, as sementes de *T. fagifolia* foram lavadas, escarificadas em ácido sulfúrico por 5 minutos e posteriormente imersas em solução de álcool 70% por 30 segundos e, logo após, em solução de hipoclorito de sódio a 5%, sendo adicionado 4 a 5 gotas de Tween 20 para cada 100 ml de solução. Foram utilizados os tempos de imersão de 5, 10, 15, 20 e 25 minutos em hipoclorito de sódio a 5%, os quais constituíram cinco tratamentos. No experimento II, os procedimentos foram semelhantes aos descritos no experimento I, diferindo com relação aos tratamentos utilizados. Foram testados os tempos de imersão de 5, 10, 15, 20 e 25 minutos em solução de Digluconato de Clorexidina a 5 mg L⁻¹. Nos experimentos III e IV, para *T. argentea*, os procedimentos foram semelhantes ao experimento I, no entanto, no experimento IV, as sementes tiveram seu tegumento retirado e a concentração de Hipoclorito de Sódio utilizada foi de 2,5%. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas e tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultura MS. Na fase de multiplicação, para o cultivo inicial, plântulas de *T. argentea* obtidas no experimento IV da etapa anterior foram segmentadas e seus segmentos nodais foram inoculadas em Meio de cultivo MS acrescidos de 0,03 mg L⁻¹ de ANA e BAP nas concentrações de 0,1; 0,15; 0,2; 0,4 e 0,6 mg L⁻¹. Para os subcultivos 1 e 2, gemas axilares oriundas das brotações do cultivo inicial e subcultivo 1, respectivamente, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura básico adicionado de 0,15 mg L⁻¹ de BAP e 0,03 mg L⁻¹ de ANA. Na fase de enraizamento, os explantes do subcultivo 2 com comprimento superior a 2 cm, foram inoculados em tubos contendo 10 ml do meio MS acrescido de 0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de AIB. Verificou-se contaminação integral nos experimentos I, II e III da fase de desinfestação. Para o experimento IV, o tempo de imersão por 25 minutos favoreceu a desinfestação e conseqüentemente maior taxa de germinação de *T. argentea*. Na fase de multiplicação, a concentração de 0,15 mg L⁻¹ de BAP favoreceu a multiplicação. Na fase de enraizamento, a concentração de 4,0 mg L⁻¹ de AIB possibilitou maior percentual de enraizamento. Recomenda-se a retirada do tegumento das sementes de *T. argentea* e a imersão em solução de hipoclorito de sódio

a 2,5% por 25 minutos para promover a desinfestação e germinação. Na fase de multiplicação é indicada a concentração de 0,15 mgL⁻¹ de BAP. Para o enraizamento de *T. argentea* recomenda-se a adição de 4,0 mgL⁻¹ de BAP no meio de cultura.

Palavras Chave: desinfestação, cultura de tecidos, germinação in vitro

ABSTRACT

The objective of this study aimed to develop a methodology for micropropagation of *Terminalia fagifolia* and *Terminalia argentea* from in vitro germinated seedlings. For decontamination, four experiments were installed. At first, the seeds of *T. fagifolia* were washed, scarified in sulfuric acid for 5 minutes and then immersed in 70% alcohol for 30 seconds and soon after, in a solution of sodium hypochlorite 5%, with the added 45 drops of Tween 20 per 100 ml of solution. Immersion times of 5, 10, 15, 20 and 25 minutes with sodium hypochlorite at 5%, which constitute five treatments were used. In experiment II, the procedures were similar to those described in experiment I, differing with respect to treatments. Immersion times of 5, 10, 15, 20 and 25 minutes in a solution of chlorhexidine gluconate to 5 mgL⁻¹ were tested. In the experiments III and IV for *T. argentea* The procedures were similar to the experiment, however, the experiment IV, the seeds were removed from their seed coat and the concentration of sodium hypochlorite used was 2.5%. After disinfection, the seeds were inoculated and test tubes with 10 ml of MS medium. In vitro multiplication for initial cultivation of *T. argentea* seedlings obtained in the previous step experiment IV were segmented and their nodal segments were inoculated in MS medium plus 0.03 mg L⁻¹ NAA and BAP concentrations of 0.1; 0.15; 0.2, 0.4 and 0.6 mg L⁻¹. For 1 and 2 subcultures, shoots originating from the initial subculture and 1, respectively, growing axillary buds were inoculated into test tubes containing 10 ml of the basic culture medium added 0.15 mg L⁻¹ BAP and 0.03 mg L⁻¹ NAA. For rooting, the plantlets subculture of 2 longer than 2 cm, were inoculated into tubes containing 10 ml of MS medium supplemented with 0; 1.0; 2.0 and 4.0 mgL⁻¹ IBA. It was found in experiments integral contamination I, II and III of the disinfection phase. For experiment IV, the immersion time for 25 minutes favored the pest and consequently higher rate of germination of *T. argentea*. In the multiplication phase, the concentration of 0.15 mg L⁻¹ BAP favored the multiplication. In the rooting phase, the concentration of 4.0 mg L⁻¹ IBA enabled higher percentage of rooting. It is recommended the removal of the seed coat of *T. argentea* and immersion in sodium hypochlorite 2.5% for 25 minutes to promote disinfection and germination. In the multiplication phase concentration of 0.15 mgL⁻¹ of BAP is indicated. For root of *T. argentea* is recommended addition of 4.0 mgL⁻¹ of BAP in the culture medium.

Key words : disinfection, tissue culture, in vitro germination

1. INTRODUÇÃO

Terminalia argentea e *Terminalia fagifolia*, conhecidas popularmente como capitão-do-campo e orelha-de-cachorro, respectivamente, são duas espécies da família Combretaceae encontradas no cerrado, distribuídas pela Bahia, Ceará, Goiás, Distrito Federal, Piauí, São Paulo, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (SILVA JUNIOR & PEREIRA, 2009).

O capitão-do-campo apresenta excelente adaptação em solos pobres, conferindo assim adaptabilidade em programas de recuperação de áreas degradadas. Devido às características da madeira de alta densidade, possui excelente uso dos seus produtos madeireiros. Destaca-se também o uso de produtos não-madeireiros desta espécie florestal, como uso medicinal através do xarope da casca utilizado contra tosse; tanto a casca quanto a resina adstringentes podem ser utilizadas para resolver problemas de aftas e de resfriado e a cinza obtida de sua queima é útil para o curtimento do couro e para o preparo da soda para sabão. É uma espécie de beleza exuberante, sendo utilizadas em jardins urbanos (GOMES, 2013; FERREIRA et al., 1998; LORENZI, 2008).

A orelha-de-cachorro possui potencial para recuperação de áreas degradadas, uso melífero e ornamental. Seus frutos são utilizados no artesanato e a madeira pode ser empregada na construção civil. Na medicina popular, a casca do caule é usada no combate a aftas e tumores (ALMEIDA et al., 1998). Além dos referidos usos, estudos realizados com *T. fagifolia* demonstraram que o extrato etanólico das cascas apresenta atividades citotóxica e antioxidante bem como a ocorrência de flavonoides (flavanonas, chalconas e flavanas), 1,3-diarilpropanos, triterpenos pentacíclicos glicosilados e não-glicosilados e um esteroide, o sitosterol 5. O extrato etanólico das folhas apresenta grande potencial antioxidante (GARCEZ et al., 2008; SOUZA, 2007).

No entanto, para desenvolver a produção destas espécies, é necessário o entendimento de diversos processos biológicos, sobretudo a propagação e produção de mudas das mesmas. São escassos os trabalhos referentes a propagação de *T. argentea* e *T. fagifolia*. NETTO & FAIAD (1995), verificaram ausência de germinação de *T. fagifolia*. Para *T. argentea* FERREIRA et al. (1998) constataram 42% de germinação, enquanto OLIVEIRA & FARIAS (2009) obtiveram germinação máxima de 26% para referida espécie. Tendo em vista a baixa germinação dessas espécies, outras técnicas de

propagação, como a micropropagação, podem ser uma alternativa para a produção de mudas.

A micropropagação, termo sugerido por HARTMAN et al. (1990), compreende o cultivo asséptico de partes da planta em condições controladas de nutrição, luminosidade, fotoperíodo e temperatura. Como forma de propagação vegetativa, baseada em técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, a micropropagação torna-se uma alternativa para a regeneração de plantas que apresentam dificuldades de reprodução natural, e também onde os métodos convencionais de propagação vegetativa não se tornam viáveis (MANTOVANI et al., 1999).

A micropropagação é recomendada quando outras técnicas de propagação, vegetativa não apresentam resultados satisfatórios para determinadas espécies; quando indivíduos selecionados não podem ser rejuvenescidos por meio da promoção de brotações basais; quando se deseja aumentar a taxa de propagação e abreviar o tempo para o uso; efetuar limpeza clonal; obtenção de porta enxertos juvenis e em situações de indisponibilidade de sementes (NASCIMENTO & SANTOS, 2013; CAMPOS, 2013).

As etapas da micropropagação seguem determinados procedimentos, no qual os explantes oriundos de material vegetal coletado no campo necessitam de limpeza e desinfestação prévia à inoculação no meio de cultura. Após o estabelecimento *in vitro*, os explantes são multiplicados, alongados, enraizados *in vitro* ou *ex vitro* e finalmente aclimatizados em ambiente *ex vitro* (DUTRA et al., 2009).

Fatores como os agentes desinfestantes, o meio de cultura, o tipo e a concentração de reguladores de crescimento são importantes fatores a serem observados nas etapas da micropropagação, sendo necessário o ajuste para cada espécie ou genótipo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia de micropropagação de *Terminalia fagifolia* e *Terminalia argentea* a partir de plantas germinadas *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As sementes das duas espécies foram coletadas no período de setembro e outubro de 2012, no município de Diamantina, Minas Gerais. Posteriormente, foram levadas ao

laboratório de Sementes III, do Centro Integrados de Propagação de Espécies Florestais (CIPEF), do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), onde foram beneficiadas e armazenadas em câmara fria a 6°C com 40% de umidade por 30 dias. Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento Florestal do Departamento de Engenharia Florestal da UFVJM. As condições da sala de cultura utilizada para incubação é de fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.1. Desinfestação e Germinação in vitro de *T. fagifolia* e *T. argentea*

Experimento I:

As sementes de *T. fagifolia* foram lavadas inicialmente com água destilada e transferidas para câmara de fluxo laminar, onde foram enxaguadas com água deionizada autoclavada. Foram então imersas em solução de ácido sulfúrico P.A. por 5 minutos, sendo novamente enxaguadas com água deionizada autoclavada.

Posteriormente, as sementes foram imersas em solução de álcool 70% por 30 segundos e, logo após, em solução de hipoclorito de sódio a 5%, sendo adicionado 4 a 5 gotas de Tween 20 para cada 100 ml de solução. Foram utilizados os tempos de imersão de 5, 10, 15, 20 e 25 minutos em hipoclorito de sódio a 5%, os quais constituíram cinco tratamentos.

Após os tratamentos de desinfestação, as sementes foram novamente enxaguadas com água deionizada autoclavada e inoculadas em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 ml de meio de cultura previamente preparado e autoclavado. Utilizou-se o meio de cultura contendo sais e vitaminas de MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol e 0,8 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), sem adição de reguladores de crescimento. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,01$ antes da inclusão do Agar Merck® (5 g L⁻¹). Posteriormente, os tubos foram fechados com tampas plásticas e autoclavados por 15 minutos sob temperatura de 121°C e pressão de 1 atm.

Após a inoculação das sementes, os tubos foram transferidos para sala de cultura.

Experimento II

No experimento II, os procedimentos foram semelhantes aos descritos no experimento I, diferindo com relação ao uso do Dicluonato de clorexidina como agente desinfestante. Foram testados os tempos de imersão de 5, 10, 15, 20 e 25 minutos em solução de Digluconato de Clorexidina a 5 mg L^{-1} para desinfestação.

Experimento III

Para as sementes de *T. argentea*, foram utilizados os mesmos procedimentos descritos no Experimento 1, no entanto, não foi executada a escarificação com ácido sulfúrico e utilizou-se solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, nos tempos de imersão de 5, 10, 15, 20 e 25 minutos.

Experimento IV

Utilizando sementes de *T. argentea*, foram seguidos os mesmos procedimentos descritos no experimento III, no entanto, com auxílio de um martelo, as sementes tiveram seu tegumento retirado. Após a ruptura do tegumento, esse foi retirado manualmente para evitar danos ao embrião.

Para todos os experimentos, foram avaliados os percentuais de contaminação das sementes, a cada 3 dias, durante 30 dias. Foram consideradas contaminadas as sementes apresentando estruturas fúngicas ou mudança da coloração do meio de cultura proveniente de exsudação bacteriana. Foram consideradas germinadas as sementes que emitiram radícula até os 60 dias após instalação dos experimentos. Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 4 repetições com 6 sementes cada, sendo uma semente por tubo.

Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância e Estatística descritiva, utilizando o software Statistica 10.0 (STATSOFT, 2010).

2.2. Multiplicação de *Terminalia argentea*

A fase de multiplicação foi constituída por três subcultivos (cultivo inicial, subcultivo 1 e subcultivo 2). O meio de cultura básico para esta fase foi composto por sais e vitaminas de MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), 30 g L^{-1} de sacarose, $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de mio-inositol e $0,8 \text{ g L}^{-1}$ de polivinilpirrolidona (PVP). Foram adicionados reguladores

de crescimento, variando o tipo e a concentração de acordo com os tratamentos. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,01$ antes da inclusão do ágar Merck® (5 g L^{-1}). Foram utilizados tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 ml de meio de cultura, sendo estes fechados com tampas plásticas e autoclavados por 15 minutos sob temperatura de 121°C e pressão de 1atm.

Para o cultivo inicial, foram utilizadas plântulas de capitão-do-campo germinadas *in vitro*, com aproximadamente 15 cm de altura. Em câmara de fluxo laminar, e com auxílio de bisturi, foram extraídos os explantes, que consistiram de segmentos nodais de aproximadamente 1,5 cm contendo um par de folhas com redução de 2/3 da área foliar.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura básico adicionado de $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético (ANA) e benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,1; 0,15; 0,2; 0,4 e $0,6 \text{ mg L}^{-1}$. Após a inoculação, os tubos com os explantes foram mantidos em sala de cultura. Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado, com 5 tratamentos (concentrações de BAP), 4 repetições e 6 explantes por repetição, sendo um explante por tubo de ensaio.

A avaliação foi realizada aos 60 dias, contabilizando-se o percentual de explantes com emissão de gemas axilares e o número de gemas axilares emitidas por explante. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância e Estatística Descritiva. As análises estatísticas foram realizadas no software Statistica 10.0 (STATSOFT, 2010).

Para os subcultivos 1 e 2, gemas axilares oriundas das brotações do cultivo inicial e subcultivo 1, respectivamente, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura básico adicionado de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. A avaliação foi realizada aos 60 dias, contabilizando-se o percentual de explantes com emissão de gemas axilares e o número de gemas axilares emitidas por explante. Para o subcultivo 2, também foram avaliadas o comprimento das brotações. Dos dados obtidos foram calculadas as médias e desvio padrão das características avaliadas.

2.3. Enraizamento

Explantes com mais de 2,0 cm de comprimento, obtidos no subcultivo 2 da fase de multiplicação, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura básico, adicionados de ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de 0; 1,0; 2,0; 4,0; e $6,0 \text{ mg L}^{-1}$. Após a inoculação, os tubos com os explantes foram mantidos em sala de

cultura. Após 45 dias, foram verificados o número de explantes que emitiram raízes, o número de raízes por explante, o comprimento da maior raiz e o aspecto visual das bordações com relação à presença de clorose.

Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado, com 5 tratamentos (concentrações de AIB), 4 repetições, sendo 6 explantes por repetição. Os dados obtidos foram submetidos a Análise de Variância. As análises estatísticas foram realizadas no software Statistica 10.0 (STATSOFT, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Desinfestação e germinação *in vitro* de *Terminalia fagifolia* e *T. argentea*

Após 3 dias, foram observadas contaminações provenientes de fungos nas sementes de *T. fagifolia* no experimento com hipoclorito de sódio e no experimento com digluconato de clorexidina (Figuras 1 a 3). Aos 14 e 10 dias para os experimentos com hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina, respectivamente, houve 100% de contaminação (Figuras 1 e 2).

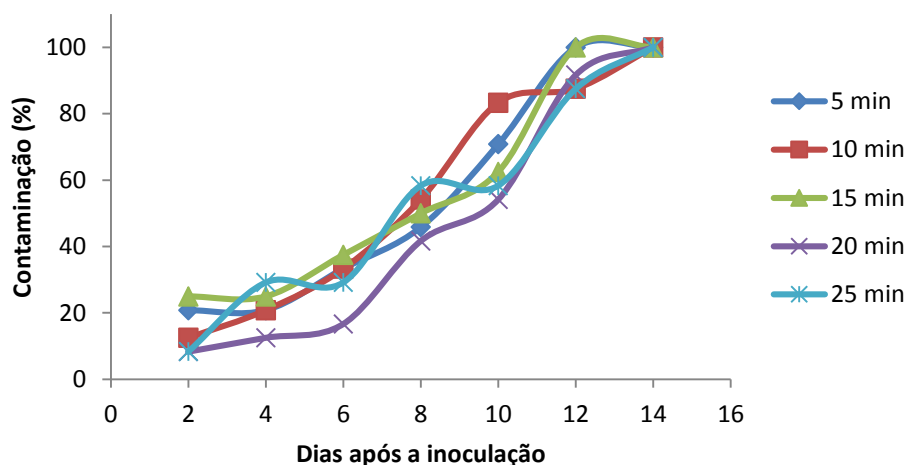


Figura 1: Percentual de contaminação de sementes de *Terminalia fagifolia* em função dos tempos de imersão em hipoclorito de sódio, durante 14 dias.

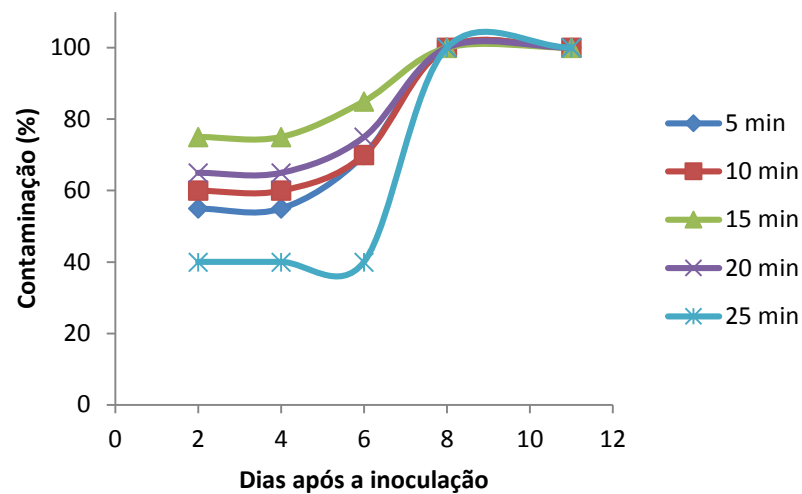


Figura 2: Percentual de contaminação de sementes de *Terminalia fagifolia* em função dos tempos de imersão em digluconato de clorexidina, durante 12 dias.

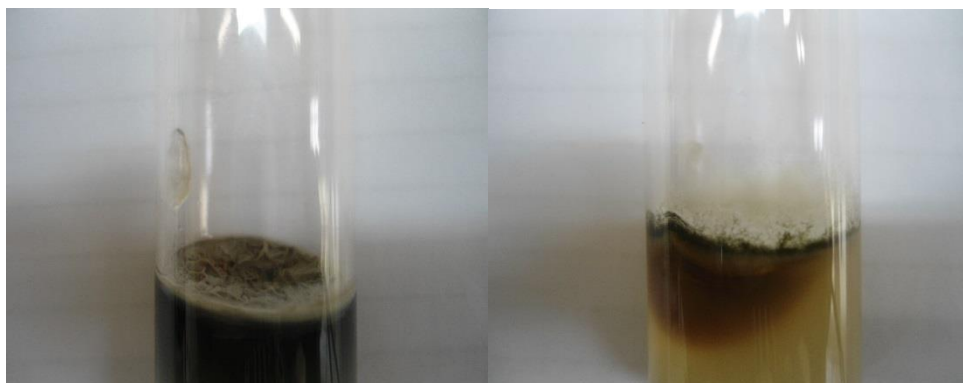


Figura 3: Contaminação por fungos em sementes de orelha-de-cachorro (*Terminalia fagifolia*) inoculadas em meio de cultura. Fonte: o autor

Para *T. argentea*, ocorreu contaminação total no experimento em que as sementes foram inoculadas com o tegumento, aos 12 dias (Figura 4). Já no caso do experimento em que as sementes foram inoculadas sem tegumento, de acordo com a ANOVA, não houve diferença significativa entre os tratamentos sobre o percentual de contaminação ($p > 0,05$). A taxa de contaminação variou entre 17% e 42% (Figura 5).

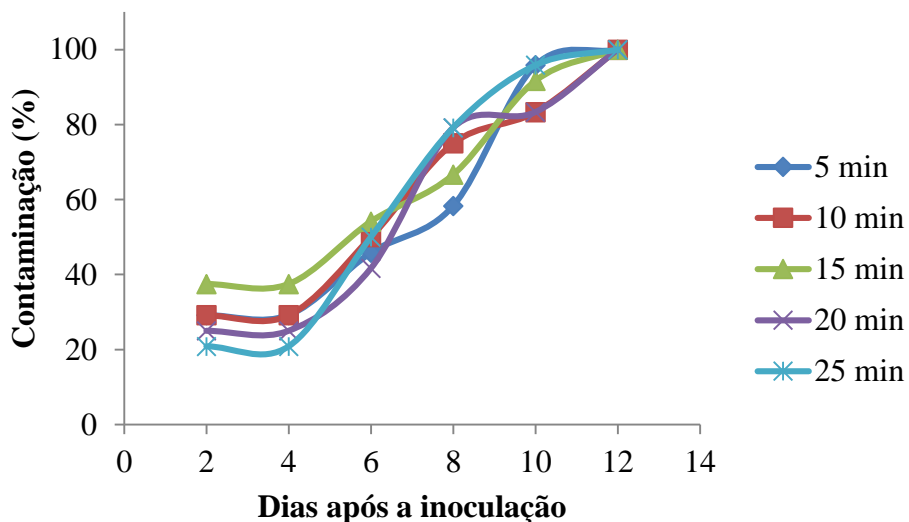


Figura 4: Percentual de contaminação de sementes de *Terminalia argentea* inoculadas com tegumento, em função dos tempos de imersão em hipoclorito de sódio, durante 12 dias.

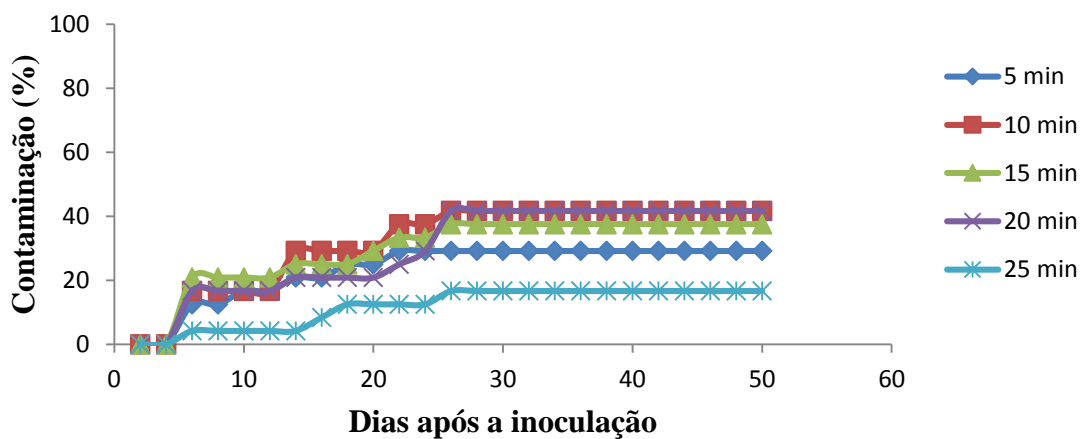


Figura 5: Percentual de contaminação de sementes de *Terminalia argentea* inoculadas sem o tegumento, em função dos tempos de imersão em hipoclorito de sódio, durante 50 dias.

Embora não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, o hipoclorito de sódio se mostrou mais eficiente na desinfestação de sementes de *T.*

argentea inoculadas sem tegumento quando se utilizou o tempo de imersão de 25 minutos, com contaminação de 17% das sementes ao final de 50 dias.

A concentração e o tempo de exposição de sementes em hipoclorito de sódio são fatores importantes para promover germinação *in vitro* livre de microrganismos. Em sementes de Calêndula (*Calendula officinalis*) germinadas *in vitro*, o aumento do tempo de imersão dessas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% reduziu a ocorrência de contaminantes fúngicos e bacterianos, sendo que a imersão por 30 minutos se mostrou a mais eficiente dentre as avaliadas (BEVILAQUA et al., 2011).

COUTO et al. (2004) verificaram que as concentrações de 2,5 e 5% de hipoclorito de sódio promoveram a desinfestação de 85 a 90% de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King), nos tempos de 20 e 30 minutos de imersão, mostrando a eficiência dos tratamentos com hipoclorito quando comparando àquelas que não passaram por esse procedimento.

Diante desses resultados, podem-se destacar alguns fatores que contribuíram para a contaminação integral das sementes de orelha-de-cachorro. Segundo MUNIZ et al. (2007), as sementes podem ser contaminadas por patógenos no campo ou em atividades subsequentes, como colheita, secagem e beneficiamento. Os fitopatógenos podem estar associados às sementes na sua superfície, no seu interior ou em mistura. Eles aparecem nas mais variadas formas de propagação, desde esporo até estrutura de resistência (os escleródios), micélios e outras estruturas específicas dos diversos grupos de fungos, bactérias, nematoides e vírus. As sementes de *Terminalia fagifolia* possuem tegumento espesso e pouco permeável, podendo assim abrigar organismos patogênicos e dificultar a penetração do hipoclorito de sódio, usado na desinfestação.

Uma alternativa para promover a desinfestação de sementes seria o uso de fungicidas, na tentativa de contornar os prejuízos causados por fungos. FERREIRA et al. (2009) verificaram que a concentração de hipoclorito de sódio a 1,75% por 30 minutos, foi mais eficiente quando associada à utilização da solução antifúngica (Carboxin + Thiram, Carbendazim, Clorotalonil +tiofanato-metílico), para promover a desinfestação *in vitro* de explantes de bacurizeiro (*Platonia insignis*).

De acordo com LAZAROTTO et al. (2013), a utilização do fungicida Captan 500 ppm combinado com produto biológico à base de *Trichoderma* spp. foram eficientes para

a redução dos danos causados por *Rhizoctonia* sp. na germinação e desenvolvimento de plântulas de *Cedrela fissilis*.

No entanto, altas concentrações de fungicida podem ser prejudiciais. VIEIRA & GUSMÃO (2006) avaliaram negatividade à velocidade de emergência de genipapo (*Genipa americana*), quando submetidas a maiores concentrações de fungicidas, provavelmente devido à fitotoxidez, já o percentual de germinação não foi alterado pelo uso de fungicidas.

A autoclavagem das sementes pode ser uma alternativa viável para promover a desinfestação das mesmas. Embora seja um procedimento pouco discutido em estudos de sementes florestais, já existem protocolos para algumas espécies. CORDER & BORGES JUNIOR (1999) constataram que a autoclavagem durante 20 e 25 minutos a 80°C, foi eficiente para a desinfestação e quebra de dormência de acácia negra (*Acacia mearnsii*). Quando se usou tempo inferior a 20 minutos o processo não foi eficiente para a desinfestação, no entanto períodos acima de 30 minutos de autoclavagem promoveram a morte do embrião.

Apesar da ausência de germinação em *T. fagifolia* seja provavelmente explicada pela contaminação do experimento, podem haver outros fatores de relevante importância, como uma possível dormência nas sementes da espécie. A presença de um tegumento duro pode causar a impermeabilidade à água e oxigênio nas sementes. Em algumas espécies a escarificação química e mecânica são eficientes para superar a dormência tegumentar. A escarificação química com ácido sulfúrico concentrado por 60 minutos, seguida de lavagem em água, favorece a germinação *in vitro* de Paricá (*Schizolobium amazonicum*), aumentando para 94% a taxa de germinação (AMORIM et al., 2013). Segundo INÁCIO et al. (2010), a imersão por 146 e 144 minutos em ácido sulfúrico proporcionou maior porcentagem de germinação *in vitro* (63%) de *Cochlospermum regium*.

Outro tipo de dormência comumente encontrado em sementes florestais é do tipo fisiológico, normalmente associado ao desbalanço da relação entre os hormônios. A utilização de reguladores de crescimento contendo giberelinas influenciam na germinação de diversas espécies. Segundo SOARES et al. (2009), concentrações de 0,2 mg L⁻¹ de GA₃ adicionada aos meios de cultura WPM e MS/2 favoreceram a germinação de sementes de Mangaba (*Hancornia speciosa*). A adição de GA₃ no meio de cultura não

influenciou significativamente a germinação de ingazeiro (*Inga vera*), no entanto concentrações de 0,2 mg L⁻¹ favoreceram a germinabilidade (STEIN et al., 2007).

3.2. Germinação in vitro de *T. argentea*.

De acordo com a ANOVA, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos de desinfestação sobre o percentual de germinação de sementes de *T. argentea* sem tegumento. Embora não ocorreu diferença estatística, o tratamento onde as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 25 minutos apresentou menor taxa de contaminação e cerca de 83% de germinação, aos 60 dias (Figura 6). O aspecto geral das plântulas de *T. argentea*, podem ser observados na figura 7.

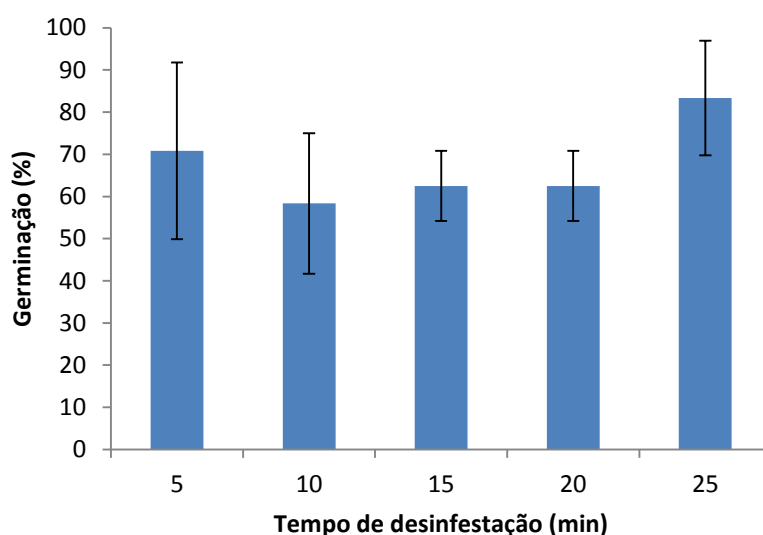


Figura 6: Percentual de germinação de sementes de *Terminalia argentea* sem tegumento, em função dos tempos de desinfestação em hipoclorito de sódio, aos 60 dias.



Figura 7: Aspecto geral das plântulas de *Terminalia argentea* germinadas *in vitro*. Fonte: o autor

Embora a diferença entre os percentuais de germinação não tenha sido significativa, verificou-se que as sementes tratadas em hipoclorito de sódio por 25 minutos apresentaram melhor percentual de germinação, sendo este 18% maior em relação ao segundo melhor tratamento (5 minutos de imersão). Dentre as condições testadas, observa-se que a germinação está diretamente relacionada com a contaminação, sendo que os tratamentos de menor contaminação obtiveram maiores percentuais de germinação. Outro fator que contribuiu para a germinação foi a retirada do tegumento, pois além de funcionar como barreira de absorção de água e oxigênio pelo embrião é considerado uma das principais fontes de propágulos de agente contaminantes.

3.3. Multiplicação de *Terminalia argentea*

No cultivo inicial, não foi observada diferença significativa de acordo com a ANOVA ($p > 0,05$) para o percentual de explantes que emitiram brotações e número de brotações por explante, em função dos tratamentos. No entanto, verificou-se que a concentração de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ foi mais favorável para a multiplicação *in vitro* de *T. argentea* (Tabela 1).

Tabela 1: Percentual de explantes com emissão de brotações e número de brotações por explante de *Terminalia argentea*, em função das concentrações de benzilaminopurina (BAP), no cultivo inicial

BAP (mg L ⁻¹)	Explantes que emitiram brotação (%)	Número médio de brotações por explante
0,10	8,3	1,5
0,15	12,5	2
0,20	8,3	1
0,40	4,1	1
0,60	4,1	1

A baixa taxa de multiplicação observada no cultivo inicial pode estar associada a diversos fatores, como o meio de cultivo, concentração de reguladores de crescimento, tipo de explante utilizado e resposta do material genético à multiplicação. CAMPOS (2013) verificou que a utilização de segmentos cotiledonares favoreceu a multiplicação de umburana (*Amburana cearenses*) na contração de 0,44 mg L⁻¹ de BAP, quanto ao número de brotações por explante (2,6). Para a sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.), a utilização de segmentos nodais foi mais favorável ao surgimento de gemas axilares na concentração de 0,3 mg L⁻¹ de BAP no primeiro cultivo (MOURA et al., 2012).

Em espécies do mesmo gênero, trabalhos mostram que a concentração de BAP influencia significativamente na multiplicação *in vitro*. A concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP foi favorável à multiplicação de segmentos nodais de *Terminalia bellerica*, ocasionando maior percentual de explantes com emissão de brotação (80%) e número de brotações por explante (3,8) (MEHTA et al., 2012).

Para o subcultivo 1, houve aumento do número de explantes com emissão de brotação (92,8%). Com relação a taxa de multiplicação, observou-se uma média de 7 brotações por explante e 13,69 gemas axilares por tudo, ou seja, 1,96 gemas por brotação (Figura 8).

Para o subcultivo 2, ocorreu emissão de brotação em 61% dos explantes. O número de brotações por explante reduziu em relação ao subcultivo 1, sendo verificada a média de 2,06 brotações por tubo. Foi observado que as brotações atingiram comprimento médio de 4,2 cm (Figura 9). Além de maior comprimento nas brotações, foi verificado enraizamento em 8,3% dos tubos, indicando assim um possível potencial para início da fase de enraizamento.

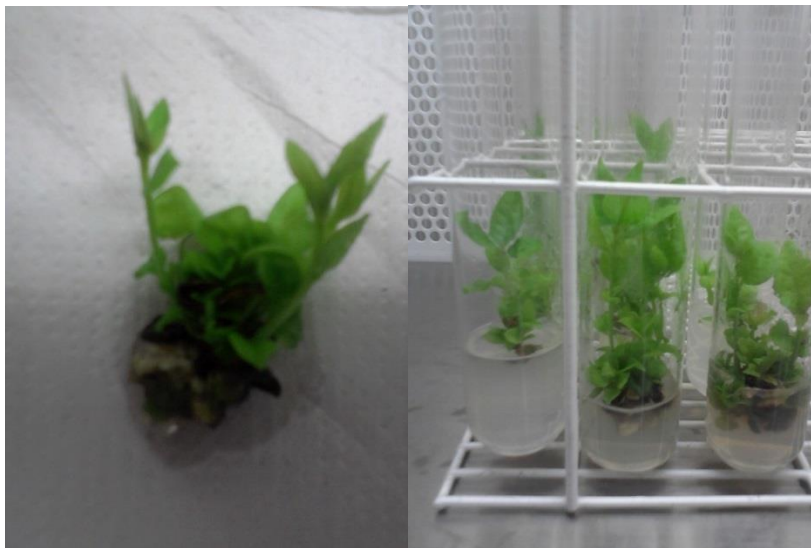


Figura 8: Explantes de *Terminalia argentea* do subcultivo 1 da fase de multiplicação, em meio de cultura acrescido de 0,15 mg L⁻¹ de BAP.



Figura 9: Brotações de *Terminalia argentea* alongadas e enraizadas no subcultivo 2 da fase de multiplicação.

3.4.Enraizamento

Na fase de enraizamento, não foi observada diferença significativa de acordo com a ANOVA ($p > 0,05$) para o percentual de explantes que emitiram raízes, número de raízes adventícias, comprimento da maior raiz e percentual de plântulas sem clorose, em função das concentrações de AIB. No entanto, verificou-se que a concentração de 4,0 mg L⁻¹ de AIB foi mais favorável para o enraizamento *in vitro* de *T. argentea* (Tabela 2).

Tabela 2: Percentual de enraizamento, número de raízes adventícias, comprimento da maior raiz e percentual de plantas sem clorose, para *Terminalia. argentea* propagada *in vitro*, em função das concentrações de AIB

AIB (mg L ⁻¹)	Percentual de enraizamento (PE)	Número de raízes adventícias (NR)	Comprimento da maior raiz (CR)	Percentual de plântulas sem clorose (PS)
0,0	55	3,14	47,14	50
1,0	50	4,10	48,23	45
2,0	45	4,67	30,71	55
4,0	80	5,17	47,08	70

CV: PE = 36,56% NR= 33,29% CR= 54,99% PS= 19,64%

O aspecto geral das raízes e plantas de *T. argentea* formadas durante a fase de enraizamento é mostrado na figura 10.



Figura 10: Aspecto geral das raízes e plantas de *T. argentea* obtidas na fase de enraizamento *in vitro*.

Embora não ocorreu diferença significativa para os tratamentos, diversos autores destacam a importância da auxina na fase de enraizamento. GOMES et al (2014) verificou que $4,8 \text{ mgL}^{-1}$ de AIB adicionados ao meio WPM, favoreceu a formação do maior número de raízes (27) em Moreira (*Maclura tinctoria*). Para o jenipapo (*Genipa americana*), a concentração de $9,8 \text{ }\mu\text{M}$ de AIB favoreceu maior taxa de enraizamento (70%). No entanto, concentrações maiores que $9,8 \text{ }\mu\text{M}$ de AIB reduziu o percentual de enraizamento, o número e o comprimento de raízes em *Genipa americana* (ROCHA et al, 2008).

Em trabalhos semelhantes, POMPELLI & GUERRA (2005) verificaram que as concentrações de 10 e $15 \text{ }\mu\text{M}$ são indicadas para o enraizamento *in vitro* de *Dyckia distachya* Hassler quando acrescentado ao meio de cultivo MS entre 10-15 dias antes da aclimação *ex vitro* (choque auxínico).

A estrutura do sistema radicular quanto o número e o comprimento de raízes é de grande importância na aclimação *ex vitro*, portanto, a utilização da concentração correta de AIB na fase de enraizamento pode proporcionar melhores resultados para a produção de mudas. A adição de $7,8 \text{ }\mu\text{M}$ em meio de cultivo MS com $\frac{1}{4}$ da concentração dos sais no enraizamento *in vitro*, favoreceu o desenvolvimento do sistema radicular e o percentual de sobrevivência de mudas de erva-mate aclimatadas em câmara de crescimento e casa de sombra (HORBACH et al, 2011).

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e as condições experimentais adotadas, conclui-se que:

- O hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina não foram eficientes para promover a desinfestação das sementes de *Terminalia fagifolia*, nas concentrações e nos tempos de imersão testados.
- A imersão de sementes de *Terminalia argentea* sem tegumento em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 25 minutos é indicada para promover a desinfestação e germinação *in vitro*.
- A adição de 0,15 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura com sais e vitaminas MS, favorece a multiplicação *in vitro* de *Terminalia argentea*.
- A adição de 4,0 mg L⁻¹ de AIB ao meio de cultivo favorece o enraizamento *in vitro* de *Terminalia argentea*.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- O armazenamento pelo período de 60 dias em câmara fria e a embebição em água em temperatura ambiente por 24 horas foi o melhor tratamento para promover a germinação de *Terminalia argentea*.
- A imersão de sementes de *Terminalia argentea* sem tegumento em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 25 minutos é indicada para promover a desinfestação e germinação *in vitro*.
- A adição de 0,15 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura com sais e vitaminas MS, favorece a multiplicação *in vitro* de *Terminalia argentea*.
- A adição de 4,0 mg L⁻¹ de AIB ao meio de cultivo favorece o enraizamento *in vitro* de *Terminalia argentea*.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. CERRADO: Espécies úteis. **PLANALTINA: EMBRAPA- CPAC**, P. 381-384, 1998.
- AMORIM, A. M. T; LEMOS, O. F; SOUZA, C. B. L; LEITE, D. R. R. Influência da quebra de dormência na germinação *in vitro* de sementes de Paricá. **17º Seminário de Iniciação Científica e 1º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental**, Belém, 2013.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSCOU, G.; KEFALAS, P.; Food Chem. 2005, 89, 27; Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **FoodChem.**, v. 89, p. 27-36, 2005.
- AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extrato das folhas *Terminalia fagifolia* Mart. e Zucc. **Química Nova**, Vol. 32, No. 6, 1509-1512, 2009
- BARREIROS, A. L. B.S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Estresse Oxidativo: Relação entre espécies reativas de oxigênio e a defesa do organismo. **Química Nova**. v. 29, p. 113-123, 2006.
- BARRUETO CID, L.P. Citocininas. **Introdução aos hormônios vegetais**. 1.ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p.55-81.
- BEVILACQUA, C. B.; SILVEIRA, L. R.; REINIGER, R. S, GOLLE.; D. P. ROSA, F. C. Desinfestação superficial, germinação e regeneração *in vitro* a partir de sementes de calêndula. **Ciência Rural**, vol. 45, n 11, 2011.
- CAMPOS, V. C. A.; BRITO, A. L; GUTIERREZ, I. E. M.; SANTANA, J. R. F; SOUZA, A. V. V. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.4, p.639-644, 2013.
- CORDER, M. P. M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acaciamearnsii* de Wil. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

- 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**, Viçosa, v.28, n.5, p.633-642, 2004.
- DUTRA, L. F; WENDLING, I; BRODANI, G. E. A micropropagação de Eucalipto. **Revista Florestal Brasileira**, n 58, p 49-59, 2009.
- FACHINELLO, J. C; HOFFMANN, A.; NACHTGAL, J. C.; KERSTEN, E. Propagação vegetativa por estaquia. **Propagação de plantas frutíferas**. p. 69-109. 2005
- FERREIRA, M. G. R; SANTOS, M. R. A; SANTOS, E. R; ROCHA, J. F. CORREA, A. O; Desinfestação de explantes radiculares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Saber Científico**, vol 2, n 2, p. 56-62, 2009.
- FERREIRA, R. A.; BOTELHO, S. A.; MALAVAS, M. M.; DAVIDE, A. C. Caracterização morfológica de frutos, semente, plântula e muda de capitão-do-campo (*Terminalia argentea* Mart. &Zucc. – Combretaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 20, n°. 2, p. 202-209, 1998.
- GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; LOPES, F. A. Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of *Combretum laxum*. **Molecules**, vol 3, p 2717-2728, 2008
- GOMES, G. A. C.; PAIVA, R. Enraizamento *in vitro* de brotações obtidas a partir de segmentos nodais de Moreira (*Maclura tinctoria*). **Scientia Vitae**. v 1, n 3, p. 3-9, 2014.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação de genética de plantas**. Brasília: Embrapa, v.1, p.183-260. 1998.
- HARTMANN, T. H., KESTER, D. E., DAVIES, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 1990. 647p.
- HORBACH, M.A; BISOGNIN, D. A; KIELSI, P; QUADROS, K. M; FICK, T. A. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, .41, n.1, p. 113-119, 2011
- HU C.Y.; WANG PJ. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS DA; SHARP WR; AMMIRATO PV; YAMADA Y. (eds). **Handbook of plant cell culture –**

techniques for propagation and breeding. New York: Mac Millan Publishing Company 1983..p. 177-277. INÁCIO, M. C; BERTONI, B. W; FRANÇA, S. C; PEREIRA, A. M. S. Germinação de sementes *in vitro* e desenvolvimento de plantas *ex vitro* de algodãozinho-do-campo. **Ciência Rural**, vol 40, n 11, p 2294-2300, 2010.

JARDIM, L. S.; SAMPAIO, P. T. B; COSTA S. S.; GONÇALVES, C. Q. B.; BRANDÃO, H. L. M , Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Anibaro saeodora* Ducke). **Acta Amazonica**,. vol. 40, n 2, p 275 – 280, 2010.

LAZAROTTO, M; MUNIZ, M. F. B; BELTRAME, R; SANTOS, A. F; MULLER, J; ARAUJO, M. M. Tratamento biológico e químico em sementes de *Cedrella fissilis* para controle de *Rhizoctonia sp.* **Cerne**, v. 19, n. 1, p. 169-175, 2013.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Vol. 1 / 5° ed. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, 2008.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M.P.; HOPPE, J.M., Micropropagação de Caixeta, *Didymopana morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, v.9, n.1, p.47-61, 1999.

MEHTA, J; SAIN, M; MATHURIYA, B. L; NARUKA, R; KAVIA, A; SHARMA, D. R. Rapid micropropagation and callus induction of *Terminalia bellerica* Roxb. An endangered plant. **Asian Journal of Plant Science and Research**, vol. 2 n. 3, p. 364-368, 2012.

MOURA, L. C; TITON, M; FERNANDES, J. S. C; SANTANA, R. C; OLIVEIRA, M. L. R; Micropropagação de Sucupira-preta por meio de gemas axilares. **Revista Agropecuária**, vol 47, n 12, p. 1691-1698, 2012.

MUNIZ, M. F. B; SILVA, L. M; ALBUME, E. Influência da assepsia e do substrato na qualidade de sementes e mudas de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, vol 29, n 1, p. 140- 146, 2007.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid grow than bioassays with to bac cotissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NACCZK, M., SHARIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, vol. 1054, p 95-111, 2004.

NASCIMENTO, D. D; SANTOS, J. A. Viabilidade econômica da produção de mudas micropropagadas de Dendezeiro. **Revista de Administração da UEG**, v.4, n.1, jan./abr. 2013.

NETTO, D.A.M; FAIAD, M.G.D. Viabilidade e sanidade de sementes de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, vol 17, n 1, p 75-80, 1995.

OLIVEIRA, A. K. M.; FARIAS, G. C. Efeito de diferentes substratos na germinação de sementes de *Terminalia argentea* (Combretaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 3, p. 320-323, 2009.

PASQUAL, M; SANTOS, S. C; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, P. K. REZENDE, J. C; FERREIRA, E. A.. Micropropagação do Abacaxizeiro ornamental. **Horticultura brasileira**. v. 26, n. 1, 2008.

POMPELLI, M. F; GOMES, M. P. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* Hassler, sob diferentes concentrações de AIB. **Floresta e ambiente**. v 12, n 2, p. 42-49, 2005.

ROCHA, M.A.C. da et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.3, p.769-774, 2008.

SILVA JUNIOR, M.C; PEREIRA, B. A. S. **100 árvores do cerrado**, Rede de sementes do Cerrado, 288p, 2009.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; STEIN, V.C.; NERY, F.C.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M. de. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA3 e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, Edição Especial, p.1847-1852, 2009.

SOUZA, O. A; NASCIMENTO, J. L; NAVES, R.V; BORGES, J. D. Propagação sexuada de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) Efeito da procedência dos frutos e do Ácido

Giberélico na emergência de plântulas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v 37 n3, p 131-136, 2007

STATSOFT, Inc. (2010). STATISTICA (data analysis software system), version 10.

STEIN, V.C. PAIVA, R; SOARES, F. P; NOGUEIRA, R. C; SILVA, L. C; EMRICH, E. Germinação in vitro e ex vitro de *Inga vera* Willd. subsp. affinis (DC.) T.D. Penn. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.1702-1708, 2007.

VIEIRA, F. A.; GUSMÃO, E. Efeitos de giberelinas, fungicidas e do armazenamento na germinação de sementes de *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Cerne**, v. 12, n. 2, p. 137-144, 2006.