



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E
BIOPROCESSOS

BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS

TAMILES OLIVEIRA DA SILVA

DESINFESTAÇÃO E INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA
GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Mimosa ophthalmocentra* Mart. ex Benth.

SUMÉ - PB
JUNHO - 2016

TAMILES OLIVEIRA DA SILVA

**DESINFESTAÇÃO E INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA
GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Mimosa ophthalmocentra* Mart. ex Benth.**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora:

Profa. Dra. Carina Seixas Maia Dornelas

Coorientadora:

Profa. Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento

SUMÉ - PB
JUNHO – 2016

S586d Silva, Tâmilis Oliveira da.
Desifestaçãõ e influênciã do substrato na germinaçãõ *in vitro* de *Mimosa ophthalmocentra* Mart. Ex. Benth.. / Tâmilis Oliveira da Silva. - Sumé - PB: [s.n], 2016.

40 f.

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Carina Seixas Maia Dornelas; Co-orientador^a: Prof^a. Dr^a. Ana Verônica Silva do Nascimento.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharelado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

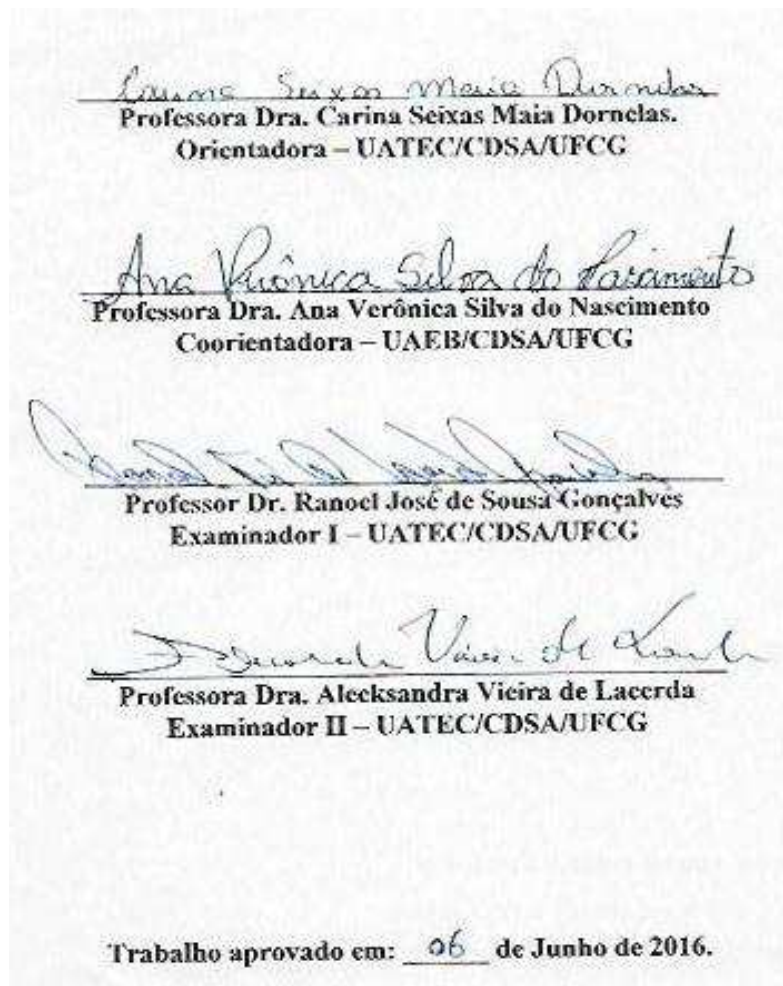
1. Botânica - *Rosidae*. 2. Mimosoideae - *Mimosa ophthalmocentra*. 3. Cultivo *in vitro*. I. Título.

CDU: 582.736.1 (043.1)

TAMILES OLIVEIRA DA SILVA

DESINFESTAÇÃO E INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Mimosa ophthalmocentra* Mart. ex Benth.

BANCA EXAMINADORA:



SUMÉ - PB
JUNHO - 2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu amado e querido filho, Carlos Pyetro, pessoa que me inspira a viver, e prova irrefutável do amor incondicional.

Dedico a minha mãe, Josefa Veríssimo, meu alicerce que sonha os meus sonhos e neles se realizam.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar a Deus, por me dar força, saúde e coragem durante toda esta longa caminhada. Por nunca permitir que desistisse, obrigada!

Agradeço em especial a minha orientadora Profa. Dra. Carina Seixas Maia Dornelas, pela paciência e suporte no pouco tempo que lhe coube, e pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

A minha coorientadora Ana Verônica, por toda ajuda esclarecimento prestado e contribuição na elaboração desse trabalho. Muito obrigada!

Ao meu filho Carlos Pyetro, que embora não tivesse conhecimento disto, mas iluminou de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos.

A minha amada mãe Josefa Veríssimo, que nunca deixou de acreditar em mim, e meus irmãos Lucas Matheus e Thomas Brener por estar sempre presente em todos os momentos, bons ou ruins, pelo apoio, incentivo e força durante esses anos todos. Por isso essa conquista é nossa. Amo muito vocês!

Agradeço também a Adenilson Alves, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

Aos queridos, Antônio Carlos e Luciene Lucena, pelo incentivo e apoio, por serem como pais para mim, por jamais permitirem que eu desanimasse e por estar sempre presente em minha vida.

As minhas queridas amigas de infância, Juliane Vasconcelos e Flavia Arajo que mesmo distantes tornam minha vida melhor e são muito importantes pra mim. Obrigada meninas!

Ao professor Ranoel Gonçalves, pelo fornecimento das placas de petri. A professora Alecksandra Vieira de Lacerda, por disponibilizar equipamento e permitir a realização do experimento na B.O.D. do LAEB.

Um agradecimento especial a Aran Jonatas, pela força e compreensão que teve durante estes cinco anos, me ajudando a cuidar da educação do nosso filho. Aran você é um exemplo de pai. Muito obrigada!

Ao meu amado pai José de Arimateia (*in memoriam*), que mesmo não estando mais presente me ensinou os verdadeiros valores da vida. Te amo pai!

A Ariana, pelo fornecimento das sementes de jurema de imbira, que foi de suma importância para realização deste trabalho. Agradeço também a Renato Guimarães pela amizade, pelo carinho, risadas, pelas dicas e contribuição no meu trabalho.

As minhas queridas avós materna e paterna, Rita e Ester por suas orações e incentivo, e por torcerem sempre por mim.

Agradeço ainda as minhas amigas Analu Freitas, jully Samara e Carla Araújo por dividir comigo tantos momentos de angústia, incertezas e alegrias, meninas vocês com nossas conversas diárias fizeram com que esse trabalho se tornasse mais leve. A Carla Araújo muito obrigada por sua amizade, pelos seus ensinamentos, pela ajuda no experimento, pela paciência e disposição para ajudar, e principalmente, por todos os momentos bons que passamos juntas.

A minha querida tia Daya, que todos os dias me conferi carinho e agrado.

A minha família que nunca deixou de acreditar em mim, por estar sempre presente em todos os momentos, pelo incentivo, pelo carinho e amor, pela compreensão, e principalmente, por ser uma família tão unida. Amo muito vocês!

Agradeço ao meu supervisor de estágio Thiago Fideles, por sua amizade, e por me conduzir no estágio amplamente com sua graça e paciência.

Agradeço também a Universidade Federal de Campina Grande e ao Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, pelo curso de bacharelado e pela vaga que me ofertaram.

Agradeço aos meus professores que contribuíram para o meu conhecimento, e por fim ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LACTV) pelo suporte no desenvolvimento da minha pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse vencer mais esta etapa da minha vida.

RESUMO

A *Mimosa ophthalmocentra* Mart. ex Benth é uma planta comum na Caatinga, encontrada freqüentemente em muitos ambientes, contudo pouco estudada. As presenças de microrganismos são importantes fatores que podem reduzir o vigor germinativo *in vitro* das sementes, assim protocolos de desinfestação são desenvolvidos para proporcionar assepsia, qualidade das plantas e aumento na cadeia produtiva, por isso, a propagação *in vitro* a partir de sementes apresenta-se como uma alternativa para o fornecimento de plantas sadias livres de patógenos. Diante da necessidade de estudos mais detalhados sobre a germinação é que esta pesquisa propõe-se avaliar o potencial de germinação de sementes de *M. ophthalmocentra* Mart. ex Benth, visando determinar a melhor qualidade de substrato para a sua germinação e desenvolvimento vegetativo, além de verificar a ação do melhor agente desinfestante e seu tempo de exposição. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFCG. As sementes foram provenientes de matrizes situadas no sítio Lagoa da Cruz no município de Sumé, região semiárida da Paraíba, onde foram separadas e selecionadas. Foram utilizados cinco tratamentos de desinfestação: sementes inoculadas diretamente no meio, sem tratamento para desinfestação (T1), imersão em álcool 70% por 10 minutos, associado com a imersão em NaOCl nas concentrações de 2,0% e 1,5% por 10 e 30 minutos respectivamente (T2 e T3); álcool 99,3% por 20 minutos, associado com a imersão em NaOCl nas concentrações de 1,0% e 0,5% por 20 e 40 minutos (T4 e T5). As sementes foram, então, submetidas à desponte e posteriormente inoculadas em potes de vidro e placas de petri contendo os substratos Ágar-água e papel tipo Germitest respectivamente. Todos os processos de desinfestação, desponte e inoculação, foi realizado em câmara de fluxo laminar com todos os materiais autoclavados e com as devidas precauções de assepsia. O delineamento foi inteiramente casualizado, em quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 10 unidades amostrais (sementes), em esquema fatorial 5x2 (agente desinfestante x substratos). Os resultados mostraram que o ágar-água foi o melhor substrato aplicado, pois ele atingiu os melhores percentuais de germinação, primeira contagem e velocidade de germinação, e o melhor tratamento de desinfestação foi o T2. Dessa forma, a imersão por 10 minutos em álcool 70%, e 10 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 2,0% não influenciaram a germinação das semente, proporcionando a melhor desinfestação, quando estas foram utilizadas no substrato ágar-água.

Palavras-chaves: Caatinga, Cultivo *in vitro*, Germinação *in vitro*, Desinfestação, Semente.

ABSTRACT

Mimosa ophthalmocentra Mart. ex Benth is a common plant in the Caatinga, often found in many environments, yet little studied. The presence of microorganisms are important factors that can reduce the effect of in vitro germinating seeds and disinfection protocols are designed to provide aseptically plant quality and increased production chain, therefore, in vitro propagation from seed presented as an alternative for supply of healthy plants free of pathogens. Given the need for more detailed studies on the germination is that this research aims to evaluate the potential of *M. ophthalmocentra* ex BenthMart seed germination, to determine the best substrate quality for germination and seedling development, and to identify the action of the best disinfest agent and his exposure time. The experiment was conducted at Tissue Culture Laboratory of Plant UFCG. The seeds came from plants located in “Lago da Cruz” site in the municipality of Sumé, semiarid region of Paraíba, which were separated and selected. five disinfection treatments were inoculated: seeds directly in the middle, without treatment for disinfection (T1), immersion in 70% alcohol for 10 minutes, associated with immersion in NaOCl in of 2.0% and 1.5% for 10 and 30 minutes respectively (T2 and T3); 99.3% alcohol for 20 minutes, associated with the immersion in NaOCl at concentrations of 1.0% and 0.5% for 20 and 40 minutes (T4 and T5). The seeds were then subject to emerges later and seeded into glass pots and Petri dishes containing agar-water and paper-type substrates Germitest respectively. All disinfection processes, and lopping inoculation was performed in a laminar flow hood with all the autoclaved materials with appropriate aseptic precautions. The design was completely randomized, with four replicates per treatment, each repetition being composed of 10 sampling units (seeds) in a factorial 5x2 (disinfest agent x substrates). The results showed that the water-agar was the best substrate applied as it reached the best percentage of germination, first count and germination speed, and the best disinfection was T2. Thus, immersion for 10 minutes in 70% ethanol and 10 minutes in sodium hypochlorite at 2.0% did not affect the germination of seed disinfection providing the best when they were used in a water-agar substrate.

Keywords: Caatinga. in vitro cultivation. in vitro Germination. Disinfection. Seed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Localização do município de Sumé na microrregião do Cariri Ocidental, Semiárido Paraibano.....	25
Figura 2 - (A) e (B) Processo de desponte da semente de <i>M. ophthalmocentra</i>	27
Figura 3 - (A) Sementes de <i>M. ophthalmocentra</i> inoculadas no substrato ágar-água e (B) Sementes de <i>M. ophthalmocentra</i> inoculadas no substrato papel germitest	27
Figura 4 - (A) Frascos e placas contendo os substratos ágar-água e papel germitest respectivamente. (B) Câmara de fluxo laminar contendo os materiais estéreis para realizações de todos os procedimentos de assepsia.....	28
Figura 5 - Percentual de germinação in vitro de sementes de <i>M. ophthalmocentra</i> nos substratos ágar-água e papel germitest, em função dos tratamentos de desinfestação.....	30
Figura 6 - Porcentagem de primeira contagem de germinação in vitro de sementes de <i>M. ophthalmocentra</i> nos substratos ágar-água e papel germitest, em função de diferentes tratamentos de desinfestação.....	31
Figura 7 - Índice de velocidade de germinação de sementes de <i>M. ophthalmocentra</i> em substrato ágar-água e papel tipo germitest, em função dos diferentes tratamentos de desinfestação.....	32
Figura 8 - Porcentagem de contaminação fúngica em sementes de <i>M. ophthalmocentra</i> germinadas in vitro nos substratos ágar-água e papel germitest, em função dos tratamentos de desinfestação empregados.....	33
Figura 9 - (A) Plântula e (B) sementes de <i>M. ophthalmocentra</i> inoculadas em substrato ágar-água apresentando contaminação fúngica.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFCG – Universidade Federal de Campina Grande

CDSA – Centro de desenvolvimento Sustentável do Semiárido

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

M. – *Mimosa*

ASA – Articulação Semiárido Brasileiro

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

S.R.A –Secretaria Regional do Ambiente e dos Recursos Naturais

ISTA–International Seed Testing Association.

GA – Giberelina

AAb – Ácido Abscísico

WPM –Wood Plant Medium

MS –MURASHIGE E SKOOG

LCTV – Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais

B.O.D – *Biochemical Oxygen Demand*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 CARACTERÍSTICA E IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE	15
2.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	17
2.2.1 Germinação <i>in vitro</i>	18
2.3 DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES	20
2.4 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA GERMINAÇÃO	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Área de Estudo	25
3.2 Desinfestação das Sementes.....	26
3.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1INTRODUÇÃO

O Semiárido brasileiro ocupa uma área em torno de 980.133,079 km² e possui uma população equivalente a 22 milhões de habitantes, representando 11,8% da população brasileira (IBGE, 2010). É caracterizada por uma vegetação caducifólia e espinhosa (ARAUJO et al., 2005). Entre os biomas do Brasil, a Caatinga é o único exclusivamente brasileiro e um dos menos conhecidos cientificamente, ocupando uma área de aproximadamente 735.000 km² (SIQUEIRA FILHO et al., 2009). A flora da caatinga apresenta indícios de elevado potencial de riqueza, e de acordo com Brasileiro (2009), há a expansão de muitas atividades econômicas desenvolvidas na região, muitas vezes estando relacionada a algum tipo de degradação de um recurso natural, colocando em risco essa biodiversidade.

Assim, há espécies com grandes resistências às condições climáticas existentes na região, espécies estas pouco estudadas e conhecidas. Uma delas é a *Mimosa ophthalmocentra* Mart. ex Benth, conhecida popularmente como jurema de imbira e pertencente à família Fabaceae e que de acordo com Giulietti et al., (2002) é considerada endêmica deste Bioma, apresentando semelhança morfológica com a *Mimosa tenuiflora* Will. por manter algumas características similares.

Nesse sentido, são poucos os trabalhos relacionados ao seu cultivo necessitando de estudos que compreendam seu comportamento germinativo, permitindo a conservação dos recursos naturais. Dessa forma, tecnologias de cultura *in vitro* bem desenvolvidas e/ou adaptadas para a jurema de imbira são de grande importância para programas de conservação de recursos genéticos, para estudo sobre sua fisiologia, para dar suporte técnico à bioquímica permitindo o estudo e dilucidação de rotas metabólicas, para fornecer grandes quantidades de plântulas que podem servir de base para o reflorestamento, e na fitopatologia para estudos de toxinas.

A cultura *in vitro* de plantas ou cultura de tecidos vegetais, refere-se ao cultivo de sementes, embriões ou fragmentos de tecido vegetal sob condições assépticas, em meios nutritivos adequados, dispondo de luz, temperatura e umidade controlada, com o objetivo de obter uma rápida multiplicação de plantas, isentas de pragas e doenças (S. R. A., 2009). Em se tratando da germinação *in vitro*, esta pode ser usada para fins de micropropagação, permitindo estudar detalhadamente as necessidades nutricionais e físicas para o pleno desenvolvimento dos embriões cultivados *in vitro*, superar dormência e testar a viabilidade de sementes (CARVALHO et al., 1998). Além disso, clones produzidos a partir de plântulas oriundas de

sementes apresentam duas características desejáveis: a variabilidade existente em um lote de sementes (o que permite melhoramento e seleção) e a juvenildade dos tecidos que darão origem ao cultivo *in vitro*.

De maneira geral, sementes são boas fontes, não apenas pelos atributos já citados, mas pelas facilidades que oferecem nos procedimentos de rotina laboratorial. No entanto, freqüentemente, o excesso de contaminações ocorrentes prejudica ou, até mesmo, inviabiliza os procedimentos de cultura de tecidos. De acordo com Ferreira (1989), um dos problemas mais sérios nos estudos de germinação é a grande contaminação fúngica das sementes, principalmente em testes realizados em incubadoras ou germinadores, que dão condições ideais para o desenvolvimento e a disseminação de alguns dos fungos, causando apodrecimento das sementes e dificultando o diagnóstico correto da qualidade fisiológica do lote. Tal fato demonstra a necessidade de utilização de produtos que visam à diminuição ou a eliminação destes patógenos.

Para minimizar os problemas de contaminação e viabilizar o processo de germinação *in vitro*, diversas substâncias têm sido testadas, dentre os quais os mais utilizados estão o etanol, o hipoclorito de sódio e o hipoclorito de cálcio, e sua concentração e o tempo de exposição pode variar, de acordo com o objetivo do trabalho (WILLADINO; CÂMARA, 2007). Outra questão que se deve levar em conta é a escolha do substrato ideal, pois seu efeito e do ambiente (em condições artificiais controladas) favorece ou impede o processo de germinação entre as sementes (AGUIAR, 1990). O substrato deve ter rigidez suficiente para sustentar a planta, mas sem prejudicar a difusão de nutrientes, o que prejudicaria a absorção pela planta, e permitir a observação da raiz e a identificação de contaminações (CABRAL et al., 2013).

Diante da necessidade de estudos mais detalhados sobre o processo germinativo das sementes, objetivou-se avaliar o potencial de germinação de *Mimosa ophthalmocentra*, sobre substrato ágar-água e papel germitest, além de verificar a ação do agente desinfestante álcool e hipoclorito de sódio e seu tempo de exposição sobre a germinação.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CARACTERÍSTICA E IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE

A *M. ophthalmocentra* Mart. ex Benth. conhecida popularmente como jurema de imbirá, pertence à família Fabaceae (Leguminosae) e subfamília Mimosoideae, é considerada uma espécie comum na Caatinga (CAVALCANTI et al., 2009) e bastante presente em matas ciliares (LACERDA et al., 2007) com grande resistência às condições climáticas existentes na região. Além disso, esta família apresenta uma distribuição em todos os Biomas brasileiros, e é uma das maiores das angiospermas, possuindo hábito bastante variável, sendo desde herbáceas até arbóreas (JUCHUM, 2007 apud SILVA, 2015).

A subfamília Mimosoideae é a segunda maior das subfamílias, apresenta cerca de 82 gêneros com aproximadamente 3.271 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas-quentes do globo (SCHRIRE et al., 2005). Entre esses gêneros está a Mimosa, onde Lewis (2006) referiu 104 táxons de Mimosa para o Nordeste e Queiroz (2009) no trabalho “Leguminosas da Caatinga” cita 23 gêneros e 99 espécies de Mimosoideae para a caatinga.

O gênero Mimosa constitui um tema relevante para estudo por apresentar muitos problemas taxonômicos a serem resolvidos. Isto ocorre devido a sua complexidade, resultante da grande diversidade morfológica, relacionada à ampla distribuição geográfica e aos diferentes tipos de habitat em que ocorre, além do seu elevado número de táxons (SALES; SILVA, 2008). Em se tratando de espécies muito parecidas não é suficiente o reconhecimento da espécie por caracteres visíveis apenas sob o auxílio de lupa (10x), sendo necessária a utilização de caracteres anatômicos como da madeira (SILVA et al., 2011). Mede de 3 a 6 m, apresenta casca fina, praticamente lisa e de coloração cinza amarronzada com lenticelas amareladas, de caule rugoso com espinhos retos, folhas bipinadas com dois a quatro pares de pinas e 15 a 22 pares de folíolos por pina e são quebradiças.

Possui inflorescência espiciforme, solitária, axilar em forma de espiga, flores brancas a creme e antera oblonga. Os frutos secos do tipo craspédio, possuindo de cinco a oito sementes, ovóides, plano-compressas, marrons e de acordo com Brito et al. (2014) apresenta dormência tegumentar. Floresce em janeiro e abril, e frutifica em fevereiro e em maio. Pode ser usada como forrageira e algumas partes são consumidas por cabras, ovelhas e bovinos, a madeira é utilizada como lenha e estacas, a resina é comestível, saborosa, e utilizada no combate a gripe (SILVA et al., 2011; COSTA et al., 2002).

M. ophthalmocentra é frequentemente confundida com *Mimosa. arenosa* (Willd.) Poir. e principalmente com a *Mimosa. tenuiflora* (Willd.) Poir (SALES; SILVA, 2008), diferindo da última através do tipo de casca, coloração do cerne e do albúrnio, além das características peculiares da madeira. *M. ophthalmocentra* apresenta camadas de crescimento distintas, constituídas por linhas de parênquima axial contendo cristais, parênquima axial escasso e menor quantidade de raios por mm². Já a *Mimosa tenuiflora* apresenta camadas de crescimento distintas, porém sem cristais, parênquima axial vasicêntrico, em faixas ou aliforme conflúente, e maior percentagem de raios (SILVA et al., 2011).

Além dessas características da madeira, a *M. tenuiflora* se diferencia por apresentar cálice com 4-costelas proeminentes e encurvadas, cerca de 10–12 pinas (4–6 em *M. ophthalmocentra*) e, especialmente, glândulas translúcidas nos folíolos, sendo assim distinta da *M. ophthalmocentra*. Entretanto compartilha o hábito arbustivo, presença de acúleos e inflorescências espiciformes com a mesma (SILVA; SALES, 2007).

É uma espécie de elevado potencial madeireiro para o nordeste (FIGUEIROA et al., 2005). Apresenta perspectivas seguras para a produção de álcool combustível e carvão vegetal desde a fase de lenho juvenil, seu potencial energético, é devido a maior percentagem de fibras e por possuir parênquima escasso e menor percentagem de raios (SILVA et al., 2011), o que ocasiona sua retirada excessiva e desorganizada proporcionando grandes impactos ambientais.

Assim é de grande relevância, proporcionar outras fontes de recursos visando a implantação de outros sistemas que evitem a retirada de espécies nativas como única opção para a produção agrícola, principalmente quando se trata da *M. ophthalmocentra*, por ser considerada pioneira, sendo de suma importância para o processo de regeneração natural dos ambientes, proporcionando equilíbrio biológico para a recuperação deste Bioma (SILVA, 2015).

Desta forma, alguns estudos demonstram que a *M. ophthalmocentra* é uma das espécies de maior grau de densidade no Bioma Caatinga, sendo de grande importância em estudos que procurem compreender seu comportamento na vegetação, como também adquirir informações que venha dar suporte a possíveis decisões sobre a espécie (MARANGON et al., 2013). No entanto, a falta de conhecimento dos principais processos básicos da germinação que ocorrem nas sementes de espécies nativas tem dificultado a realização das metas dos programas de reflorestamento, devido às dificuldades encontradas durante o processo de produção de mudas em viveiro ou laboratório (COUTO et al., 2004).

2.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

O cultivo de plantas *in vitro* ou cultura de tecidos vegetais pode ser definido como uma técnica com grande aplicação na agricultura, onde pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes (partes isoladas de uma planta, tais como células, tecidos, órgãos ou protoplastos), são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. Trata-se de uma área da biotecnologia que compreende vários métodos de propagação vegetal em laboratório, amplamente utilizada como ferramenta para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis, tais como resistência a pragas e acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial (LAKSHMANAN et al., 2005).

A cultura de tecidos vegetais está baseada no mesmo princípio da propagação vegetativa, que tem sua base fisiológica apoiada na teoria da totipotência vegetal, fenômeno representado pela capacidade potencial de células ou tecidos vegetais manifestarem, em momentos diferentes e sob estímulos apropriados, a potencialidade de formarem todos os tipos de células e/ou regenerar plantas inteiras (TORRES et al., 2000). A teoria da totipotencialidade foi proposta por Schleiden, em 1838, e Schwann, em 1839, conforme descreve Gautheret (1983), citado por Torres, Caldas, Ferreira (1998).

Dessa forma, a propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação vem sendo aplicada de maneira mais prática e com maior impacto, tendo como principal objetivo a aceleração dos métodos convencionais de propagação vegetativa, e obter nova planta idêntica a original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos de modo a obter novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico aquele do ancestral comum (DONATO et al., 2005; LIMA; MORAES, 2006; XIAO et al., 2011; TORRES et al., 2000).

As principais aplicações da cultura de tecidos vegetais estão relacionadas à conservação de germoplasma asséptico, multiplicação de genótipos superiores, cultura de embriões, intercâmbio de germoplasma, germinação de sementes, aceleração de programas de melhoramento e estabilidade genética ou aumento da variabilidade (FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998).

A obtenção de plantas, a partir das técnicas de cultura de tecidos, vem se tornando uma realidade para a maioria das espécies conhecidas e de importância ecológicas, econômica e medicinal, pois nesse tipo de propagação, podem ser controladas as condições físicas,

químicas e biológicas envolvidas no processo de cultivo (ALENCAR, 1999). Plantas micropropagadas, quando comparadas às plantas oriundas de propagação convencional, geralmente sobrevivem mais no campo, crescem mais rapidamente nos primeiros estádios de desenvolvimento, possuem maior precocidade, florescendo até quatro meses antes, além de apresentarem uniformidade de produção, proporcionando colheitas superiores (ALVARES; CALDAS, 2002).

As principais vantagens das plantas propagadas *in vitro* (microplantas) são: a rapidez com que se obtém um grande número de mudas em instalações reduzidas e a obtenção de plantas livres de doenças e pragas, o que reduz a dispersão de organismos fitoparasitas (ALVARES; CALDAS, 2002; BARROW; OSUNA-AVILA; REYES-VERA, 2004; LIMA; MORAES, 2006). Entretanto, este tipo de propagação possui dois problemas principais: é uma técnica cara, e a diversidade genética é reduzida, quando se faz o uso desta técnica na propagação vegetativa (ROJAS-ARÉCHIGA; VÁSQUEZ-YANES, 2000).

Embora existam protocolos variados de cultura de tecidos, faz-se necessário avaliar a qualidade do sistema comercial de micropropagação, uma vez que esta é influenciada por diversos fatores como taxa de multiplicação, altura das plantas, presença e intensidade de estiolamento, forma, coloração e tamanho das folhas, formação de calos, desenvolvimento de raízes, perdas por contaminação microbiana, oxidação e eficiência da aclimatização (LIMA; MORAES, 2006; XIAO et al., 2011). Por essa razão, há um grande requerimento de cuidados que vão desde o estabelecimento destas plantas *in vitro* até a manutenção destas, durante os meses de desenvolvimento (NISHIMURA et al., 2002). Dessa forma, o aprimoramento constante dos processos de multiplicação e o controle de qualidade das mudas, aliado à redução de custos, têm sido essenciais para aceitação dessa técnica no mercado (NIETSCHKE et al., 2006; DIAZ et al., 2009).

Assim, a micropropagação se tornou a saída para o cultivo de muitas plantas que possuem limitações na propagação sexuada, além da alta taxa de multiplicação e qualidade em comparação aos métodos tradicionais (LIMA; MORAES, 2006; NIETSCHKE et al., 2006). Um exemplo de sucesso da aplicação da técnica pode-se observar no trabalho de Normah et al. (1997), no qual a espécie ameaçada de extinção na Malásia, *Citrus halimii*, foi multiplicada em grande escala *in vitro* e estocada em banco de germoplasma.

2.2.1 Germinação *in vitro*

A germinação de sementes estimada em testes de laboratório é a emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião (raiz, hipocótilo e epicótilo),

demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo (BRASIL, 1992).

Para Popinigis (1977), a qualidade fisiológica da semente é a sua capacidade de desempenhar funções vitais, que são caracterizadas pela sua germinação, seu vigor e sua longevidade. De acordo com o mesmo autor, os resultados do teste de germinação são de grande importância para a comparação entre lotes de sementes para fins de comercialização, e para o cálculo da densidade de semeadura.

Segundo Silva (1989) as sementes podem ser materiais convenientes para o trabalho de cultura de tecido. Após lavagem e esterilização de sua superfície, elas podem se desenvolver em meio nutritivo e dar origem diretamente a cultura de calo, ou germinarem em meio simples, sem reguladores de crescimento, produzindo plântulas livres de contaminantes, que poderão então ser seccionadas sob condições assépticas e usadas como explantes.

No trabalho de Oliveira et al. (2007), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., conhecida como sabiá, foi germinada *in vitro* em meio de cultura contendo mio-inositol, ácido ascórbico, 15% de água de coco e solidificado com Agar, e após a germinação utilizada como explante. O mesmo foi feito no trabalho de Costa et al., (2010) onde sementes de *Erythrina velutina* Willd., foram inoculadas em meio de cultura básico sem a presença de reguladores e posteriormente a germinação foram utilizadas como explante.

Do ponto de vista prático, esta técnica permite estudar detalhadamente as necessidades nutricionais e físicas para o pleno desenvolvimento dos embriões cultivados *in vitro*, superar dormência e testar a viabilidade de sementes (CARVALHO et al., 1998), além de poder ser usada para fins de micropropagação. Por sua natureza juvenil com alto potencial regenerativo, embriões são excelentes explantes para propagação clonal *in vitro* (HU; FERREIRA, 1998).

A partir da germinação *in vitro* é possível alcançar altas taxas de multiplicação, independente de condições climáticas, variações estacionais e de fatores bióticos, tais como agentes polinizadores, dispersores ou patogênicos (ANDRADE et al., 2000). A germinação *in vitro* comparada à germinação em condições naturais apresenta como vantagens: evitar problemas de aborto embrionário, reduzir o tempo necessário à ocorrência do processo, aumentar a taxa de germinação, além de sincronizá-la (ENCINA; PADILLA, 1996).

Se sementes de uma mesma espécie apresentam germinabilidade semelhante, não quer dizer que ambas apresentem o mesmo comportamento, pois o início da germinação e a distribuição da mesma podem ser diferentes, apresentando maior ou menor rapidez (BORGHETTI; FERREIRA, 2004). Os testes mais simples para determinação de vigor são os de velocidade de desenvolvimento, os mais utilizados são o tempo médio de germinação e o

índice de velocidade de germinação e se baseiam no pressuposto de que sementes mais vigorosas germinarão mais rapidamente do que outras em condições inferiores distinguindo as sementes de um mesmo lote (VIEIRA; CARVALHO, 1994; PIÑA-RODRIGUES et. al., 2004).

Os testes de germinação *in vitro* tem auxiliado os programas de melhoramento genético oferecendo soluções originais que podem resultar na otimização do tempo e na qualidade dos cultivares a serem lançados por esses programas (ANDRADE, 2002). Porém os pesquisadores têm encontrado dificuldades em estabelecer procedimentos para a propagação *in vitro* da *M. ophthalmocentra*, considerando-se, em parte, a escassez de trabalhos publicados nessa linha de pesquisa sobre a espécie.

2.3 DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES

Segundo Popinigis (1985), a semente promove o sucesso ou fracasso da produção, visto que ela carrega todo potencial genético produtivo da planta. E de modo geral, as sementes são um dos agentes mais eficazes na disseminação de doenças em plantas, sendo causadas por vírus, bactérias, nematóides e fungos que, por sua vez, apresentam maior representatividade quando comparado aos demais patógenos associados às sementes (BRASIL, 2009). Assim, a contaminação, em cultura de tecidos, é provocada pela entrada destes contaminantes biológicos no meio de cultura, os quais são provenientes do explante ou do ambiente, no processo de manuseio de materiais, tanto vegetal quanto de instrumentos usados na manipulação.

Para evitar ou ao menos reduzir a perda de materiais em função da contaminação, diversos métodos de esterilização são empregados, assim como cuidados na assepsia dos ambientes de manuseio e de incubação dos cultivos (BERTONCELLI; HASSE; OLIVEIRA, 2009).

As espécies lenhosas apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente se for utilizado material vegetal proveniente de plantas adultas oriundas do campo, pois podem apresentar infestação interna ou externa por microrganismos. No entanto, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de microrganismos, que podem tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro*. Por isso, a utilização de plântulas germinadas *in vitro*, em condições assépticas, torna-se mais vantajosa (SKIRVIN, 1981; MEDEIROS, 1999).

A infestação superficial da semente por microrganismos está mais sujeita à ação de alguns fatores externos, os quais podem reduzir as chances de sua transmissão à progênie, utilizando o tratamento com agentes desinfestantes (TEIXEIRA; MACHADO; VIEIRA, 1997). Este procedimento consiste na eliminação de organismos presentes na superfície do explante e é feito pela imersão deste em soluções desinfestantes (HARTMANN et al., 2002). Porém, a obtenção de plântulas assépticas pela desinfestação de sementes é uma etapa problemática, pois o agente desinfestante utilizado na assepsia do material vegetal deve eliminar os microorganismos de superfície, sem, contudo, danificar os tecidos (BONGA; DURZAN, 1985).

Diversas substâncias com ação germicida são utilizadas para a assepsia de explantes como o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônico, e o peróxido de hidrogênio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), sendo o etanol e os compostos à base de cloro as substâncias com ação germicidas mais utilizadas neste processo. O hipoclorito de sódio ou de cálcio vem mostrando grande eficiência na desinfestação de sementes, eliminando fungos e bactérias, assim como a utilização de fungicidas e bactericidas, promovendo aumento no total de plântulas germinadas a partir de sementes tratadas (COUTO et al., 2004; SOUSA et al., 1999).

Durante o processo de descontaminação, a água sanitária comercial, considerada fonte de hipoclorito de sódio (NaOCl) é utilizada por muitos laboratórios em várias concentrações (WILLADINO; CÂMARA, 2007). O cloro ativo também é bastante utilizado, nas concentrações de 0,5% a 2% e tempo de exposição de 10 a 20 minutos (FAIAD et al., 1997). Já segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) é recomendado a assepsia superficial com hipoclorito de sódio (NaOCl), na concentração de 1%, por três minutos. Entretanto, a ISTA (1976), recomenda esse tratamento por 10 minutos, na mesma concentração. O etanol geralmente é utilizado pela sua ação germicida, surfactante e de dissolução das gorduras, podendo auxiliar a ação dos outros produtos. Geralmente é utilizado nas concentrações de 70% e 80%, com tempo de exposição dos tecidos variando de alguns segundos a minutos, uma vez que acima desta concentração é menos eficiente e pode desidratar rapidamente os tecidos (PASQUAL, 2001). Além destas, podem ser utilizados os tensoativos, que podem ser aplicados na solução desinfestante, com a finalidade de facilitar o contato dos agentes esterilizantes com o tecido, reduzindo a tensão superficial. O tensoativo deve ser adicionado em teor muito baixo, enquanto a concentração dos agentes desinfestantes e o tempo de exposição pode variar, de acordo com a espécie e o objetivo do trabalho, sendo

necessário, então a sua adequação de acordo com a sensibilidade do tecido a ser desinfestado. (WILLADINO; CÂMARA, 2007).

Foi observado, na literatura, que a assepsia superficial vem sendo utilizada em muitos estudos, porém, existe grande variabilidade quanto ao agente químico, à concentração da solução e o tempo de exposição. Diante dessa situação e da inexistência de consenso sobre esse assunto, o presente estudo teve como um dos objetivos avaliar o efeito de diferentes agentes químicos em diferentes concentrações e tempo de imersão para assepsia eficiente nos microrganismos infestantes em sementes de *M. ophthalmocentra*.

Lopes et al. (1991) e Castellani et al. (1996), observaram que os danos originados pela infestação nas sementes podem afetar, de forma severa, sua qualidade fisiológica e a qualidade sanitária, e alguns casos, inibindo por completo ou reduzindo a capacidade germinativa do lote de sementes. De acordo com Custódio et al. (1995), muitas vezes, a contaminação impede o real conhecimento da qualidade da semente.

No trabalho de Couto et al. (2004), foi observado que durante o período da germinação, as sementes contaminadas por fungos e bactérias não foram capazes de germinar. Esse resultado concorda com os de Corder e Borges Júnior (1999), que, ao germinarem sementes de *Acácia mearnsii* em condições *in vitro*, observaram que a presença de fungos e bactérias nas sementes foi o fator principal da ausência de germinação. Isso se dar pelo fato de que agentes contaminantes (fungos e bactérias) agem de forma indireta, comprometendo o desenvolvimento normal dos cultivos pela competição por nutrientes e vitaminas do meio de cultura e pela produção de metabólitos fitotóxicos, como os ácidos láctico e acético e o cianeto (LIMA; MORAES, 2006).

2.4 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA GERMINAÇÃO

Para o sucesso no cultivo *in vitro* é importante conhecer os requerimentos nutricionais das células e tecidos em cultura, portanto, um dos fatores que exercem influência no sucesso desta técnica é o meio de cultura onde os explantes são cultivados. Os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas, quanto aos nutrientes, para seu crescimento, com algumas modificações para atender às necessidades específicas das condições *in vitro* (SOUZA; JUNGHANS, 2006).

A composição dos meios de cultura varia de acordo com as espécies e as diferentes etapas do processo, entretanto, a fim de atender necessidades específicas, algumas modificações podem ser realizadas. Os meios de cultura são constituídos basicamente por

água, que é o componente utilizado em maior quantidade na preparação, deve ser destilada e deionizada, por se tratar de uma fonte de impurezas que pode influenciar no desenvolvimento do explante. Também são constituídos por sais inorgânicos que proveem os micronutrientes (cálcio, magnésio, potássio, nitrogênio, nitrato, fósforo, enxofre, sódio) e os micronutrientes (zinco, ferro, cobre, manganês, cloro, molibdênio e boro), por uma fonte de energia (geralmente sacarose), algum suplemento vitamínico, um suporte semi-sólido (ágar ou outro produto) e componentes opcionais como complexas substâncias naturais. (HARTMANN et al., 2002; ROJAS; GARCIA; ALARCON, 2004).

Existem várias formulações de meios nutritivos com formulações específicas como o B5 (GAMBORD; MILLER; OJIMA, 1968), o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), as quais apresentam altas concentrações de sais, sobretudo os íons nitrato e amônia, quando comparados a outras formulações salinas e meios com menores concentrações de sais, em especial nitrogênio e potássio, como o meio de cultura WPM, Wood Plant Medium (LLOYD; MCCOWN, 1981) este é utilizado geralmente em espécies lenhosas quando o meio MS não se mostrar eficiente (ROCHA, 2005).

A diminuição de sais nos meios de cultura é uma tendência mundial, e muitas pesquisas estão sendo realizadas com esta finalidade. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS, suas modificações e diluições têm apresentado bons resultados para as diversas espécies (CHAVES; SCHUCH; ERIG, 2005).

A máxima germinação *in vitro* de sementes de *Mimosa scabrella* Benth (bracatinga) foi observada na concentração de sais $\frac{1}{4}$ MS, que, em conjunto com $\frac{1}{8}$ MS, forneceu mais água para promover esse processo (ROSA, 2009). Ainda segundo o autor a partir de $\frac{1}{2}$ MS, iniciou-se um decréscimo na germinação, atingindo o valor mínimo no meio MS, com concentração básica de sais. O emprego da concentração básica dos sais, do meio MS, juntamente com a sacarose, pode ter afetado o balanço osmótico, prejudicando o processo germinativo. Em contrapartida segundo Nogueira et al. (2004), O meio MS utilizado com a metade das concentrações de sais e na presença de sacarose acarretou um aumento na taxa de germinação de sementes de *Byrsonima intermedia*. A redução da concentração dos sais parece ter compensado a adição de sacarose, não afetando, assim, o balanço osmótico e sendo favorável à germinação.

Os meios nutritivos podem ser utilizados na forma líquida ou semi-sólida (QUISEN; ANGELO, 2008). A escolha do substrato (suporte) é de suma importância para a eficiência do processo germinativo, pois ele irá dar consistência e/ou suporte ao explante evitando que fiquem submersos no meio de cultura e, para isto, deve-se levar em consideração o tamanho

da semente, a exigência desta em quantidade de água, sua sensibilidade ou não à luz, além da facilidade que o substrato oferece para a realização das contagens e avaliação das plântulas (BRASIL, 2009). Além disso, as características físicas e químicas de cada substrato como aeração, estrutura, capacidade de retenção de água, entre outros podem favorecer ou prejudicar a germinação das sementes e são de grande importância (POPINIGIS, 1985).

Grattapaglia e Machado (1998), afirmam que determinadas espécies vegetais podem alcançar índices elevados de germinação na ausência de nutrientes, o que é interessante do ponto de vista de diminuição do custo de produção de mudas obtidas via cultura de tecidos. Sendo assim, necessário apenas a utilização de um substrato para dar suporte a semente. Assim, o termo substrato aplica-se a todo material sólido, natural, sintético, residual, mineral ou orgânico, distinto do solo, que colocado em um recipiente, em forma pura ou em mistura, permite o desenvolvimento do sistema radicular, desempenhando, portanto, um papel de suporte para a planta (CAVALCANTE, 2011).

Existem vários tipos de substratos alternativos utilizados na cultura de tecidos vegetais a fim de minimizar os custos com a germinação *in vitro*, como a vermiculita, areia, suportes de espuma de plástico, fibras de plantas diversas, amido, folhas de papel filtro, algodão hidrófilo e o água-ágar. Deve-se considerar, porém, que esses substratos precisam ser capazes de oferecer as condições necessárias para que se inicie o processo germinativo.

Os agentes gelificantes são os mais utilizados, ele forma com a água um gel que funde a 100°C e que solidifica por volta dos 45°C, não é hidrolisada por enzimas e, aparentemente, não reage com o resto de ingredientes do meio. O ágar-ágar é um tipo de agente gelificante, é de natureza polissacarídica produzido por algas marinhas (*Gelidium amansii*), de alto peso molecular usado na cultura de tecidos para dar suporte a explantes e a plantas mantidas *in vitro*. Oferece a vantagem de ser solúvel em água, e de permanecer semissólido a temperatura ambiente (SCHOLTEN; PIERIK, 1998).

No trabalho de Golle et al., (2009) foi avaliado a germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. (pinheiro-amarelo) inoculadas em papel filtro, algodão hidrófilo e meio ágar-ágar. Os melhores percentuais de germinação foram obtidos com papel filtro e ágar-ágar. Contudo, este último apresentou as maiores taxas de contaminação, e devido à perda de água no substrato papel filtro no decorrer do tempo, recomenda-se o uso de algodão hidrófilo em função dos baixos índices de contaminação observados. Araujo et al., (2014) obteve sementes germinadas utilizando papel toalha tipo *germitest* como substrato na germinação de *Macroptiliummartii* Benth. (orelha-de-onça). O mesmo foi feito no trabalho de Gutiérrez et al., (2011) com sementes de *Bauhinia cheilantha* (pata-de-vaca).

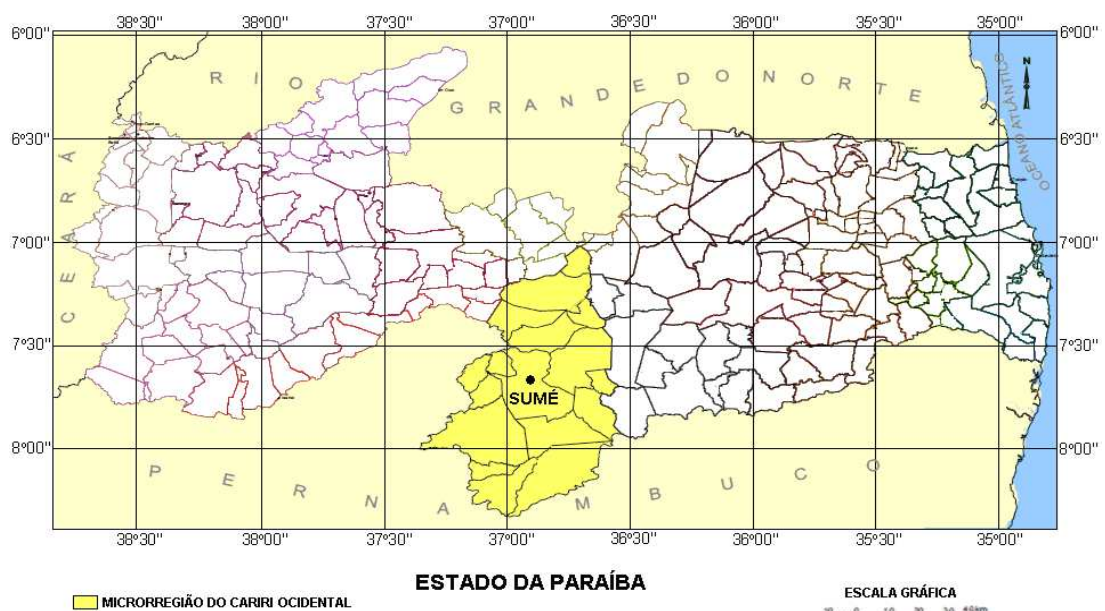
Os meios nutritivos e a sua composição operam o “milagre” da vida, ou seja, a conversão dos explantes em plântulas e das plântulas em Mudanças, as quais tem o caráter clonal embutido em sua natureza e, por isso, possuem caráter de genótipo superior. São muitos os fatores que estão envolvidos em um protocolo eficiente de regeneração: tipo de meio básico de cultura, seguindo do suplemento de reguladores de crescimento, concentração de sacarose, iluminação, explante, etc. (ZHANG et al., 2003). Se o meio nutritivo falhar, ou não for adequada em virtude de alguns de seus ingredientes, a obtenção de clones falha. Portanto, o conhecimento a respeito do meio nutritivo é de máxima importância.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande (CDSA-UFCG), campus Sumé. Para a realização deste trabalho foram utilizadas sementes de jurema de imbirá (*M. ophthalmocentra*) coletadas, no mês de abril, do ano de 2016, no sítio Lagoa da Cruz do município de Sumé, PB, na microrregião do cariri ocidental (Figura 1).

Figura 1: Localização do município de Sumé na microrregião do Cariri Ocidental, Semiárido paraibano.



Fonte: LACERDA et al. (2015)

Foram selecionados e marcados, 10 indivíduos arbóreos, esses possuíam boas condições fitossanitárias (ausência aparente de doenças e infestações de parasitas). Quando os frutos estavam no ponto de maturidade fisiológica, estes foram colhidos e levados para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, onde as sementes foram retiradas e selecionadas, deixando aquelas que apresentavam boas características físicas no tegumento.

3.2 Desinfestação das Sementes

Para avaliar o efeito dos agentes desinfestantes no processo germinativo das sementes de *M. ophthalmocentra*, foram utilizados os seguintes tratamentos: (T1) Sementes inoculadas diretamente no meio, sem tratamento para desinfestação; (T2) Imersão por 10 minutos em álcool 70%, e 10 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 2,0% acrescida de três gotas de tensoativo (detergente comercial); (T3) Imersão por 10 minutos em álcool 70%, e 30 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% acrescida de três gotas de tensoativo (detergente comercial); (T4) Imersão por 20 minutos em álcool 99,3%, e 20 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 1,0% acrescida de três gotas de tensoativo (detergente comercial); e (T5) Imersão por 20 minutos em álcool 99,3%, e 40 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% acrescida de três gotas de tensoativo (detergente comercial). Em cada tratamento as sementes foram submetidas a dois substratos: agente gelificante ágar-água e papel tipo germitest.

Antes do processo de desinfestação, as sementes foram lavadas com água destilada e autoclavada. Foram utilizados frascos estéreis de 400 mL contendo 150 mL do agente desinfestante, assim as sementes permaneceram nos frascos conforme o tempo estipulado em cada tratamento. Primeiramente as sementes foram imersas a solução de álcool e logo após nas soluções de hipoclorito de sódio, acrescida de três gotas de tensoativo (detergente comercial).

As concentrações de hipoclorito de sódio foram obtidas a partir da diluição de NaOCl a 2,0% de cloro ativo. Após a desinfestação, as sementes foram submetidas a três enxágues sucessivos com água destilada estéril. Posteriormente estas foram sujeitadas ao desponte (Figura 2) para superação da dormência e em seguida inoculadas.

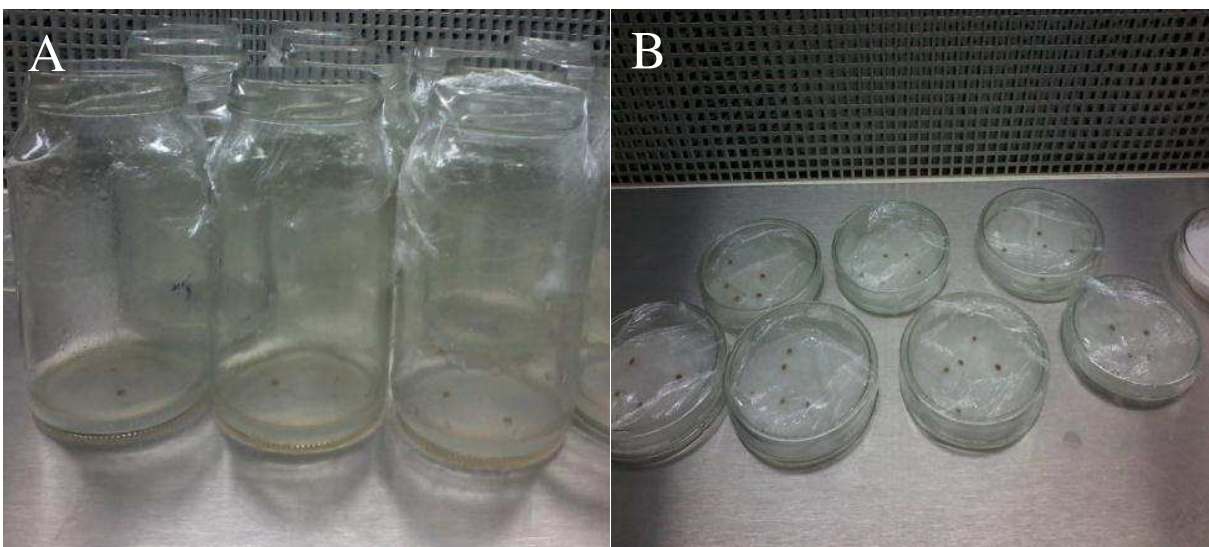
Figura 2: (A) e (B) Processo de desponte da semente de *M. ophthalmocentra*.



Fonte: Acervo da pesquisa

Foram utilizadas 200 sementes, em cada substrato (ágar-água e papel germitest), totalizando 400 sementes que foram distribuídas em 100 frascos de vidro e 40 placas de petri. A unidade experimental foi composta por um frasco com capacidades para 400 mL contendo 25 mL de substrato ágar-água com duas sementes (unidades amostrais), e por uma placa de petri contendo papel germitest umedecido com 2,5 mL de água, e cinco sementes (unidades amostrais) (Figura 3).

Figura 3: (A) Sementes de *M. ophthalmocentra* inoculadas no substrato ágar-água e (B) Sementes de *M. ophthalmocentra* inoculadas no substrato papel germitest.



Fonte: Acervo da pesquisa

Os frascos e placas contendo os substratos utilizados foram previamente autoclavados durante 20 minutos, sob temperatura de $121^{\circ}\text{C} \pm 3$ e 1,5 Atm de pressão. Antes da autoclavagem ajustou-se o pH do ágar-água para $\pm 5,8$ e os frascos e placas contendo os substratos foram fechados com papel alumínio e vedados com plástico filme (Figura 4.A). Todos os processos de desinfestação, corte da semente e inoculação, foi realizado em câmara de fluxo laminar (Figura 4.B) com todos os materiais autoclavados e com as devidas precauções de assepsia.

Figura 4: (A) Frascos e placas contendo os substratos ágar-água e papel germitest respectivamente. (B) Câmara de fluxo laminar contendo os materiais estéreis para realizações de todos os procedimentos de assepsia.



Fonte: Acervo da pesquisa

As unidades amostrais foram mantidos em B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas dia, com intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes brancas frias durante quinze dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

Porcentagem de Germinação: As contagens de plântulas normais foram realizadas diariamente, considerando normais aquelas plântulas que apresentarem características condizentes com as prescritas pelas R.A.S. (BRASIL, 2009). A contagem começou com dois dias após a inoculação das sementes.

Índice de velocidade de germinação (IVG): Determinado em conjunto com o teste de germinação, computando-se diariamente o número de sementes germinadas até que esse permaneça constante.

Primeira contagem de germinação: O teste de primeira contagem foi realizado em conjunto com o de germinação, onde foi computada a porcentagem de plântulas que apresentem a raiz primária com comprimento ≥ 2 cm e, as primeiras folhas cotiledonares emersas, respectivamente.

Porcentagem de contaminação fúngica: foi realizada diariamente, contabilizando as amostras contaminadas.

3.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 10 unidades amostrais (sementes), em esquema fatorial 5x2 (agente desinfestante x substratos). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste F para comparação dos quadrados médios e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (efeitos qualitativos). Nas análises estatísticas foi empregado o programa software SISVAR, desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras (MG).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

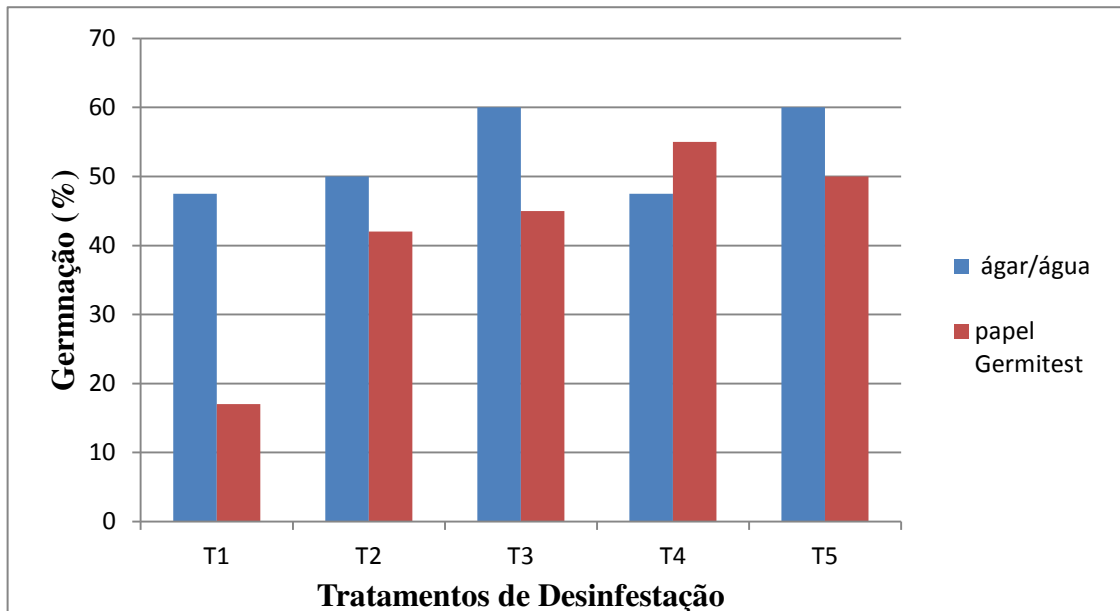
Observa-se na Figura 5 a germinação de sementes de *M. ophthalmocentra* em dois tipos de substratos e em diferentes concentrações de desinfestantes. Assim, constata-se que houve diferença na utilização dos diferentes substratos na maioria dos tratamentos utilizados, pois os maiores percentuais de germinação ocorreram quando as sementes foram submetidas ao substrato ágar-água, exceto para o tratamento T4 (imersão por 20 minutos em álcool 99,3%, e 20 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 1,0% acrescida de três gotas de tensoativo), onde os maiores valores ocorreu quando as sementes foram submetidas ao substrato papel germitest.

Esses resultados indicam que o substrato ágar-água proporcionou um melhor suprimento hídrico, permitindo que as sementes estivessem em melhores condições para iniciar o processo germinativo. Assim a utilização do ágar pode ser considerado um bom substrato, mantendo a umidade por mais tempo em comparação ao papel germitest, que perde rapidamente o teor de água. Isso deve ao fato das diferenças quanto ao suprimento hídrico fornecido pelos diferentes substratos.

Verifica-se ainda, que as diferentes concentrações e tempo de exposição dos agentes desinfestantes não inibiu a germinação das sementes de *M. ophthalmocentra*, pois os maiores

valores (60%) foram encontrados no tratamento T5 (imersão por 20 minutos em álcool 99,3%, e 40 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% acrescida de três gotas de tensoativo) e T3 (imersão por 10 minutos em álcool 70%, e 30 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% acrescida de três gotas de tensoativo). Rocha (2005) afirma que tratamentos com maior tempo de exposição da semente ao hipoclorito de sódio, pode resultar em modificações nas propriedades das membranas celulares do tegumento, por ser considerado um potente oxidante ou no fornecimento de oxigênio adicional para a semente, aumentando, dessa forma, a porcentagem de germinação.

Figura 5: Percentual de germinação *in vitro* de sementes de *M. ophthalmocentra* nos substratos ágar-água e papel germitest, em função dos tratamentos de desinfestação.



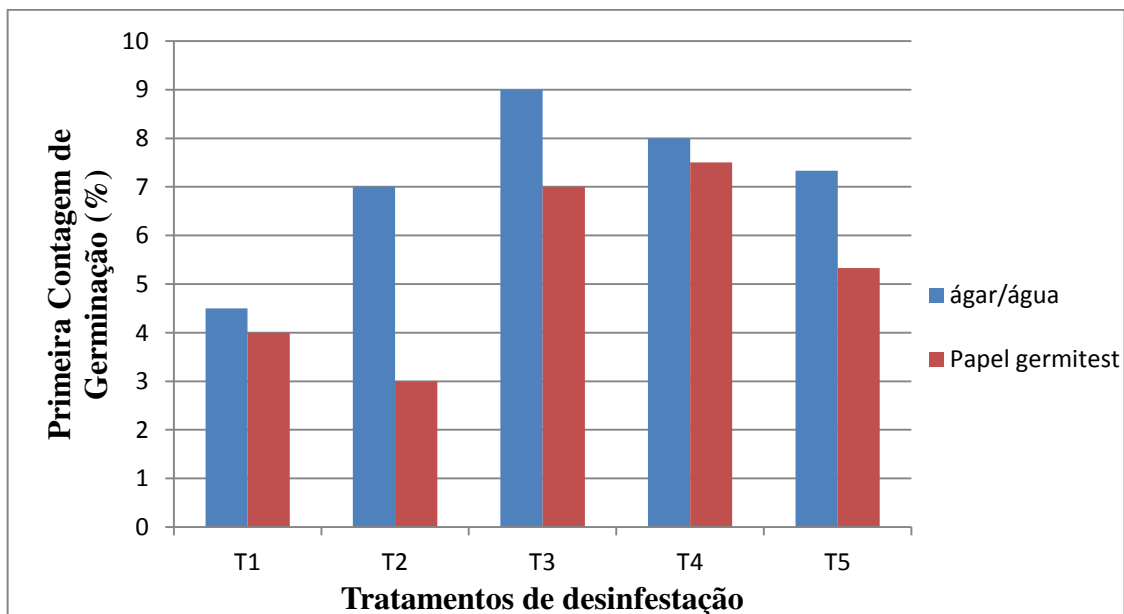
Fonte: Dados da pesquisa

Os dados referentes à primeira contagem de germinação encontram-se na figura 6, onde verifica-se que os diferentes substratos utilizados diferiram quando as sementes foram submetidas ao tratamento T2 (imersão por 10 minutos em álcool 70%, e 10 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 2,0% acrescida de três gotas de tensoativo), obtendo o percentual de primeira contagem maior no substrato ágar-água com 7%, enquanto no substrato papel germitest foi obtido 3%. Assim provavelmente o substrato papel germitest não apresenta condições favoráveis para que a semente iniciasse rapidamente a sua germinação quando elas são submetidas a esse tratamento.

Observa-se também que os diferentes tratamentos de desinfestação e tempo de exposição não impediram que a semente iniciasse o seu processo germinativo, uma vez que no segundo dia após a instalação do experimento as sementes já estavam germinando. Desta maneira, verifica que o tratamento T3 (imersão por 10 minutos em álcool 70%, e 30 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% acrescida de três gotas de tensoativo), proporcionou o maior percentual de primeira contagem (9%) em substrato ágar-água. Por isto, provavelmente para esta espécie, o substrato ágar-água proporcionou as melhores condições para que a semente iniciasse rapidamente a sua germinação.

Diante disso, constata-se que a utilização do álcool e o hipoclorito de sódio, acelerou o processo de superação da dormência das sementes, permitindo que estas germinassem rapidamente. O que não aconteceu quando as sementes foram submetidas ao tratamento T1 (sementes inoculadas diretamente no meio, sem tratamento para desinfestação), proporcionando os menores resultados.

Figura 6: Porcentagem de primeira contagem de germinação *in vitro* de sementes de *M. ophthalmocentra* nos substratos ágar-água e papel germitest, em função de diferentes tratamentos de desinfestação.



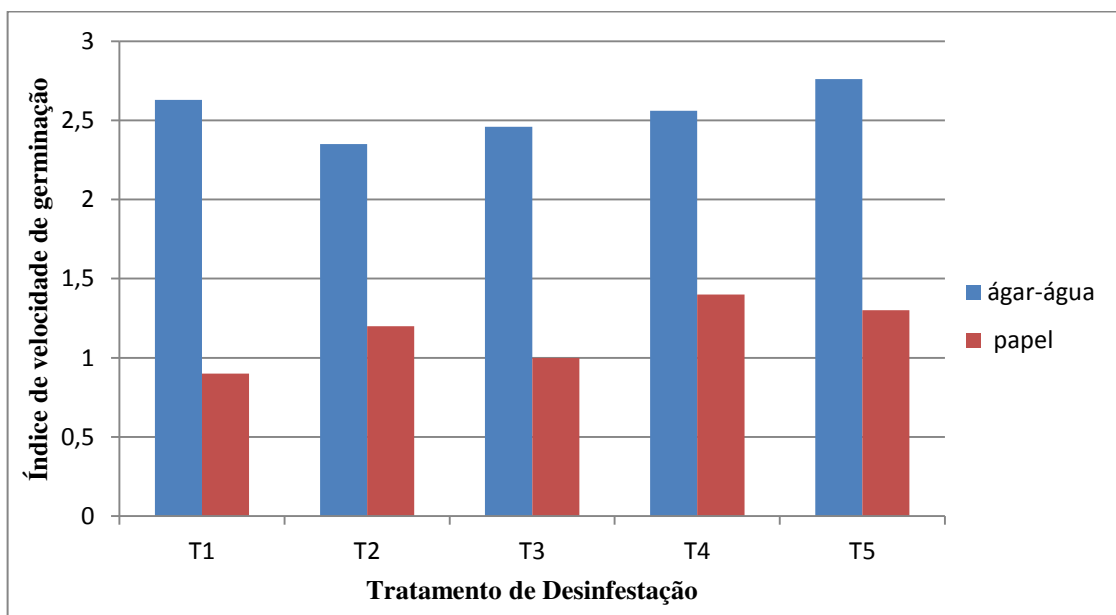
Fonte: Dados da pesquisa.

A barreira mecânica encontrada em *M. ophthalmocentra* permite o prolongamento do tempo de vida das sementes aumentando as chances destas sementes encontrarem condições para o estabelecimento de plântulas em condições naturais, mas não é vantajoso quando se deseja maior homogeneidade da emergência, em processos de utilização das sementes em grande escala (ROLSTON, 1978).

Na figura 7 encontram-se os resultados do índice de velocidade de germinação, onde comprovou que o substrato ágar-água apresentou os melhores resultados em todos os tratamentos de desinfestação, obtendo os maiores valores de velocidade de germinação no tratamento T5 (imersão por 20 minutos em álcool 99,3%, e 40 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% acrescida de três gotas de tensoativo) com 2,8%, seguido de T1 (sementes inoculadas diretamente no meio, sem tratamento para desinfestação) com 2,7%. Assim, constata-se que quando as sementes são submetidas ao ágar aumenta a área de contato da semente com o substrato, permitindo uma maior velocidade de absorção de água, promovendo um maior aumento na velocidade de germinação.

Pereira et al., (2011) ao analisar a variável índice de velocidade de germinação em sementes de *Pitcairnia flammaea*, obteve resultados demonstrando que o meio M2 (ágar- água + 1 g L-1 de carvão ativado) apresentou o melhor resultado, apesar de não diferir estatisticamente do meio M1 (ágar-água). Resultado oposto foi identificado no trabalho de Pedroso et al., (2007), onde não houve nenhuma diferença significativa nos índices de velocidade de germinação das sementes de *Sida rhombifolia* L entre os substratos papel de filtro e meio ágar-água.

Figura 7: Índice de velocidade de germinação de sementes de *M. ophthalmocentra* em substrato ágar-água e papel tipo germitest, em função dos diferentes tratamentos de desinfestação.



Fonte: Dados da pesquisa

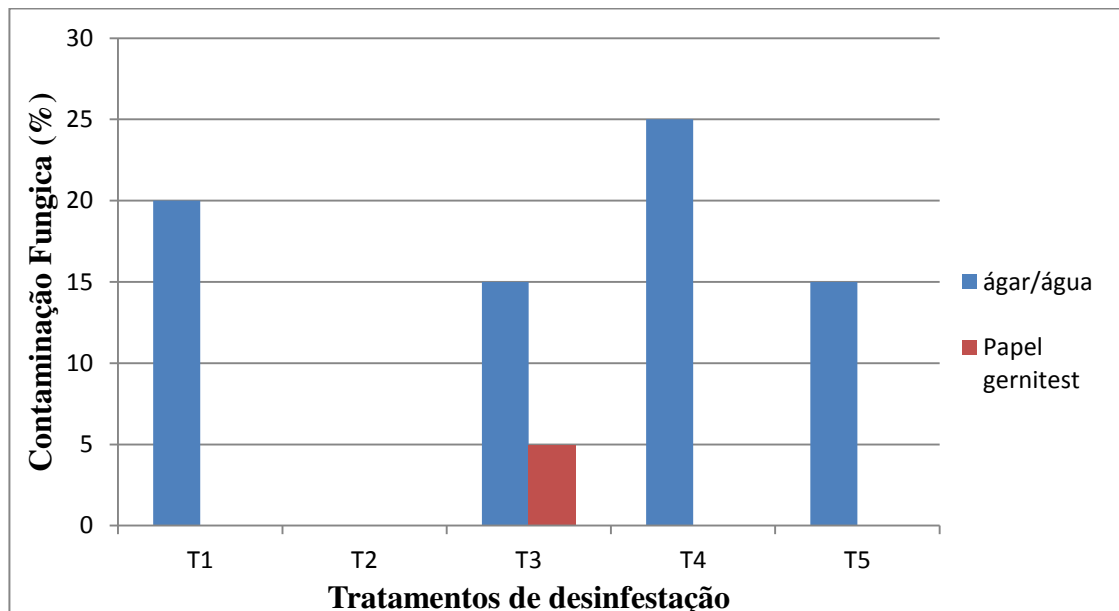
Outro fator importante mostrado na figura é a proximidade dos melhores valores de velocidade de germinação, tendo em vista que um deles é o tratamento controle onde as

sementes não recebem nenhum tratamento de desinfestação, essa ocorrência faz chegar à conclusão que os agentes desinfestantes não exerceram nenhuma influência na velocidade de germinação.

Quanto à contaminação fúngica (Figura 8), verifica-se que o substrato papel germitest foi significativamente superior ao ágar, observando que em todos os tratamentos de desinfestação a contaminação fúngica alcançou os menores valores, exceto para o tratamento T3 (imersão por 10 minutos em álcool 70%, e 30 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% acrescida de três gotas de tensoativo), onde apresentou uma porcentagem de contaminação de 5%, provavelmente, este resultado ocorreu, devido ao fato da semente apresentar contaminação endógena, pois apenas uma semente apresentou contaminação e toda a manipulação e procedimentos foram feitos seguindo os padrões de assepsia em todos os tratamentos.

Dessa forma, constata-se que o papel não constitui um ambiente apropriado ao desenvolvimento de fungos comparado ao substrato ágar-água onde o teor de água é considerado maior, favorecendo um ambiente ideal para o surgimento de contaminantes fungicos (Figura 9).

Figura 8: Porcentagem de contaminação fúngica em sementes de *M. ophthalmocentra* germinadas *in vitro* nos substratos ágar-água e papel germitest, em função dos tratamentos de desinfestação empregados.

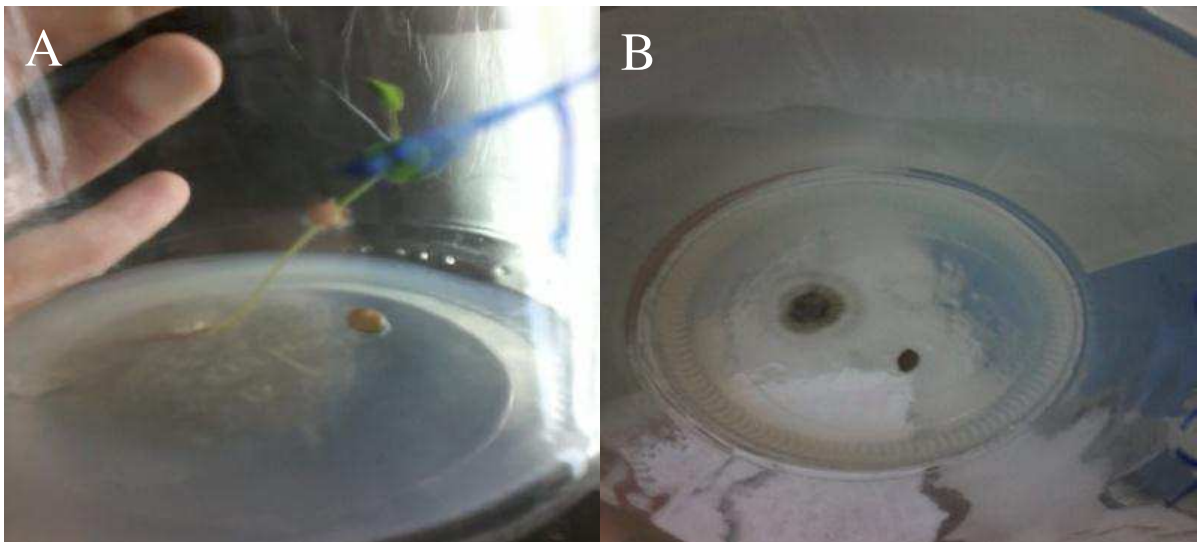


Fonte: Dados da Pesquisa

Porém, quando as sementes foram submetidas ao substrato ágar, verifica-se que apenas o tratamento T2 (imersão por 10 minutos em álcool 70%, e 10 minutos em hipoclorito de

sódio na concentração de 2,0% acrescida de três gotas de tensoativo), foi eficiente para promover a assepsia superficial das sementes, enquanto que o tratamento T4 (imersão por 20 minutos em álcool 99,3%, e 20 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 1,0% acrescida de três gotas de tensoativo), apresentou a maior taxa de contaminação com valor de 25%. Já os tratamentos T3 (imersão por 10 minutos em álcool 70%, e 30 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% acrescida de três gotas de tensoativo) e T5 (imersão por 20 minutos em álcool 99,3%, e 40 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% acrescida de três gotas de tensoativo), mostraram quase as mesmas porcentagens de contaminação, com valores de 15% e 14% respectivamente.

Figura 9: (A) Plântula e (B) sementes de *M. ophthalmocentra* inoculadas em substrato ágar-água apresentando contaminação fúngica.



Fonte: Acervo da pesquisa

Para cultivo *ex vitro* esse resultado é bastante favorável, pois para a propagação no campo, essa taxa de contaminação não oferece valores significativos, ou seja, as sementes de *M. ophthalmocentra* não apresentam para o produtor altas taxas de contaminação fúngica, permitindo que estes produzam plantas vigorosas. Porém, para trabalhos *in vitro*, a produção de plantas precisa ser realizada sem contaminação, assim, constata-se que a concentração de álcool 70% e hipoclorito do sódio 2,0%, por 10 minutos respectivamente (T2), foi significativamente superior para promover a desinfestação de *Mimosa ophthalmocentra*, apresentando 0% de contaminação nos dois tipos de substrato utilizado.

5 CONCLUSÃO

- ✓ O substrato ágar-água proporcionou os melhores resultados de germinação para sementes de *M. ophthalmocentra*;
- ✓ Os tratamentos imersão por 10 minutos em álcool 70%, e 30 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% acrescida de três gotas de tensoativo (T3) e imersão por 20 minutos em álcool 99,3%, e 40 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% acrescida de três gotas de tensoativo (T4), proporcionou os melhores resultados de germinação, primeira contagem de germinação e índice de velocidade de germinação;
- ✓ Quanto à contaminação, o melhor tratamento empregado foi o T2 (Imersão por 10 minutos em álcool 70%, e 10 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 2,0% acrescida de três gotas de tensoativo (detergente comercial) com 0% de contaminação nos dois tipos de substrato;
- ✓ Em relação aos substratos o papel germitest foi significativamente superior ao ágar-água, alcançando 0% de contaminação em quase todos os tratamentos, exceto em T3 com 5% de contaminação;
- ✓ Sementes de *M. ophthalmocentra* possui boa germinação aplicando o tratamento T2 de desinfestação e usando ágar-água como substrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, F. F. A. **Efeito de diferentes substratos e condições ambientais na germinação de sementes de *Euterpe edulis* Mart. e *Geonomashottiana* Mart.** *Acta. Botânica Brasílica*. 4(2):01–07.1990.
- ALENCAR, A. P. **Estabelecimento do cultivo *in vitro* do umbuzeiro (*Spondiastuberosa* Arr.).** 1999. 87p. Dissertação - universidade federal rural de Pernambuco, Recife, 1999. Disponível em: <http://www.asabrasil.org.br/Portal/Informacoes.asp> Acessado em 10/03/2016
- ALVARES, M. C; CALDAS, L. S. **Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 415-420. 2002.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. **Micropropagação da aroeira (*Myracrodruonurundeuva* Fr. All).** *Revista Ciência e Agrotecnologia*, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais.** 1. Ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.15, 2002.
- ARAÚJO, F. S; RODAL, M. J. N; BARBOSA, M. R. V; MARTINS, F. R. **Repartição da flora lenhosa no domínio da caatinga.** In: Araújo F. S. et al. (Orgs.). *Análise das variações da biodiversidade do bioma caatinga: Suporte a estratégias regionais de conservação.* 2005.
- ARAÚJO, A. M. S.; TORRES, S. B.; NOGUEIRA, N. W.; FREITAS, R. M. O.; CARVALHO, S. M. C. **Caracterização Morfométrica e Germinação de Sementes de *Macropitiliummartii* Benth. (Fabaceae).** Universidade Federal Rural do Semiárido. Mossoró – RN. *Revista Caatinga, Mossoró*, v. 27, n. 3, p. 124 – 131, jul. – set., 2014.
- BARROW, J. R.; OSUNA-AVILA, P; REYES-VERA, I. **Fungal endophytes intrinsically associated with micropropagated plants regenerated from native *Boutelouaeriopodatorr.*** *And Atriplexcanescens* (pursh) nutt. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant*, 40: 608-612. 2004.
- BERTONCELLI, D. J; HASSE, I.; OLIVEIRA, M. C. **Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don.** In: III Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária - Engenharia Florestal. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, 2009.
- BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry Dordocht:** martinu nihff Publishers, 1985, v. 3, 416p.
- BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. **Interpretação de resultados de germinação.** In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação – do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. p.209-222.
- BRASILEIRO, R. S. **Alternativas de desenvolvimento sustentável no Semiárido nordestino: da degradação à conservação.** *Scientia plena*, v.5, n.5, p. 01-12, 2009.
- BRASIL. **Manual de Análise Sanitária de Sementes** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília: MAPA-ACS, 2009, 200p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes.** Brasília, SNDA/DNDV/CLAV, 399p. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília: SNDA/DNDV/CLV, 1992. 365p.

- BRITO, A. S.; PINTO, M. A. D. da S. C.; ARAUJO, A. V.; SOUZA, V. N. **Superação de dormência em *Mimosa ophthalmocentra* Mart. ex Benth.** Enciclopédia biosfera, centro científico conhecer- Goiânia, v. 10, n. 18. 2014.
- CABRAL, R.; LOPES, P.; MORAES, E.; MARTINS, M.; CORRÊA, R. **Meios nutritivos alternativos para propagação *in vitro* de plantas.** VI Semana de Ciência e Tecnologia IFMG - campus Bambuí. VI Jornada Científica. 2013.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; ANTUNES, L. E. C.; SILVA, A. T. **Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. acaiaá.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.33, n.6, p.847-51, 1998.
- CAVALCANTI, A. D. C.; RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V. S. B.; COSTA, K. C. C. **Mudanças florísticas e estruturais, após cinco anos, em uma comunidade de Caatinga no Estado de Pernambuco, Brasil.** Nota Científica/Scientific Note. 2009.
- CAVALCANTE, A. M. C. **Avaliação de diferentes substratos na germinação e no desenvolvimento vegetativo do açaizeiro (euterpe oleraceamart.) – arecaceae.** Web Artigos. 2011. Disponível em:<http://www.webartigos.com/artigos/avaliacao-de-diferentes-substratos-na-germinacao-e-no-desenvolvimento-vegetativo-do-acaizeiro-euterpe-oleracea-mart-arecaceae/78318/#ixzz49J5DIMiu> Acesso em 18 de maio de 2016.
- CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. **Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalisperuviana* L.** Ciência Agrotécnica, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281- 1287, 2005.
- CORDER, M. P. M.; BORGES JUNIOR, N. **Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acaciamearnsiide* Wil.** Ciência Florestal, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.
- COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. **Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*.** Ciência Rural, v.40, n.5, p.1090-1096, 2010.
- COSTA, J. A. S.; NUNES, T. S.; FERREIRA, A. P. L.; STRADMANN, M. T. S.; QUEIROZ, L. P. **Leguminosas forrageiras da caatinga: plantas importantes para o sertão da Bahia. Feira de Santana.** Bahia. Universidade Estadual de Feira de Santana. SASOP. 2002. P.112.
- 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.
- CUSTÓDIO, C. C.; MACHADO-NETO, N. B.; FOLINO, J. A.; CASEIRO, R. F. **Efeito de um desinfetante natural, o extrato de sementes de grapefruit (kilol®) na desinfecção de sementes de *Panicummaximum* cv. “Tanzânia”.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9, Florianópolis, 1995. Informativo ABRATES, Londrina, v.5, n.2, p.103, 1995. (Resumos).
- DÍAZ, K.; VALIENTE, C.; MARTÍNEZ, M.; CASTILLO, M.; SANFUENTES, E. **Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings.** World J Microbiol Biotechnol, 25: 867-873.2009.
- DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; TAKAKI, G. M. C.; MARIANO, R. L. R.; MACIEL, G. A. **Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos.** Ciência e Agrotecnologia, 29: 134-141. 2005.
- ENCINA, C. L., Padilla, I. G. (1996) A propósito de semillas:
<http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS33/semilla33.html>
Acesso em: 22/03/2016.

- FAIAD, M. G. R.; SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R.; PADILHA, L. S. **Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fisiológica de sementes de *Commiphora leptophloes* (Mart.) J. B. Gillet.** Revista Brasileira de Sementes, Brasília, DF, v.19, n.1, p.14-17. ISSN 0101-3122. 1997.
- FERREIRA, F. A. **Patologia florestal:** principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.
- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. **Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas.** In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa – CNPH, 1998. p. 21-43.
- GANBORD, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. **Nutrient requirements of suspension of soybean root cells.** Experimental cell research, New York, v. 50, p. 151-158, 1968.
- GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; BARBOSA, M. R. V.; BOCAGE NETA, A. L.; FIGUEIREDO, M. A. **Espécies endêmicas da caatinga.** In Vegetação e flora da caatinga (E. V. S. B. Sampaio, A. M. Giulletti, J. Virgínio & C. F. L. Gamarra Rojas, ed.). Associação Plantas do Nordeste - APNE, Centro Nordestino de Informações sobre Plantas-CNIP, Recife, p.103-118. 2002.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; MUNIZ, M. F. B.; CURTI, A. R.; ROSA, F. C. **Subsídio hídrico fornecido por substratos alternativos usados na germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L.** Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Centro de Ciências Rurais (CCR), Santa Maria, RS, Brasil. Scielo. ISSN 0103-8478. 2009. acesso em 15/05/2016. <http://www.scielo.br/pdf/cr/2009nahead/a291cr1339.pdf>.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Ed. Brasília: Embrapa - SPI/Embrapa - CNPH, 1998. v.1, p.183-260.
- GUTIÉRREZ, I. E. M.; NEPOMUCENO, C. F.; LEDO, C. A. da S.; SANTANA, J. R. F. **Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*.** Ciência Rural, Santa Maria, v.41, n.2, p.260-265, fev, 2011. ISSN 0103-8478.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIS JUNIOR, F. T; GENEVE, R. L. **Plant propagation:** Principles and Practices. 7 ed. New York: Englewood Clippis. 2002. 770p. ISBN 978-0132061032.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. **Cultura de embriões.** In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.1, 371-94.
- IBGE. *Censo demográfico 2010.* Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em: 12 mar de 2016.
- ISTA - International Seed Testing Association. **International Rules for Seed Testing.** Seed Science and Technology, Zürich, v.4, n.1, p.51-177, 1976.
- JUCHUM, F. S. **Análise filogenética das variantes morfológicas foliares de *Caesalpinia echinata* LAM. (Pau-Brasil) na região Sul baiano com base em sequências de DNA.** 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em genética e biologia molécula). Programa de Pós graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de santa Cruz, Ilhéus-BH. 2007.

- LACERDA, A. V.; BARBOSA, F. M.; BARBOSA, M. R. V. **Estudo do componente arbustivo-arbóreo de matas ciliares da bacia do rio Taperoá, semiárido paraibano: uma perspectiva para a sustentabilidade dos recursos naturais.** O ecologia Brasiliensis, Rio de Janeiro-RJ, v.11, n.3, p.331-340, 2007.
- LAKSHMANAN, P., GEIJSKES, R. J., AITKEN, K. S., GROF, C. P. L., BONNETT, G. D. & SMITH, G. R. Sugarcane **biotechnology: the challenges and opportunities.** *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41: 345-363. 2005.
- LEWIS, G. P. **Leguminosae subfamília Mimosoideae.** Pp. 86-90. In: Barbosa, M. R.V.; Sothers, C.; Mayo, S.; Gamarra-Rojas, C. F. L. & Mesquita, A. C. Check list das plantas do nordeste brasileiro: angiospermas e gymnospermas. Brasília, Ministério da Ciência e Tecnologia. 2006.
- LIMA, J. D.; MORAES, W. S. **Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira.** Pesquisa Agropecuária Tropical, 36: 13-19. 2006.
- LIMA, J. D.; MORAES, W. S. **Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (Musa AAA cv. CAIPIRA).** Pesquisa Agropecuária Tropical, v.36, n.3, p.181-186, 2006.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. **Commercially feasible micropropagation of montaim laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture.** Combined Proceedings International Plant Propagators Society, Carlisle, USA, v. 30, p. 421-427, 1981.
- LOPES, J. C.; JARDIM, I. C. C.; SOBREIRA, D. G.; FORDE, G. H. A.; TATAGIBA, J. S. **Associação entre germinação, vigor e sanidade em sementes de milho precoce e normal, produzidos na área experimental do Centro Agropecuário da UFES.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 7, Campo Grande, 1991. Informativo ABRATES, Brasília, v.1, n.4, p.55, 1991. (Resumos).
- MARANGON, G. P.; FERREIRA, R. L. C.; SILVA, J. A. A.; LIRA, D. F. S.; SILVA, E. A.; LOUREIRO, G. H. **Estrutura e padrão espacial da vegetação em uma área de Caatinga.** Floresta, Curitiba, PR, v. 43, n. 1, p. 83-92, 2013. Disponível em:
<http://revistas.ufpr.br/floresta/article/view/27807/20139> Acesso em: 03/05/2016.
- MEDEIROS, C. P. C. **Indução *in vitro* de respostas morfo genéticas em explantes nodais de cajazeira (*Spondiasmombin* L.).** 1999. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. **Revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures.** *Physiologia Plantarum*. Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NIETSCHKE, S.; MARQUES, S. V.; PEREIRA, M. C. T.; SALLES, B.; XAVIER, A. A.; FRANÇA, A. C.; LIMA, C.; SILVA, L. S. **Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira.** Ciência Rural, 36: 989-991. 2006.
- NISHIMURA, T.; MEGURO, A.; HASEGAWA, S.; NAKAGAWA, Y.; SHIMIZU, M.; KUNOH, H. **An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. AOK-30, isolated from Mountain Laurel and its antifungal activity.** *J. Gen. Plant Pathol*, 68: 390-397. 2002.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. M. **Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss).** Ciência Agrotécnica, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

- NORMAH, M. N.; HAMIDAH, S.; GHANI, F. D. **Micropropagation of Citrus halimii-an endangered species of South-east Asia.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v.50, p.225-227, 1997.
- OLIVEIRA, F. F. M.; SILVA, K. M. B.; OLIVEIRA, G. F.; DANTAS, I. M.; CAMACHO, R. G. V. **Micropropagação de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. A partir de segmentos nodais e ápices caulinares.** Revista caatinga -ISSN 0100-316X . Caatinga (Mossoró, Brasil), v.20, n.3, p152-159, julho/setembro. Universidade rural do semiárido (UFERSA). Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. 2007.
- PASQUAL, M. Introdução: **fundamentos básicos.** In: Curso de especialização à distância cultura de tecidos vegetais (CTV). Lavras: UFLA/FAEPE, 97p. 2001.
- PEDROSO, D. C. ; MENEZES, V. O. ; LOPES , S. J.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. **Testes de germinação *in vitro* de sementes de *Sida rhombifolia* L.** Agrocienca (2007) Vol XI N° 1 pág. 90 - 96
- PEREIRA, E. de O; LIMA, A. B. P.; NOGUEIRA, E. U.; COUTO, D. R.; SOARES, T. C. B. **Germinação *in vitro* de *Pitcairnia flammea* (BROMELIACEAE):** efeito do meio de cultivo e do carvão ativado. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, N.13; 2011.
- PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FILGIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. Pp. 283-297. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (orgs.). **Germinação – do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed Editora, 2004. 323 p.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente.** Brasília: AGIPLAN, 1977. 289p.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes.** 2.ed. Brasília, s/Ed., 1985. 289p.
- Queiroz, L. P. **Leguminosas da caatinga.** Feira de Santana, Universidade Estadual de Feira de Santana. 2009.
- QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental.** Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus, AM. 44p. 2008.
- ROCHA, S. C. **Micropropagação da canjarana (*Cabrlea canjerana*).** 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- ROJAS-ARÉCHIGA, M.; VÁSQUEZ-YANES, C. **Cactus seed germination: a review.** *Journal of Arid Environments*, 44:85-104. 2000.
- ROJAS, S.; GARCIA, J.; ALARCON, M. **Propagación vegetativa, conceptos básicos y experiencias com espécies amazônicas.** Ed. Corpoica. 2004. 56 p.
- ROLSTON, M. P. Water impermeable seed dormancy. **Botanical Review**, New York, v. 44, p. 365-396, 1978.
- ROSA, F. C. **Superação da dormência de sementes e cultivo *in vitro* de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth.).** 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado). Área de concentração Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, RS. 2009.
- SALES, M. F; SILVA, J. S. **O gênero *Mimosa* (leguminosae - mimosoideae) na Microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco.** Rodriguésia. Vol. 59.No. 3. P. 435-448. 2008.

- SCHOLTEN, H. J.; PIERIK, L. M. **Ágar as a gelling**: chemical and physical analysis. Plant Cell Reports, New York, v. 17, p. 230-235, 1998.
- SCHRIRE, B. D.; Lewis, G. P. & Lavin, M. **Biogeography of the Leguminosae**. Pp. 21-54. In: Lewis, G.P.; Schrire, B.; Mackinder, B. & Lock, M. (Eds.). Legumes of the World. Kew, Royal Botanic Gardens. 2005.
- SILVA, A. A. **Morfogênese *in vitro* de diferentes tipos de explantes em progênies de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et Golfari**. Piracicaba, SP, 149p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais.) Universidade de São Paulo. Piracicaba- São Paulo. 1989.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F. de. **O gênero mimosa (leguminosae- mimosoideae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco**. Recife, PE, 2007. 13 p.
- SILVA. **Comportamento fenomenológico de *Mimosa ophthalmocentra* Mart. Ex Benth. Em uma área de Caatinga no semiárido paraibano, Brasil**. Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido. - Sumé – PB. 2015. 56 f.
- SILVA, L. B.; SANTOS, F. A. R.; GASSON, P.; CUTLER, D. **Estudo comparativo da madeira de *Mimosa ophthalmocentra* Mart. ex Benth e *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Fabaceae-Mimosoideae) na caatinga nordestina**. Acta Botanica Brasilica 25(2): 301-314. 2011.
- SIQUEIRA FILHO, J. A.; SANTOS, A. P. B.; NASCIMENTO, M. F. S.; SANTO, F. S. E. **Guia de Campo de Árvores da Caatinga**. Petrolina, 2009. 64p.
- SKIRVIN, R. M. Fruticulture crops. In: CONGER, B. V. **Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1981. p. 51-139.
- SOUSA, P. B. L.; SANTANA, J. R. F.; CREPALDI, I. C.; LIMA, A. R. **Germination in vitro of seeds of a threatened arboreal species in the municipal district of Abaíra (BA)**. Sitientibus, n.20, p.89-99.1999.
- SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.
- S.R.A (Secretaria Regional do Ambiente e dos Recursos Naturais. **O que é cultura in vitro de plantas?**. 2009. Disponível em: http://sra.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=122:as-moscas-da-camacha-vao-para-junto-dos-animais-e-para-dentro-de-casa&catid=42:agricultura&Itemid=65 Acesso em: 18 de maio de 2016.
- TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C. **Influência de *Colletotrichum gossypii* South. no desenvolvimento inicial do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em função da localização do inóculo e desinfestação das sementes**. Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v.19, n.1, p.9-13, 1997.
- TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALSA, L. S.; NASCIMENTO, A. S; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.
- VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Eds.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164 p.
- WILLADINO, L; CÂMARA, T. **Cultivo *in vitro* de vegetais**. Cultura de Tecidos Vegetais. UFRP set de 2007. Disponível em <http://www.dq.ufrpe.br/culttec.htm> Acesso em: 07/03/2016.

XIAO, Y.; NIU, G; KOZAI, T. **Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system.** Plant Cell Tiss. Org. Cult, 105: 149-158. 2011.

ZHANG, L.; XU, T.; SUN, X.; ZHANG, H.; TANG, T.; TANG, K. **Factores influencing shoot regeneration from cotyledons of tetraploidisatisindigotica F.** In Vitro-Plant, New York, v. 39, p. 459-462.2003.