

Influencia de campos magnéticos sobre el establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos de *Adenantha pavonina* L.

Nádia Verçosa de Medeiros Rapôso^{1*}, Yilan Fung Boix², Clara Esther Martínez Manrique², Albys Esther Ferrer Dubois², Guillermo Asanza Kindelan², Fidel Gilart Gonzalez². *Autora para correspondencia.

¹Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Tecnologia (EST), Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal. Ave. Darcy Vargas 1620, Parque Dez, CP 69050-020, Manaus, Amazonas, Brasil. e-mail: nadia.mestrinho@gmail.com

²Universidad de Oriente, Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), Departamento de Bioelectromagnetismo. Ave. de las Américas s/n, CP 90400, Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

El cultivo de embriones *in vitro* con fines de tratamiento pre germinativos, permite la aplicación de los campos magnéticos y electromagnéticos de baja frecuencia. La especie *Adenantha pavonina* L. presenta semillas de tegumento impermeable, periodo de latencia largo y difícil germinación. En este trabajo se determinó la influencia de diferentes campos electromagnéticos en el establecimiento y desinfección *in vitro* de embriones cigóticos de *A. pavonina* L. Se realizó la desinfección y escarificación de las semillas con ácido sulfúrico (98%) y ácido bórico (5%). Posteriormente, fueron sometidas a tres tratamientos: sin campo magnético, con campo magnético estático de 95 mT y con campo electromagnético 2mT, 60 Hz y tiempo de exposición de 72 horas. El tamaño de las muestras fue de 25 semillas para cada tratamiento, con tres réplicas. Para el cultivo *in vitro* de los embriones se utilizó el medio de cultivo MS al que se añadió agua de coco. Se evaluó la variable porcentaje de germinación durante un periodo de 30 días. Las semillas después del tratamiento electromagnético no mostraron contaminación por hongos o bacterias. La escarificación ayudó en la hidratación y extracción de los embriones. Se obtuvo un 87.3% de germinación en el tratamiento con campo electromagnético, un 67.7% con campo magnético y para el control un 28%. El trabajo corroboró que la aplicación de los campos electromagnéticos y magnéticos pueden ser utilizados como tratamiento pre germinativo en la especie forestal *A. pavonina* L.

Palabras clave: campo magnético estático, especie forestal, pre germinación.

Influence of magnetic field on the *in vitro* establishment of zygotic embryos of *Adenantha pavonina* L.

ABSTRACT

The *in vitro* embryo culture for pre germinal treatment allows the application of low frequency electromagnetic and magnetic fields. The species *Adenantha pavonina* L. has seeds with a waterproof integument, long latency period and scarce germination success. This work aimed to evaluate the influence of different electromagnetic fields in the disinfection and *in vitro* establishment of zygotic embryos of *A. pavonina* L. Disinfection and seed scarification were performed, with sulfuric acid (98%) and boric acid (5%). The seeds were subjected to three treatments: no magnetic field, static magnetic field of 95 mT and 2mT electromagnetic field at 60 Hz and exposure time of 72 hours. The sample size was 25 seeds for each treatment and experiments were conducted on triplicate. For the *in vitro* culture of embryos medium MS was used supplemented with coconut water as growth regulator. The evaluated variable was the germination percentage over a 30 days period. The results of the disinfection of the seeds in the establishing after the electromagnetic treatment showed no bacterial or fungal contamination. Scarification contributed to the hydrate and extraction of the embryos. A 87.3% germination was obtained in the treatment with electromagnetic field, 67.7% with the magnetic field and 28% germination on the control experiment. The work confirmed that the application of electromagnetic and magnetic fields can be used as pre-germination treatment in the forest species *A. pavonina* L.

Key words: Electromagnetic field, embryos, forest species, static magnetic field, pre germination.

INTRODUCCIÓN

Para la mayoría de las especies forestales amazónicas, son escasos los conocimientos de métodos tecnológicos básicos que podrían ser utilizados por los agricultores en la producción de posturas (Sales de Jesus, 2008).

Los ecosistemas brasileños presentan una gran diversidad y densidad de especies de la familia *Fabaceae* (leguminosas) de gran importancia económica y ecológica. Por ejemplo, *Adenantha pavonina* L. (Ojo-de-dragón, Carolina o Tonto - rojo), pertenece a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Mimosoideae*, es oriunda de Asia tropical. Al ser introducida en Brasil se difundió en todos los estados, principalmente en la región norte donde se encuentra bien adaptada. No es una especie muy exigente en cuanto a las condiciones climáticas, se adapta a cualquier tipo de suelo, desde los más ricos en nutrientes a los más pobres y arenosos. Posee múltiples usos, por ello puede ser utilizada en proyectos de reforestación, paisajísticos, como planta ornamental o para dar sombra, también en la artesanía y como forrajera (Akkasaeng, 1989). Las semillas y madera han sido utilizadas en la medicina popular, específicamente en la fitoterapia para el tratamiento de infecciones pulmonares y oftálmicas crónicas (Fanti, 1996). En el control biológico puede ser empleada como bioinsecticida ya que inhibe las enzimas digestivas de lepidópteros. También suministra madera oscura o castaño-enrojada, pesada, compacta, con venas onduladas, con pequeños poros y de gran durabilidad, por ello se utiliza para la construcción civil y mueblería de lujo. Presenta una altura que varía de 15 a 20 metros, su crecimiento es rápido, tiene una copa redondeada y flores amarillo claro. Debido a estas características es considerada como planta pionero (Camargo *et al.*, 2001)

El tronco se caracteriza por poseer una corteza parda y lisa, con ramas largas y esparcidas que llegan a formar una copa abierta, las inflorescencias de pedúnculos largos, axilares o terminales, en racimos cortos, el período de floración principalmente es en los meses de marzo-abril. Presenta abundante fructificación en la mayor parte del año, los frutos son bayas estrechas, achatadas, de color marrón, espiraladas con 8 a 15 semillas de tamaño

medio (10 x 12 mm). Las semillas son de forma globosas-lenticulares, achatadas, duras, rojo-brillantes con tegumento duro, casi córneo. Presenta una difícil germinación por la presencia de un tegumento coriáceo, con un período de latencia largo, lo que conlleva a un mayor deterioro por factores ambientales externos tales como el ataque de hongos, insectos y pájaros (Hoppe *et al.*, 2004).

En la mayoría de las especies forestales, son escasas las investigaciones científicas relacionadas con la disminución del tiempo de germinación de las semillas, que permitan suministrar información sobre una mejor calidad física y fisiológica. Todo ello dificulta la producción de posturas que pueden ser empleadas para la producción y conservación de germoplasma *in situ* (Rodríguez *et al.*, 2008; Sales de Jesus, 2008).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la influencia de campos electromagnéticos y magnéticos en la desinfección y establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos de *A. pavonina*. Con las plantas resultantes se podría formar parte de un pequeño banco de germoplasma que estaría disponible para la reforestación en el caso de desastres naturales u otros usos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) de la Universidad del Oriente en Santiago de Cuba.

Material vegetal

Se emplearon semillas de *Adenantha pavonina* L. con un 60% de germinación, procedentes de la Empresa Connarus Ambiental Ltda. Renasem 00169/2010 y certificadas por el Ministerio de la Agricultura y Reforma Agraria (MAPA) de Brasil.

Influencia de campos electromagnéticos y magnéticos en la desinfección y establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos de *A. pavonina*

La desinfección de las semillas se realizó según el protocolo descrito por Fung *et al.* (2010), con algunas modificaciones. Para ello,

Las semillas se lavaron con detergente comercial durante 15 minutos, seguidos de tres enjuagues con agua destilada estéril por más de tres minutos. Después, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 6% (v/v) durante 15 minutos en agitación (rpm) y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Para lograr la escarificación química, las semillas se sumergieron en ácido sulfúrico (H_2SO_4) 98% (v/v), durante 30 minutos, seguido de una solución de ácido bórico (H_3BO_3) al 5% (v/v). Luego, fueron lavadas con agua destilada estéril y sometidas a la imbibición por 24 horas.

Después de estos procedimientos las semillas fueron distribuidas en tres grupos experimentales de 25 semillas cada uno y tres réplicas de cada grupo, diferenciados por el tratamiento aplicado como se expone a continuación:

1. Tratamiento 1 (Control): Semillas sin aplicación de tratamiento magnético.

2. Tratamiento 2 (CM): Semillas con aplicación de campo magnético estático a una inducción magnética de 95 mT en dispositivo a imanes permanentes.

3. Tratamiento 3 (CEM): Semillas con la aplicación de campo electromagnético a baja frecuencia con el equipo BIONAK-3 a una inducción magnética de 2 mT, 60 HZ y onda sinusoidal.

Todos los tratamientos con campo electromagnético y magnético se aplicaron durante 72 horas. Ambos dispositivos de tratamiento magnético fueron diseñados y construidos en el CNEA. La geometría y las dimensiones principales (en milímetros) del

sistema de exposición magnética utilizado se muestran en la figura 1. Este consistió en un arreglo de dos imanes permanentes discoidales de ferrita isotrópica conectados en un circuito ferromagnético de hierro puro, diseñado para generar un campo magnético altamente uniforme en la región del entrehierro. Los imanes tenían un diámetro de 110 mm, un grosor de 20 mm, una inducción remanente de 0.1893 T y están separados entre sí a la distancia de par de Helmholtz.

La distribución de la inducción magnética B en la superficie de la mitad de la región de trabajo (un cilindro de 110 mm de diámetro y 20 mm de altura) y las curvas de B a lo largo de las abscisas (los niveles) de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mm medidas desde la superficie de la pieza polar inferior del sistema aparecen en la figura 1B. La muestra se coloca dentro de un cilindro de aproximadamente 70 mm de diámetro, 20 mm de altura y la inducción magnética B con un valor constante de aproximadamente 0.0956 T.

El estimulador electromagnético regional (BIONAK-3) con distribución espacial predeterminada de campos magnéticos en el tiempo utilizado (Figura 2) tenía las siguientes características técnicas: Tensión de la red 220 ± 5 V (trifilar), frecuencia 60 ± 1 Hz, potencia máxima de entrada 28 Kw, cantidad de bobinas tres, frecuencia del campo magnético 10-60 Hz, inducción magnética variable 1.6-15.9 mT, régimen de trabajo continuo y con ondas de formas sinusoidal, media, completa y cuadrada. Es un sistema versátil de exposición electromagnética, el cual puede ser empleado en las investigaciones relacionadas con los estudios de los efectos de campos magnéticos de baja frecuencia sobre organismos vivos.

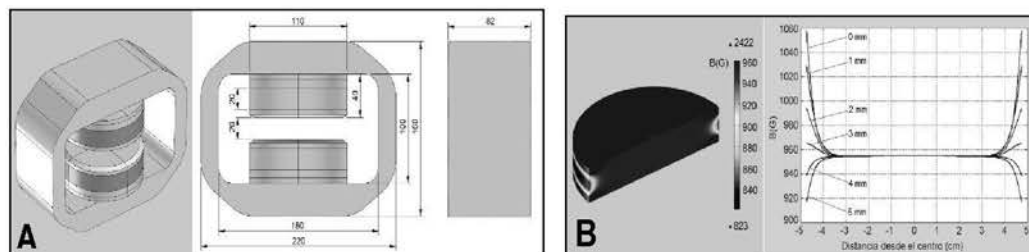


Figura 1. Equipo utilizado en la aplicación del campo magnético estático diseñado y construido en el CNEA (A). Distribución de la inducción magnética B en la superficie de la mitad de la región de trabajo (B).



Figura 2. Estimulador electromagnético regional (BIONAK-3) con distribución espacial predeterminada de campos magnéticos en el tiempo, utilizado en la aplicación de los campos electromagnéticos.

Después de la aplicación de los diferentes tratamientos, las semillas se sumergieron en etanol al 70% (v/v) durante dos minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se procedió a la extracción de los embriones en condiciones estériles en la cabina de flujo laminar. Luego, los embriones obtenidos de cada experimento fueron inoculados en tubos de ensayos que contenían 15 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 3% (m/v) de sacarosa como fuente de carbono, 5 μM de tiamina-HCl, 2.4 μM de piridoxina-HCl, 4.1 μM de ácido nicotínico, 0.6 μM de mio-inositol, agar 7 g l⁻¹ y pH 5.6 antes de la esterilización. Además, se adicionó agua de coco (100 ml l⁻¹). Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 120°C y 1.1 kgf/cm², durante 15 minutos.

Posteriormente, los cultivos fueron conducidos al cuarto de incubación y mantenidos a 25±2°C, humedad relativa del 70%, iluminación con lámparas fluorescentes (Sylvania, Phillips/luz de día) con intensidad de 23.0 $\mu\text{moles cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 16 horas de fotoperíodo. Se cuantificó el número de embriones germinados y se calculó el porcentaje de germinación para cada tratamiento, a los 15 y 30 días después de establecer *in vitro*.

Para evaluar el desarrollo de los embriones, se realizaron observaciones diarias durante un período de 30 días, a partir del segundo día de inoculados. Fueron considerados embriones germinados en el momento en el que surgió la radícula y los primordios foliares empezaron a ser identificados.

Análisis estadístico

Para evaluar si los datos cumplían con una distribución normal se aplicó la Prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con un Análisis de Varianza de Clasificación Simple para un 95% de significación. La comparación de las medias de los tratamientos fue realizada por la prueba de Tukey, mediante el paquete estadístico Statgraphics v. 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de campos electromagnéticos y magnéticos en la desinfección y establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos de *A. pavonina*

Observaciones periódicas durante 30 días, demostraron que la desinfección así como la escarificación de las semillas de *A. pavonina* L. con ácido sulfúrico y ácido bórico, fueron efectivas para todos los tratamientos ya que no apareció contaminación por hongos o bacterias. Además, el ácido bórico contribuyó al ablandamiento del tegumento. Se observó que las semillas sometidas solamente a imbibición no se hidrataron, mientras que las semillas escarificadas con ácido sulfúrico y ácido bórico, tuvieron mejor hidratación, aumentaron de tamaño y cambiaron de coloración de rojo a amarillo. Esto facilitó la extracción segura de los embriones y sin contaminación microbiana.

El protocolo utilizado en semillas de *Rosmarinus officinalis* L. (Fung *et al.*, 2010), en este estudio fue modificado con la adición del ácido bórico, además del agua de coco que se añadió como regulador de crecimiento de origen natural.

En el cultivo *in vitro*, la dureza del tegumento de las semillas, muchas veces favorece la disminución de la contaminación microbiana de los embriones, aunque en condiciones naturales esto es uno de los criterios negativos para la germinación (Scremin-Dias, 2006).

Los resultados de este trabajo corroboran estudios previos con *A. pavonina* y otras especies forestales donde se han empleado diferentes tratamientos para escarificar las semillas con ácido sulfúrico solo o combinado. Por ejemplo, en experimentos realizados por Amoo y Aysire (2005) en *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth, estos autores emplearon la escarificación química con ácido sulfúrico concentrado y lograron una mejor formación de callos y embriogénesis somática.

Igualmente, Sales de Jesus (2008) al utilizar la escarificación mecánica con lija número 100 y tratamiento químico con ácido sulfúrico al 95% en semillas de las especies forestales *A. pavonina* y *Ormosia arborea* Vell. Harms (Ojo de cabra), demostró que con la escarificación química con ácido sulfúrico y el tratamiento con giberelina ($250\mu\text{l l}^{-1}$) se obtuvieron los mejores resultados en la germinación. También confirmó que el tegumento duro en muchas semillas forestales en condiciones naturales puede proteger al embrión contra el ataque de microorganismos.

De igual manera, para romper la latencia de *A. pavonina*, Costa *et al.* (2010) probaron varios tratamientos: 10 minutos en agua hirviendo y reposo por 16 horas, inmersión en agua caliente

(95°C) con reposo por 24 horas y ácido sulfúrico concentrado (98%), durante 5 y 10 minutos, respectivamente. Se concluyó que la inmersión de las semillas en ácido sulfúrico, por 5 y 10 minutos, fue la más favorable para eliminar el período de dormancia, en relación con los demás tratamientos. Los resultados de estos autores confirman las evidencias encontradas en este trabajo.

En contraste, en tres especies de *Parkia* (*P. panurensis*, *P. multijuga* y *P. velutina*), Gonçalves de Melo *et al.* (2011) aplicaron diferentes tratamientos para favorecer la germinación: eliminación del extremo opuesto al embrión de la semilla, eliminación del extremo opuesto del embrión e inmersión en agua por 8 horas, escarificación mecánica del tegumento en esmeril eléctrico e inmersión en agua por 8 horas, punción con aguja caliente e inmersión en ácido sulfúrico (H_2SO_4) por 30, 20 y 15 minutos. Estos autores concluyeron que la escarificación mecánica con esmeril eléctrico en los laterales de la semillas fueron más eficientes para romper la dormancia de las semillas de *P. panurensis* y *P. multijuga* que la escarificación química con ácido sulfúrico en mayor tiempo de inmersión. El tiempo de 20 minutos fue más eficiente para las semillas de *P. panurensis* y *P. velutina* así como para la emergencia de las plántulas.

Con respecto al crecimiento de los embriones cultivados *in vitro* (Figura 3) se observaron a partir del segundo día cambios en cuanto a tamaño y coloración (variaron de amarillo claro o blanco hasta verde). Los embriones de las semillas tratadas con campos electromagnéticos y magnéticos tuvieron mejor desarrollo de los primordios foliares en relación con el control. Además, se comprobó que también en esta especie el agua de coco puede ser empleada como suplemento nutritivo en combinación con el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).

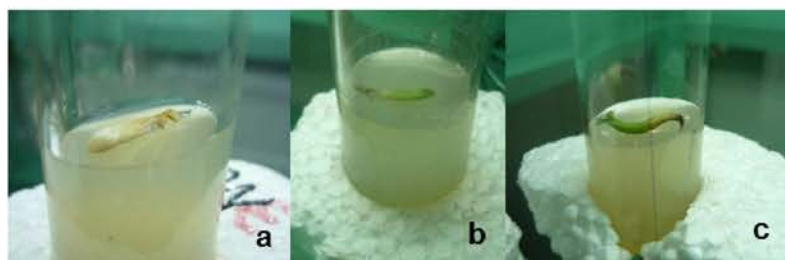


Figura 3. Embriones cigóticos de *A. pavonina* L. con 5 días de cultivo *in vitro* sometidos a tratamientos magnéticos y electromagnéticos. a) Control, b) Campo Magnético Estático, c) Campo electromagnético de baja frecuencia.

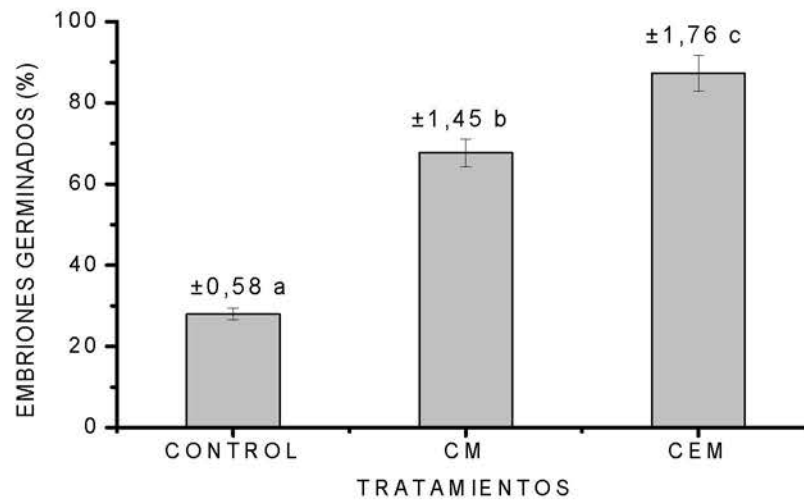


Figura 4. Porcentaje de germinación *in vitro* de embriones cigóticos de *A. pavonina* L. sometidos a campos magnéticos y electromagnéticos. CEM: Campo Magnético Estático, CM: Campo Electromagnético. Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey para $P < 0.05$, \pm Error Estándar.

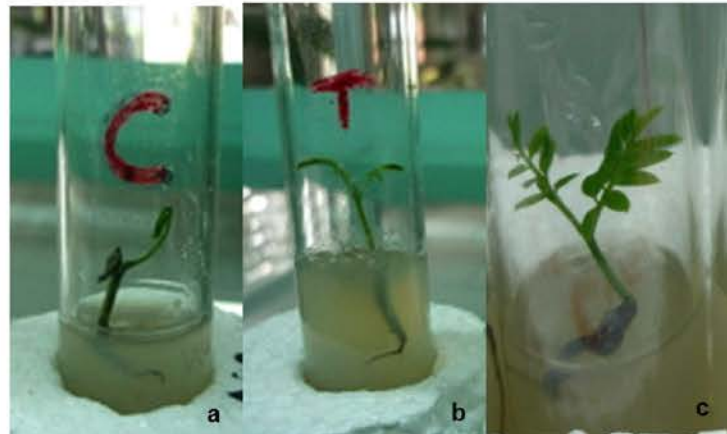


Figura 5. Plantas obtenidas *in vitro* a partir de la germinación de embriones cigóticos de *A. pavonina* L. sometidos a campos magnéticos y electromagnéticos después de 27 días de cultivo a) Control, b) Campo Magnético Estático, c) Campo Electromagnético baja frecuencia.

La germinación de los embriones cigóticos tuvo lugar en los primeros 15 días de establecimiento *in vitro*, y posteriormente no se apreció más hasta después de 30 días de cultivo.

El mayor valor del porcentaje de germinación de los embriones cigóticos de *A. pavonina* a partir de los resultados del análisis de varianza de clasificación simple ($P < 0.05$) se obtuvo con la aplicación del campo electromagnético de 2 mT ($87.3 \pm 1.76\%$), seguido del campo magnético estático de 95 mT y ambos tratamientos con valores superiores al control

(Figura 4). Los embriones germinados dieron lugar a plantas *in vitro* después de 27 días de cultivo (Figura 5).

En la literatura científica consultada no se encontraron referencias del uso de tratamiento magnético de semillas para estimular la germinación de embriones cigóticos de esta especie vegetal. Los resultados de este estudio sientan las bases para nuevas investigaciones que contribuyan al conocimiento del efecto del tipo de tratamiento, dosis de aplicación así como de los mecanismos de acción. Todo ello

conducirá al diseño de estrategias que permitan su aplicación y generalización.

Sin embargo, la estimulación de la germinación de semillas mediante tratamientos magnéticos ha sido empleada en otras especies de plantas en los últimos años. Por ejemplo, Isaac *et al.* (2001) estimularon el crecimiento de los embriones cigóticos de *Pinus cubensis* y redujeron considerablemente el período de germinación. Por su parte, Podleony *et al.* (2005), trataron semillas de *Pisum sativum* con diferentes inducciones magnéticas de 30 y 80 mT durante 15 segundos y lograron un aumento significativo en el rendimiento de la producción por planta y disminución del período germinativo.

Igualmente, De Souza *et al.* (2006), utilizaron tratamiento pre-germinativo en semillas de *Lycopersicon esculentum* Mill. con un equipo electroimán de 100mT(rms) por 10 minutos y 170mT (rms) durante tres minutos. Estos autores obtuvieron plantas más resistentes a los microorganismos y mayor tasa de crecimiento con respecto a las plantas originadas de semillas no tratadas. Además, los frutos tuvieron mayor rendimiento.

Otros autores como Vashisth y Nagarajan (2008) lograron mejores resultados en la germinación, al exponer semillas de *Cicer arietinum* L. a 50 y 150 mT durante 2 horas y 100 mT por 1 hora. Las posturas de un año de cultivo aumentaron en la masa seca, longitud, volumen y superficie de la raíz. También Nimmi y Madhu (2009) aplicaron campos magnéticos de baja frecuencia (62 μ T) en *Capsicum annum* L. con diferentes tiempos de exposición (4, 8, 12 y 24 horas) y lograron un aumento significativo en la germinación y crecimiento inicial de las semillas tratadas con respecto a las no tratadas.

Más recientemente, Fung *et al.* (2010), realizaron tratamientos pregerminativos en semillas de *Rosmarinus officinalis* L., utilizando una inducción magnética de 0.06 T y obtuvieron un mayor porcentaje de supervivencia (80%) en las semillas tratadas con respecto al control (25%).

CONCLUSIONES

En las condiciones experimentales que se desarrolló esta investigación, los campos

magnéticos y electromagnéticos sobre los embriones *in vitro* de *A. pavonina* L. tuvieron efectos positivos en la germinación; así como en el mejor desarrollo de los primordios foliares para la obtención de plantas *in vitro*. A pesar de que existen pocas referencias de la utilización de tratamientos magnéticos en el cultivo *in vitro* de especies forestales amazónicas, los resultados demuestran que pueden ser empleados para lograr un menor tiempo en la germinación y así obtener mayor número de plántulas que puedan ser empleados en diferentes usos. Además, se demostró que los campos magnéticos estáticos y electromagnéticos asociados a las técnicas biotecnológicas del cultivo *in vitro*, pueden ser empleados como herramienta para mejorar la germinación, desarrollo y rendimiento de especies forestales.

AGRADECIMIENTOS

Al Gobierno del Estado do Amazonas, que posibilitó la realización de este estudio. Al Profesor MSc. Mário Augusto Figueiredo Bessa director de la Escola Superior de Tecnologia de la Universidade de Estado de Amazonas (EST/UEA). Al Centro Nacional de Eletromagnetismo Aplicado (CNEA) de la Universidad de Oriente en Santiago de Cuba, en especial al equipo de Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

REFERENCIAS

- Akkasaeng R (1989) Evaluation of trees and shrubs for forage and fuelwood in Northeast Thailand. *International Tree Crops Journal* 5: 209-220
- Amoo, SO, Aysire BE (2005) Induction of callus and somatic embryogenesis from cotyledon explants of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. *African Journal of Biotechnology* 4: 68-71
- Atak Ç, Çelik Ö, Olgun A, Alikamanoğlu S, Rzakoulieva A (2007) Effect of magnetic field on peroxidase activities of soybean tissue culture. *Biotechnol Biotechnol* 21: 166-177
- Camargo Lopes Fonseca S, Gualtieri de Andrade Peres SCJ (2001) Germinação de sementes de olho-de-dragão (*Adenantha pavonina* L.): ação de poliaminas na atenuação do estresse salino. *Revista Brasileira de Sementes* 23: 14-20
- Costa PA, Lima AL da S, Zanella F, Freitas H de (2010) Quebra de dormência em sementes de *Adenantha pavonina* L. *Pesq. Agropec. Trop. Goiânia* 40: 83-88

- De Souza A, Garcia D, Sueiro L, Gilart F, Porras E, Licea L (2006) Pre-Sowing magnetic treatments of tomato seeds increase the growth and yield of plants. *Bioelectromagnetics* 27: 247-257
- Fanti SC (1996) Comportamento germinativo sob condições de estresse e do sombreamento artificial e adubo químico na produção de mudas de *Adenantha pavonina* L. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, pp.153
- Fung Boix Y, Pimentel Victorio C, Salgueiro Lage CL, Alfarge Defaveri AC, Oliveira Arruda R, Sato A (2010) Efecto de la aplicación de un campo magnético sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Rosmarinus officinalis* L. *Biotecnología Vegetal* 10: 105-111
- Gonçalves de Melo M da G, De Mendonça MSPN, Da Silva Mendes AM (2011) Superação de dormência em sementes de três espécies de *Parkia* spp. *Revista Brasileira de Sementes* 33: 533 – 542
- Hoppe, JF (2004) Produção de sementes e mudas florestais, Caderno Didático nº 1, 2ª ed. / Organizador. Universidade Federal de Santa Maria, RS – Programa de Pós-Graduação em Engª Florestal. 388
- Isaac, E, Ferrer A, Fung Y (2001) Influencia sobre la callogénesis de embriones de *Pinus cubensis* del tiempo de exposición al campo magnético. *Rev. Tecn. Qca.* 21: 93-95
- Nimmi, V, Madhu G (2009) Effect of pre-sowing treatment with permanent magnetic field on germination and growth of chilli (*Capsicum annum*. L.). *Int. Agrophysics* 23: 195-198
- Nunes, CF (2008) Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão - manso. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 9-14
- Podleony, J, Pietruszewski S, Podleona A (2005) Influence of magnetic stimulation of seeds on the formation of morphological features and yielding of the pea. *Int. Agrophysics* 19: 61-68
- Rodrigues Oliveira, J, De Freitas Duarte N, De Oliveira Fassio P (2008) Análise dos teores de clorofila e carotenóides como indicadores de fitotoxicidade de herbicidas em *Toona ciliata* var. australis. I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET Bambuí. Bambuí/MG
- Sales de Jesus Soares, F (2008) Aplicação da giberelina líquida na superação da dormência, germinação e crescimento inicial de espécies florestais. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. – Bahia, pp 1-80. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas
- Scremin-Dias, E (2006) Produção de mudas de espécies florestais nativas. Ed. UFMS. Campo Grande. Brazil
- Vashisth, A, Nagarajan S (2008) Exposure of seeds to static magnetic field enhances germination and early growth characteristics in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Bioelectromagnetics* 29: 571-578
- Villa, F, Pasqual M, De Faria Freitas G (2010) Optimização de um protocolo para micropropagação da oliveira Ascolano 315. *Rev. Ceres* 57: 530-534

Recibido: 22-5-2013

Aceptado: 21-6-2013