

PROCEDIMENTOS PARA CULTIVO *IN VITRO* DE *Desmodium incanum*

Joseila Maldaner¹, Raíssa Schwalbert², Cleber Witt Saldanha¹, Ionara Fátima Conterato¹, Gerusa Pauli Kist Steffen¹

1. Pesquisador (a) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO - Rio Grande do Sul (jomaldaner@gmail.com)
2. Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

Desmodium incanum, popularmente conhecida como pega-pega, é uma leguminosa nativa dos campos sulinos que apresenta boas características bromatológicas como forrageira. A origem seminal das plântulas de *D. incanum* conferiu melhor estabelecimento em condições de cultivo *in vitro* do que segmentos nodais desta espécie, sendo o processo de desinfestação das sementes também mais eficiente. Constatou-se a necessidade de escarificação mecânica das sementes de *D. incanum* para uma eficiente germinação *in vitro*. Os dois acessos de *D. incanum* não diferiram significativamente para as variáveis testadas. De um modo geral estes resultados confirmam que a técnica da cultura de tecidos vegetais é eficiente e promissora para a propagação e conservação de germoplasma de *D. incanum*.

PALAVRAS-CHAVE: Bioma Pampa, forrageira, leguminosa, pega-pega.

PROTOCOL FOR *in vitro* CULTURE OF *Desmodium incanum*

ABSTRACT

Desmodium incanum is a native legume of Southern camps, it have good qualitative characteristics as forage. The seminal source of seedlings of *D. incanum* gave a better establishing in *in vitro* culture than nodal segments, and the disinfection was more efficient in seed. It found the need for mechanical scarification of the seeds for efficient germination *in vitro* of *D. incanum*. The two tested accessions of *D. incanum* did not differ significantly for the variables evaluated. Overall these results confirm that the technique of plant tissue culture is efficient and promising for the propagation and preservation of *D. incanum* germoplasm.

KEYWORDS: Pampa biome, forage, legume, pega-pega.

INTRODUÇÃO

Desmodium incanum DC. é uma leguminosa nativa e de expressiva distribuição nos campos do Rio Grande do Sul (RS). É uma espécie perene, estival, com hábito de crescimento prostrado ou ascendente. Apresenta folhas alternas, unifolioladas ou trifolioladas; flores zigomorfas, papilionáceas, pediceladas, imbricadas, fruto característico tipo lomento articulado ou craspédio e tricomas uncinados (OLIVEIRA, 1990). Este tipo de tricoma, presente no exocarpo dos frutos de algumas espécies, facilita a fixação dos diásporos, ou unidades de dispersão, pelos animais ou mesmo através das roupas dos seres humanos, promovendo a dispersão por epizocoria (SOUZA et al., 2006). Por esta razão, muitas espécies são

conhecidas popularmente, em território nacional, pelo nome de pega-pega, carrapicho-beiço-de-boi, amor-agarrado e carrapicho (OLIVEIRA, 1990).

É uma espécie que apresenta boas características bromatológicas como forrageira, considerada moderadamente palatável e persistente (quando sob pastejo, tem forte enraizamento nos nós formando estolões), sendo bem aceita pelos animais (BOLDRINI, 1993). A espécie adapta-se aos mais variados tipos de solos, crescendo bem em solos de média acidez, podendo persistir e vegetar em solos muito ácidos (pH 4,5 ou menos) de baixa fertilidade (CORADIN et al., 2011).

Contudo, a deterioração dos campos nativos, causada pela alta carga animal e pela invasão, ou substituição, dos mesmos por cultivos agrícolas, provoca redução da frequência de ocorrência de muitas espécies campestres, dentre elas *D. incanum*. Associado a isso, a conservação das espécies de plantas do bioma Pampa nas últimas décadas tem sido ameaçada/negligenciada. Entre os anos de 1970 e 2005, estima-se que 4,7 milhões de hectares de pastagens nativas do RS foram convertidos em outros usos agrícolas, como em lavouras e áreas de florestamento (PILLAR et al., 2009). Além disso, a deterioração é associada à invasão de espécies exóticas e estratégias de manejo do pastejo inadequadas que fazem com que somente 39% da área total do bioma Pampa permaneça constituída por remanescentes de campos naturais (PILLAR et al., 2009).

Diante da possibilidade de se obter plantas completas a partir do cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais, a técnica de cultivo *in vitro* pode ser uma estratégia eficiente para a conservação de plantas (PENCKE, 2011). Como ferramenta biotecnológica, a cultura de tecidos vegetais oferece um conjunto de técnicas que podem ser utilizadas com o intuito de minimizar os problemas relacionados ao uso industrial de material vegetal, bem como para a conservação do germoplasma (SARTOR et al., 2012).

Algumas técnicas desempenham papéis de destaque no cultivo inicial destas plantas, como a germinação e o crescimento *in vitro*, micropropagação e calogênese *in vitro*, podendo auxiliar tanto na obtenção de material vegetal quanto na indução/melhoria da produção de metabólitos secundários. A germinação de sementes *in vitro* e a micropropagação também se destacam na cultura de tecidos, com o objetivo de regenerar indivíduos completos a partir de segmentos nodais e ápices caulinares de plântulas ou indivíduos adultos (ZANOTTI et al., 2012).

De modo que a definição de protocolos para a micropropagação para *D. incanum*, como também para outras leguminosas ou mesmo gramíneas nativas, mostra-se como interessante alternativa na conservação *ex situ* de recursos fitogenéticos ameaçados no bioma Pampa. Atualmente, não há registros de trabalhos abordando aspectos da propagação *in vitro* de *D. incanum*.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente para o cultivo *in vitro* de *D. incanum*. Os resultados aqui apresentados são dados parciais de um projeto que propõe o estabelecimento de uma coleção de germoplasma *in vitro* de espécies nativas do bioma Pampa com potencial forrageiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

As plantas de *Desmodium incanum* foram coletadas no Centro de Pesquisa Iwar Beckman, Fepagro Campanha – Hulha Negra – RS. Já as sementes, além de terem sido coletadas neste mesmo centro de pesquisa também foram coletadas no Centro de Pesquisa em Florestas, Fepagro Florestas – Santa Maria – RS. As coletas ocorreram entre os meses de em outubro de 2012 a fevereiro de 2013. Os

experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Pesquisa em Florestas, Fepagro Florestas – Santa Maria – RS durante o ano de 2013. Tanto a região da campanha quanto a região da depressão do RS são abrangidos pelo clima subtropical úmido (Cfa), conforme a classificação climática de Köppen (1931), onde observa-se a ocorrência de precipitação em todos os meses do ano, com inverno e verão bem definidos, e ocorrência de verões quentes. Quanto a classificação do solo existente em Santa Maria, região da depressão central do RS, tem-se um Argissolo Vermelho Distrófico típico correspondente a Unidade de Mapeamento São Pedro. Para Hulha Negra, região da campanha, o solo existente é classificado como Planossolo Háptico Eutrófico vertissólico, correspondente a Unidade de Mapeamento Bagé (STRECK et al., 2008).

Segmentos nodais de plantas coletadas a campo foram tratados com Cruzate (0,1%; m/v) antes da desinfestação dos explantes. O processo de desinfestação dos brotos consistiu de algumas etapas realizadas sucessivamente, conforme segue: lavagem em água com detergente comercial (2 gotas 100 mL⁻¹) durante 2 minutos; imersão em solução de álcool 70% (v/v) por 45 segundos; imersão dos segmentos caulinares em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) acrescido de detergente (2 gotas 100 mL⁻¹) por 5 a 7 minutos; cinco lavagens em água destilada e autoclavada. Todas as etapas foram realizadas sob agitação constante e em condições assépticas.

Segmentos nodais (aproximadamente 1 cm) foram cultivados em meio MS (MURASHIGE & SCOOG, 1962) acrescido de 30 gL⁻¹ de sacarose, 100 mgL⁻¹ de mio-inositol e 7 gL⁻¹ de ágar (pH 5,8). O material foi mantido em sala de crescimento sob temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 35 μmol m⁻²s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias. Semelhantemente, sementes de *D. incanum* foram desinfestadas, conforme protocolo descrito anteriormente, para posterior germinação nas mesmas condições de cultivo *in vitro*.

Experimentos

Teste 1 - Origem das plântulas

Para que fosse identificada uma fonte viável de plântulas para o cultivo *in vitro*, comparou-se o desenvolvimento de *D. incanum* através de sementes ou via segmentos nodais, ambos submetidos ao processo de desinfestação descrito anteriormente. Neste teste foram avaliados: o número de segmentos nodais por planta, o número de brotações por planta e as porcentagens de enraizamento e de contaminação dos explantes.

Teste 2 - Escarificação mecânica

Para verificar a necessidade de escarificação para a germinação das sementes, foi realizado um teste em que um lote de sementes sofreu processo de escarificação mecânica com lixa 120 (nº de grãos de areia por cm²) comparativamente a outro lote que não passou por este processo. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por três sementes por frasco (100 mL) com aproximadamente 20 mL de meio de cultura MS.

Teste 3 - Diferentes acessos de *Desmodium incanum*

Foram coletadas sementes de *D. incanum* em duas regiões do estado do RS (Hulha Negra e Santa Maria) e cultivadas *in vitro* conforme metodologia já descrita.

Variáveis morfológicas foram avaliadas: altura das brotações, número de brotações, número de folhas e enraizamento.

Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com $\alpha=0,01$. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *software* ASSISTAT 7.7 (SILVA & AZEVEDO, 2002).

RESULTADOS

Teste 1 - Fonte de explantes

Observou-se que a emissão de novos segmentos nodais foi maior nas plântulas originadas através da germinação *in vitro* de sementes de *D. incanum* do que nas provenientes de segmentos nodais (Fig. 1A). Enquanto o número de brotações por plântula não diferiu significativamente nas duas fontes de explantes (Fig. 1B).

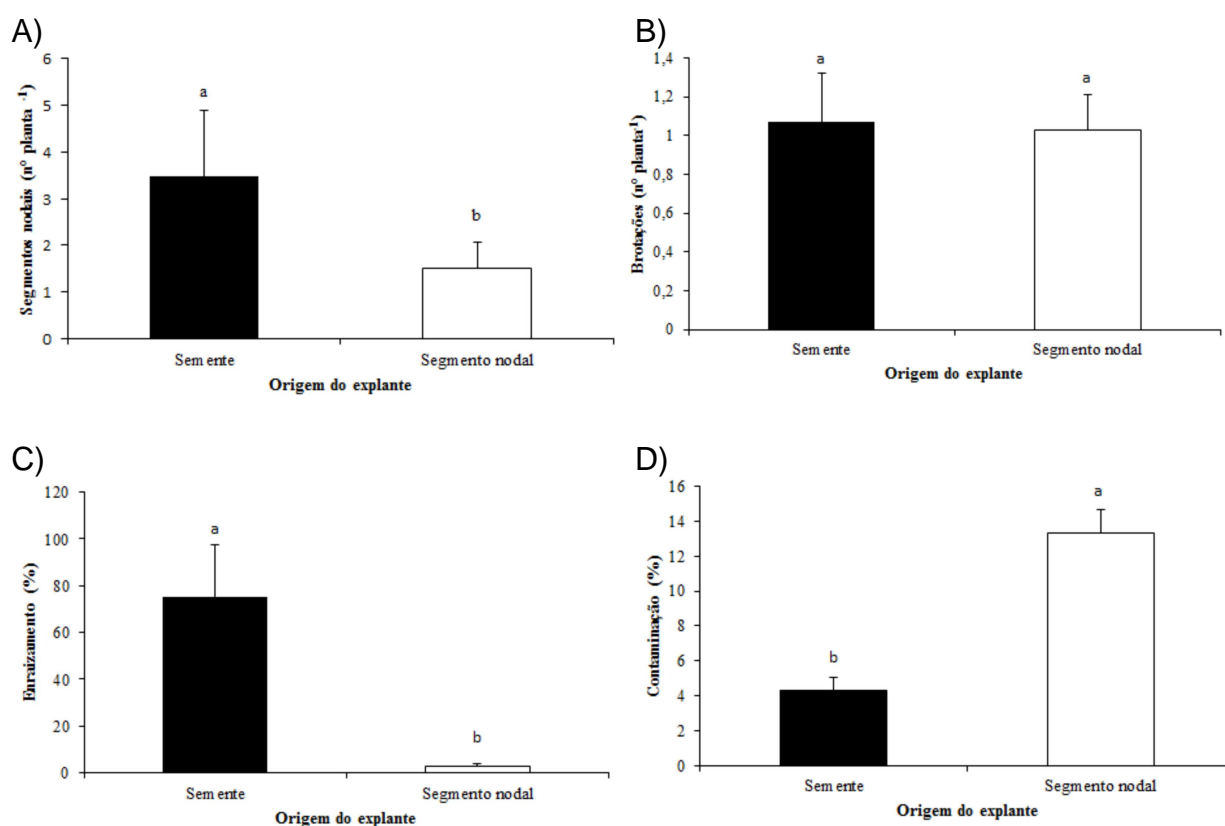


FIGURA 1: Efeito da fonte de explante (semente ou segmento nodal) no número de segmentos nodais (A), no número de brotações (B), na porcentagem de enraizamento (C) e na porcentagem de contaminação (D) de *Desmodium incanum*.

O cultivo *in vitro* realizado a partir de sementes permite que a variabilidade genética da espécie seja mantida, o que é requerido em programas de conservação, sendo considerado alternativo aos bancos de sementes (ENGELMANN, 2010; PENCE, 2011). Os resultados apresentados podem ser explicados pelo fato de que plântulas oriundas de sementes, após a emissão da radícula, têm capacidade de iniciar rapidamente a absorção de nutrientes, sendo as reservas encontradas nas

sementes importantes, por estarem relacionadas com o suprimento de energia e carbono, essenciais para o desenvolvimento inicial da plântula. Estas reservas podem funcionar tanto como fonte de energia para manter processos metabólicos, como sendo fonte de matéria para a formação de tecidos vegetais que irão constituir a plântula. As reservas nutritivas armazenadas em sementes compreendem grupos específicos de carboidratos, lipídios e proteínas (BEWLEY et al., 2013).

Além disso, a propagação semínifera *in vitro* é uma técnica da cultura de tecidos utilizada eficientemente para resolver problemas como a dormência de sementes em algumas espécies (CARVALHO et al., 2012; SOARES et al., 2012). Mais especificamente, plântulas originadas de sementes possuem tecidos meristemáticos, isto é, tecidos pouco diferenciados, o que possibilita uma ótima fonte de explantes competentes (SILVA et al., 2012) para a organogênese direta ou indireta.

A porcentagem de enraizamento foi superior (mais de 10 x) nas plântulas obtidas via germinação quando comparadas com aquelas originadas de segmentos nodais (Fig. 1C). Na propagação vegetativa, o sistema radicular formado nas estacas é denominado adventício, pois a raiz se desenvolve através do tecido adulto, não do tecido embrional ou meristemático, como ocorre na germinação (HARTMANN et al., 2010; NASCIMENTO, 2012). A formação de raízes em estacas é um processo anatômico e fisiológico complexo, associado à desdiferenciação e ao redirecionamento do desenvolvimento de células vegetais totipotentes para a formação de meristemas que darão origem às raízes adventícias (ALFENAS et al., 2009).

O processo de desdiferenciação corresponde à capacidade de as células anteriormente desenvolvidas e diferenciadas iniciarem divisões celulares e formarem um novo ponto de crescimento meristemático (HARTMANN et al., 2010). As células que possuem potencial endógeno para a formação de raízes adquirem a competência, reagindo a sinais específicos (e.g. fitohormônios, luz, temperatura). Após, ocorre o desencadeamento de um processo morfogênético e as células passarão pela fase de determinação, na qual o potencial de desenvolvimento de uma célula torna-se limitado a uma rota específica. A origem das raízes adventícias ocorre em certos grupos de células que, por divisões mitóticas, formam os primórdios radiculares. As divisões mitóticas responsáveis pela formação das raízes podem ocorrer nas regiões do câmbio, do parênquima liberiano, do tecido jovem do floema secundário e dos tecidos dos raios vasculares (HARTMANN et al., 2010).

A desinfestação, ou seja, a remoção de contaminantes existentes na superfície do explante oriundo de material de campo ou de casa de vegetação é um passo inevitável no cultivo *in vitro*, diretamente relacionado com o sucesso da técnica de cultura de tecidos. A porcentagem de contaminação foi significativamente superior nas plantas desenvolvidas a partir de segmentos nodais (Fig 1D), quando comparadas às de origem seminal. O estabelecimento *in vitro* é uma etapa chave no processo de micropropagação, especialmente quando os explantes provêm de plantas de campo, devido às elevadas taxas de contaminação dos tecidos. Os organismos contaminantes, como fungos e bactérias, agem de forma indireta sobre a planta, competindo com esta por vitaminas e nutrientes do meio nutritivo, e produzindo metabólitos fitotóxicos, como ácidos láctico e acético e o cianeto, o que leva ao comprometimento do desenvolvimento normal das plantas (FERREIRA et al., 2009).

A vantagem da utilização de explantes coletados no campo é a clonagem de matrizes selecionadas, porém, os tratamentos de desinfestação nem sempre são

suficientes para eliminar os microrganismos contaminantes comuns nestes segmentos. Dessa forma, quando a planta apresenta número suficiente de sementes e de fácil obtenção, estas se tornam uma boa opção, por normalmente estarem mais protegidas, como no caso do *D. incanum*, pelo craspédio que envolve as sementes.

Teste 2 – Escarificação mecânica

Alguns métodos têm sido testados para superar a dormência decorrente da impermeabilidade do tegumento, tais como embebição em água, imersão em água quente, escarificação com ácido sulfúrico concentrado, escarificação mecânica, entre outros (RIBEIRO et al., 2009). Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a necessidade de escarificação mecânica das sementes para uma germinação *in vitro* eficiente (Fig. 2). De maneira semelhante, ROSA et al. (2012) trabalhando com *Mimosa scabrella* e CARVALHO et al. (2012) com *Passiflora gibertii* também concluíram que a escarificação mecânica proporcionou maiores taxas de germinação *in vitro*.

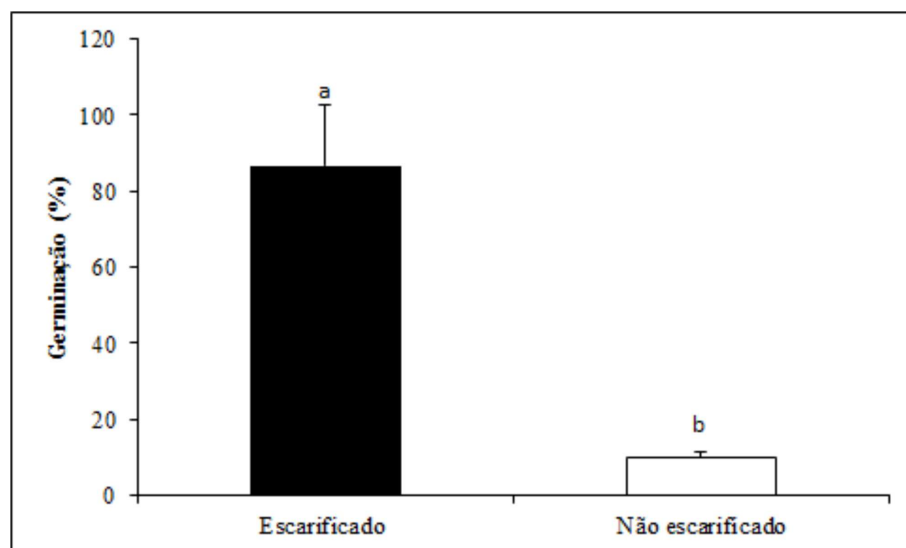


FIGURA 2: Efeito da escarificação no percentual de germinação *in vitro* de sementes de *Desmodium incanum*.

D. incanum e outras espécies do gênero apresentam variabilidade intraespecífica e um forte componente genético para dormência das sementes (VEASEY & MARTINS, 1991). Estes autores apontam algumas questões a serem esclarecidas: a herança da dormência das sementes; o significado adaptativo da heterogeneidade, inter ou intrapopulacional, na natureza; a importância dessa variabilidade para a dinâmica da população de plantas e para a história de vida das espécies. Com muita propriedade, lembram que estudos de correlação entre dados obtidos sob condições controladas e os observados na natureza, possibilitam a compreensão da dinâmica de populações e das estratégias adaptativas das espécies. É comum, em leguminosas, a produção das chamadas sementes duras, ou seja, sementes dormentes em função de seus tegumentos impermeáveis à água. A dormência é uma característica hereditária que nas leguminosas é atribuída à impregnação por suberina (substância impermeável à água) nas células em paliçada da camada exterior do tegumento, especialmente daquelas camadas subcuticulares. Em sementes de um mesmo lote, há variação no grau de impermeabilidade à água, existindo aquelas que a absorvem e outras que se mantêm duras por um intervalo

de tempo variável. A dormência das sementes constitui uma forma de sobrevivência ou adaptação da espécie às condições ambientais, cuja duração é maior nas plantas silvestres do que naquelas cultivadas, as quais já foram selecionadas pelo homem (CARVALHO & NAKAGAWA, 1980).

Os resultados obtidos neste estudo reforçam o que já foi reportado para germinação de *Desmodium* sp. em condições *ex vitro*. Sementes de *D. incanum* escarificadas manualmente foram testadas por MARQUES (1991), obtendo germinação de 88%, sendo que 5% eram sementes duras, e o restante, sementes mortas e defeituosas. VEASEY & MARTINS (1991) comparando várias intensidades de temperaturas alternadas e constantes (15 a 40 °C), concluíram que maiores percentuais de germinação nesta espécie, ocorrem em temperaturas constantes de 20 a 40 °C quando as sementes forem escarificadas com lixa (cerca de 80%, em temperaturas menores o número de sementes viáveis não germinadas foi maior, a temperaturas mais altas, o número de sementes mortas foi mais elevado) e 40 °C para sementes não escarificadas (aproximadamente 60%). Segundo estes autores, os resultados reafirmam que as espécies testadas (*D. incanum*, *Desmodium barbatum* (L.) Benth., *Desmodium discolor* Vog. e *Desmodium tortuosum* (Sw.) DC.) têm ampla distribuição geográfica, pois germinam bem em um amplo intervalo de temperatura.

Teste 3 - Diferentes acessos de *Desmodium incanum*

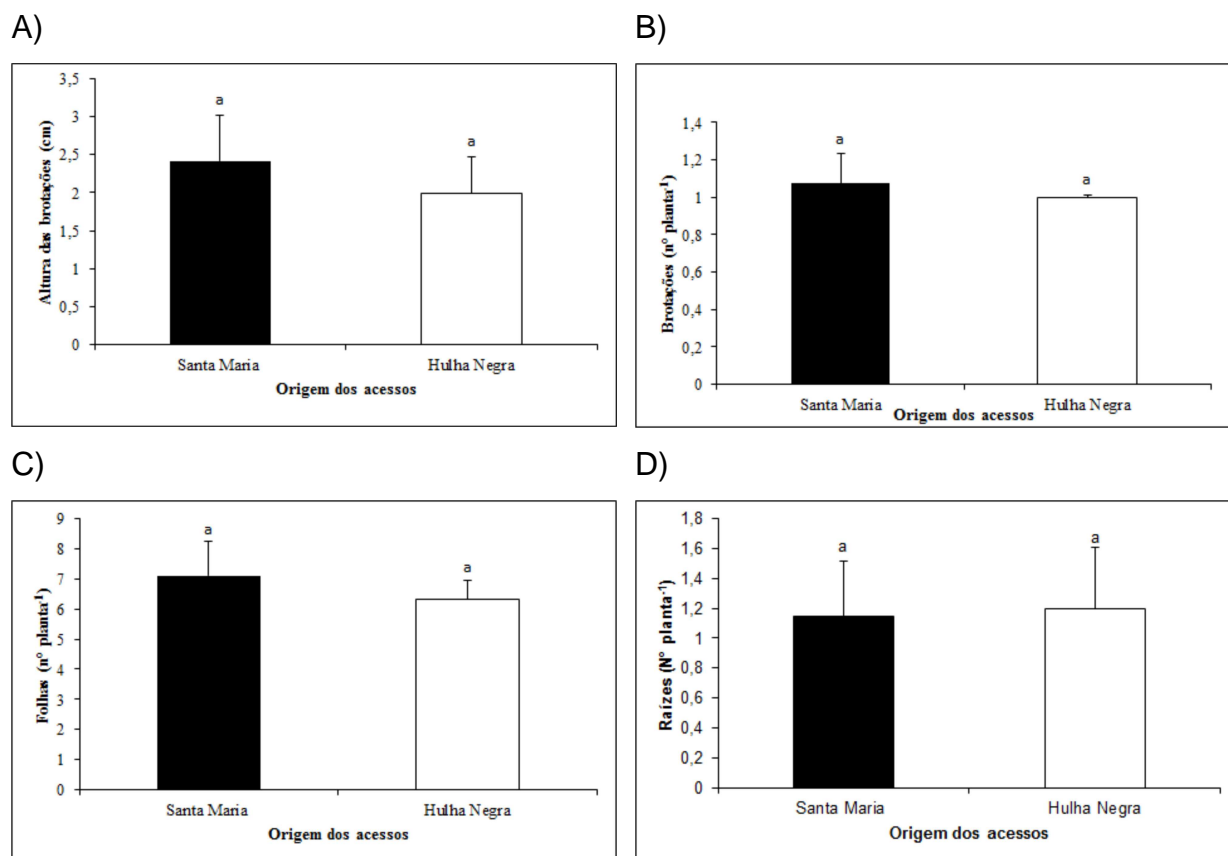


FIGURA 3: Comparação entre dois acessos (Santa Maria e Hulha Negra) de *Desmodium incanum* para as variáveis: altura das brotações (A), número de brotações (B), número de folhas (C) e número de raízes por planta (D).

Os dois acessos de *D. incanum* testado não diferiram significativamente para as variáveis: altura das brotações (Fig. 3A), número de brotações (Fig. 3B), número de folhas (Fig. 3C) e número de raízes por planta (Fig. 3D). Essas observações confirmam que a espécie adapta-se aos mais variados tipos de solo, crescendo bem em solos de média acidez, porém vegeta naqueles muito ácidos (valores de pH entre 4,0 e 4,5) de baixa fertilidade (CORADIN et al., 2011). É encontrada em vários tipos de ambientes, desde locais sombreados ou ensolarados, em mata, cerrado, capoeira, várzea, margens de estrada, dunas, campos e áreas cultivadas, estando adaptada a variadas condições edafoclimáticas (OLIVEIRA, 1990).

CONCLUSÕES

O protocolo adotado para desinfestação de sementes e segmentos nodais foi eficiente, visto que a taxa de contaminação foi baixa. A origem seminal das plântulas de *Desmodium incanum* conferiu melhor estabelecimento em condições de cultivo *in vitro*, comparativamente aos segmentos nodais desta espécie. Constatou-se a necessidade de escarificação mecânica das sementes de *D. incanum* para uma eficiente germinação *in vitro*. Os dois acessos de *D. incanum* não diferiram significativamente para as variáveis testadas. De um modo geral estes resultados confirmam que a técnica da cultura de tecidos vegetais é eficiente e promissora para a propagação e conservação de germoplasma de *D. incanum*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul pelo financiamento do projeto e ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio fornecido ao longo deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G., ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Viçosa: UFV. 442p., 2009.
- BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013.
- BOLDRINI, I.I. **Dinâmica de vegetação de uma pastagem natural sob diferentes níveis de oferta de forragem e tipos de solos, Depressão Central, RS. Porto Alegre**, 1993. 262f. Tese (doutorado em Zootecnia). Faculdade de Agronomia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1993.
- CARVALHO, M.A.F., PAIVA, R., VARGAS, D.P., PORTO, J.M.P., HERRERA, R.C., STEIN, V.C. Germinação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N. E. Brown com escarificação mecânica e ácido giberélico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, 1027-1032, 2012.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes; ciência, tecnologia e produção**. Campinas, Fundação Cargill, 326p.,1980.

CORADIN, L., SIMINSKI, A., REIS, A. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul. **Brasília: MMA**, 934p., 2011.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.47, n.1, p. 5-16, 2011.

FERREIRA, M.G.R. Desinfestação de explantes radiculares de bacurizeiro (*Platonia Insignis* Mart.). **Saber Científico**, v.2 n.56-62, 2009.

HARTMANN, H.T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 915p, 2010.

KÖPPEN, William. 1931. Climatologia. México, Fundo de Cultura Econômica.

MARQUES, M.A.J. **Características agronômicas e reprodutivas de espécies do gênero *Desmodium* Desv.** Porto Alegre, 1991. 75f. Dissertação (mestrado em Zootecnia). Faculdade de Agronomia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.5, p.473-97, 1962.

NACIMENTO, do P.K.V. **Propagação vegetativa de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (VELL.) Arrab. Ex Steud.) por estaquia radicular e miniestaquia**. 2012, 119 f. Tese (doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria.

OLIVEIRA, M.L.A.A. Adições para o gênero *Desmodium Desvaux* (Leguminosae – Faboideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, 40:77-87, 1990.

PENCE, V.C. Evaluating cost for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Wallingford, v.47, n.1, p. 176-187, 2011.

PILLAR, V.P.; MÜLLER, S.C.; CASTILHOS, Z.M.S.; JACQUES, A.V.A. (Eds). Campos Sulinos – conservação e uso sustentável da biodiversidade. **Brasília: Ministério do Meio Ambiente**, 403 p., 2009.

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

RIBEIRO, V.V.; BRAZ, M.S.S.; BRITO, N.M. Tratamentos para superar a dormência de sementes de tento. **Biotemas**, v. 22, n. 4, p. 25-32, 2009.

SARTOR, F.R.; MORAES, A.M.; ALMEIDA, F.A.C. Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. **Revista Agrotecnologia**, v.3, n.1, p.31-39, 2012.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4,n.1, p. 71-78, 2002.

SILVA, R.C., CAMILLO, J. SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. A method for seeding recovery in *Jatropha curcas* after cryogenic exposure of the seeds. **Revista de Biología Tropical**, v. 60, n.1, p. 473-482, 2012.

SOARES, W.S., RÊGO, M.M., RÊGO, E.R., BARROSO, P.A., NASCIMENTO, K.S., FERREIRA, K.T. (2012) Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p. 138-142, 2012.

SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S., MOURÃO, K.S.M. Estruturas de dispersão de frutos e sementes. In: Souza, L. A. (Org.). **Anatomia do fruto e da semente**. Editora UEPG, pp. 196, 2006.

STRECK, E.V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R.S.D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P.C.; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E. & PINTO, L.F.S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. Porto Alegre, EMATER/RS-ASCAR, 222p., 2008.

VEASEY, E.A.; MARTINS, P.S. Variability in seed dormancy and germination potential in *Desmodium* Desv. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Genética**, v.14, n.2, p.527-545, 1991.

ZANOTTI, R.F. et al. Germinação e indução da calogênese *in vitro* de copaíba. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p.987-991, 2012.