



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

ROSILÂNDIA SILVA DE ALMEIDA

**GERMINAÇÃO E VIGOR DAS SEMENTES DE *Leucaena leucocephala*
UTILIZANDO O MELADO DA CANA-DE-AÇÚCAR COMO MEIO
ALTERNATIVO**

SUMÉ-PB

2017

ROSILÂNDIA SILVA DE ALMEIDA

**GERMINAÇÃO E VIGOR DE SEMENTES DAS *Leucaena leucocephala*
UTILIZANDO O MELADO DA CANA-DE-AÇÚCAR COMO MEIO
ALTERNATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Verônica Silva do Nascimento

SUMÉ-PB

2017

A447g Almeida, Rosilândia Silva de.
Germinação e vigor das sementes de *Leucaena leucocephala* utilizando o melado da cana-de-açúcar como meio alternativo. / Rosilândia Silva de Almeida. - Sumé - PB: [s.n], 2017.

41 f.

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 Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Biotecnologia - Bioprocessos. 2. Semente de *Leucaena leucocephala*. 3. Cana-de-açúcar. I. Título.

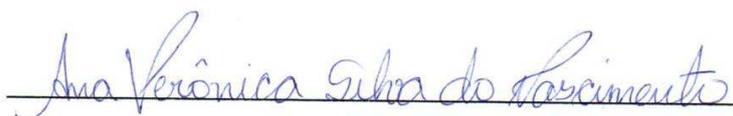
CDU: 631.53.01 (043.1)

ROSILÂNDIA SILVA DE ALMEIDA

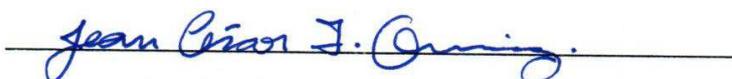
**GERMINAÇÃO E VIGOR DAS SEMENTES DE *Leucaena leucocephala*
UTILIZANDO O MELADO DA CANA-DE-AÇÚCAR COMO MEIO
ALTERNATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Federal de Campina Grande como parte das exigências do Programa do Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, para obtenção do título de Bacharel.

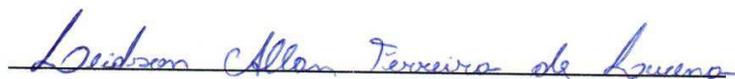
BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a Dr.^a. Ana Verônica Silva do Nascimento
Orientadora - UAEB/CDSA/UFCG



Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz
I Examinador - UAEB/CDSA/UFCG



Ms. Leidson Allan Ferreira de Lucena
II Examinador - UAEB/CDSA/UFCG

Aprovado em: 18 de setembro de 2017

Dedico este trabalho a **Deus** por ser a força essencial na minha vida principalmente nas horas de angústia. Aos meus pais e aos meus irmãos por acreditarem em mim e pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus que iluminou e me protegeu durante esta caminhada.

Aos meus pais, Rozeno e Severina Antônia que proporcionaram a chance de estudar e sempre estiveram rezando por mim para que pudesse suportar os momentos difíceis, apoiando nas minhas decisões e aconselhando para o bem. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Romerio, Rogério e Márcia pelo apoio, risadas e frases de motivação. Principalmente meu mano Romerio que esteve mais presente me apoiando nas escolhas.

Aos meus avós maternos/padrinhos Antônia (in memoriam) e Manoel que sempre contribuíram para formação do meu caráter com conselhos, ensinamentos e sempre tiveram presentes quando precisei. Obrigada por estarem sempre ao meu lado!

Aos meus avós paternos Maria (in memoriam) e Miguel (in memoriam) pelo carinho, histórias e ensinamentos.

Aos meus tios e tias por todo carinho e por estarem sempre presente na minha vida, em especial a Tia Severina, Tia Zefinha (in memoriam), Tia Verônica, Tia Maria, Tio Zé e Tia Diolinda pelo amor e por me apoiar durante a jornada.

A minha madrinha Ivone pelas orações e conselhos durante desse tempo.

Aos meus primos Suely, Gabriel, Thalita, Jean, Aldaiane, Dany, Danielma, Alcione, Jerison, Josy e Junior que sempre acreditaram no meu potencial e me ajudaram durante a minha vida.

A todos da minha família pelo apoio incondicional, pelo amor e por sempre acreditarem em mim.

A minha querida orientadora Dr^a. Ana Verônica Silva do Nascimento, por toda a contribuição, orientação, motivação, amizade, confiança e oportunidade de elaboração desse trabalho e pela paciência em ser minha orientadora durante esse tempo. Muito obrigada!

Ao técnico Laidson Allan Ferreira de Lucena por toda ajuda, esclarecimento prestado e contribuição na elaboração desse trabalho por que sem sua ajuda teria sido impossível completa-lo. Obrigada por tudo!

Aos professores da banca examinadora, Jean Queiroz e Leidson Lucena, pela disponibilidade, avaliação e observações feitas neste trabalho.

Aos meus amigas/irmãs Izabela Campos e Luana Braz pelos anos de convivência diária, nas dificuldades e alegrias. Izabela por todas as risadas e conversas boas, companheira de todas as horas... Agradeço a ajuda nos trabalhos, estudos e principalmente no meu TCC. Agradeço por me aguentar nesses 10 anos de amizade e por estar do meu lado em cada momento vivido, sobretudo nos momentos difíceis da minha vida. Luana por sempre em aconselhar durante minha caminhada acadêmica, brincadeiras, risadas, por acreditar sempre no meu potencial! Luh muito obrigada!

A minha amiga Eryka por me ouvir sempre na agonia e acalmar meu coração, contribuir com meu crescimento pessoal e profissional acreditando no meu potencial mesmo quando não acreditei... Não me abandonou, mesmo de longe sempre perto segurando na minha mão. Te adoro muito!

Aos meus amigos Ozires e Arlene que me ajudaram com meu trabalho. Arlene muito obrigada por ficar comigo nessa batalha, pela força e motivação para aguentar cada etapa. Ozires obrigada por me estender à mão nos momentos que mais precisei e por ser esse amigo presente.

Agradeço a Valdenor Ferreira (Nozin) de forma especial por me fazer rir durante esse período tão tenso, pelo carinho e força. Por sempre acreditar que seria capaz!

Aos meus amigos da Igreja e irmãos de EJC, em especial Marcelo, Rayanne e Juliana.

As meninas Joanny, Vanessa e Edgleiga pelas boas risadas e conversas durante o curso. Que nossa amizade continue por anos.

A todos os meus colegas de curso pela amizade, companheirismo e risadas durante todo esse período. Em especial Renato, Anderson, Ozires, Vanessa, Gleiga, Joanny, Eryka, Débora, Thalita, João, Sendy, Jéssica R. e Jéssika por ser irmãos de vida.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica, em especial agradeço a Jean, Franklin, Ana verônica, Glauciane, Adriano, Mérgia, Normanda, Ana Mary e Rafael. Sou grata a Rafael e Ana verônica pelas oportunidades de trabalho.

A todos os funcionários que fazem parte do Campus de Sumé- (CDSA), principalmente a Cristiano, João Farias, Patrícia e Mel.

Em fim, a todos que realmente torceram por mim e contribuíram para eu pudesse vencer mais uma etapa na minha vida.

*Nunca ores suplicando cargas mais leves, e
sim ombros mais fortes.*

Santo Agostinho

RESUMO

A *Leucaena leucocephala* é nativa da América Central, e tem sido introduzida em diversos biomas do Brasil. Economicamente, *L. leucocephala* é muito utilizada como forrageira na alimentação dos animais. Por se adaptar facilmente a climas mais secos ela tem se proliferado rapidamente em regiões do semiárido brasileiro. Assim, realizamos um experimento de germinação *in vitro* sobre diferentes métodos de quebra de dormência das sementes e tipos de concentração do melado da cana-de-açúcar como meio alternativo para verificar a tolerância da espécie nos diferentes níveis de concentração de nutrientes. Os frutos foram coletados no mês de Julho de 2017, no município de Sumé. Analisamos dois tipos de quebra de dormência para as sementes submetidas à escarificação mecânica: 1) sementes imersas com água destilada; e 2) sem imersão em água destilada. Para a propagação germinativa foram usadas as concentrações de meio nutritivos alternativos com ágar em 3 níveis de teor de açúcar do melado (1%, 5% e 10%), sendo mais uma solução controle. Foram avaliados os seguintes parâmetros de germinação: Primeira Contagem de Germinação (PCG), Germinação (G%), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Tempo Médio de Germinação (TMG). Análise de Variância Fatorial ($\alpha = 0,05$) foi realizada para verificar se existiam diferenças entre os tipos de imersão (com e sem água) e tipos de concentrações do melado. Além disso, uma análise de regressão linear foi realizada para verificar se existia alguma correlação entre o teor de açúcar (grau Brix), o PCG e o TMG. Os resultados dos testes evidenciaram que nas maiores concentrações do melado da cana-de-açúcar (5% e 10%), para os tipos com e sem imersão em água, as sementes de *L. leucocephala* tiveram uma maior dificuldade em germinar. Porém, as sementes imersas em água foram mais tolerantes as altas concentrações do melado. Os resultados apresentados nesse trabalho indicam que a espécie estudada é resistente a áreas mais secas e de baixo teor de nutrientes.

PALAVRAS-CHAVES: *Leucaena leucocephala*. Dormência. Meios nutritivos. Germinação.

ABSTRACT

The *Leucaena leucocephala* and have been introduced in different biomes of Brazil. *L. leucocephala* is very used as forage species in animals foods. This species is easily adapted in dry regions. It has spread in diverse areas of semi-arid of Brazil. Thus, we realized an experiment of *in vitro* germination where were tested different methods of dormancy breaking with seeds and types of sugarcane molasses as alternative substrate. The seeds were collected in July of 2017. We analysed two types of dormancy breaking to seeds of *L. leucocephala*. The first breaking was in mechanical scarification immersed with water; and second breaking was in mechanical scarification without immersed with water. To germinative propagation was used three levels sugarcane molasses concentration with agar (1%, 5%, and 10%), more one control solution. Were evaluated four parameters of germination: First Germination Count (FGC), Germination (G%), Speed Germination Index (SGI), and Germination Mean Time (GMT). Analysis of Variance Factorial ($\alpha = 0,05$) was realized to verify if significant differences between the types dormancy breaking (with and without water) and sugarcane molasses. Regression analysis was conducted to verify if correlation between sugar content (Brix), and FGC, and GMT. The results showed that in major concentrations of sugarcane molasses (5%, and 10%) to dormancy breaking of immersion water had difficulty in germinate. However, the seeds with immersion water were more tolerant in high sugarcane molasses concentrations. The results presented indicated that species studied is more resistant in dry areas and low nutrients concentrations.

KEY WORDS: *Leucaena leucocephala*. Dormancy. Nutritive substrate. Germination.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A:** *Leucaena leucocephala* planta arbórea de onde foram coletados os frutos no município de Sumé; **B:** Infrutescência mostrando as vagens amadurecidas com as sementes.....24
- Figura 2. A:** Procedimento de escarificação mecânica com lixa 120; **B:** Sementes depois de escarificadas com (placa de Petri à direita) e sem imersão (placa de Petri à esquerda) na água destilada.....25
- Figura 3.** Exemplo de concentrações preparada para o meio nutritivo (controle, 1%, 5% e 10%) para quebra de dormência escarificada com imersão água destilada.....27
- Figura 4.** Exemplo da medição do comprimento da radicular das plântulas de *L. leucocephala*.....29
- Figura 5.** Percentual das Primeiras Contagens de Germinação (PCG) das sementes de *L. leucocephala* em função do grau Brix nas diferentes concentrações de melado,.....32
- Figura 6.** Percentual do Índice de Velocidade Germinação (IVG) das sementes de *L.leucocephala* em função da concentração do meio alternativo nas diferentes concentrações de melado.....35
- Figura 7.** Tempo médio de germinação (TMG) em horas das sementes de *L. leucocephala* em relação ao teor de açúcar em grau Brix das concentrações de meio.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de melado em relação aos graus Brix de cada tratamento.....	27
Tabela2. Análise do Teste de Levene para normalidade dos dados das médias.....	32
Tabela 3. Percentual das variâncias das médias de germinação das sementes <i>L. leucocephala</i> submetidas aos métodos de quebra de dormência por escarificação (sem e com água) em relação às concentrações de meio alternativo para (controle, 1%, 5% e 10%).....	34
Tabela 4. ANOVA Fatorial entre os Índices de Velocidade de Germinação para as sementes de <i>L. leucocephala</i> e as concentrações de meio alternativo.....	36
Tabela 5. Teste de Tukey HSD comparando as médias dos tratamentos alternativos para o índice de velocidade de germinação - (IVG) das sementes.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Atm	Atmosfera
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do semiárido
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
C	Controle
°C	Graus Celsius
CCI	Controle com imersão em água destilada
CI-1%	1% de melado com imersão em água destilada
CI-5%	5% de melado com imersão em água destilada
CI-10%	10% de melado com imersão em água destilada
C.H₂O	Tratamento com água destilada
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
G%	Porcentagem de germinação
GL	Grau de liberdade
IVG	Índice de velocidade de germinação
LACTV	Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais
PCG	Primeira contagem de germinação
QM	Quadrado Médio
SCI	Controle sem imersão em água destilada
SI-1%	1% de melado sem imersão em água destilada
SI-5%	5% de melado sem imersão em água destilada
SI-10%	10% de melado sem imersão em água destilada
S.H₂O	Tratamento sem água destilada
TMG	Tempo médio de germinação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVOS.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1 <i>Leucaena leucocephala</i>	19
3.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS.....	20
3.3 MEIOS ALTERNATIVOS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS.....	21
3.4 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E QUEBRA DE DORMÊNCIA EM SEMENTES.....	22
4 MATERIAL E METODOS.....	24
4.1 COLETA E SELEÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Leucaena leucocephala</i>	24
4.2 QUEBRA DE DORMÊNCIA E ASSEPSIA DAS SEMENTES.....	25
4.2.1 Preparo do melado.....	26
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	26
4.4 MEDIÇÕES APÓS A GERMINAÇÃO.....	27
4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERENCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A *Leucaena leucocephala* é uma espécie nativa da América Central, pertencente a família Fabaceae (Leguminosae), popularmente conhecida como “leucena”, é uma espécie forrageira que pode alcançar até 6 metros de altura e produz uma grande quantidade de sementes, resistente a seca e que tem se tornado uma espécie invasora no Brasil (AMORIN, 2014; PROJETO VERDE, 2015). A leucena é uma espécie perene de porte arbustivo arbóreo que apresenta um poderoso e profundo sistema radicular que lhe permite retirar a água disponível a muitos metros abaixo do solo. Além disso, é capaz de absorver grandes quantidades de compostos nitrogenados presentes no solo devido à simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* (VIANA, 2001).

É uma planta de crescimento inicial lento e que se mantém verde em épocas de seca perdendo folíolos somente em secas prolongadas ou sobre fortes geadas, ela tem sido muito utilizada na recuperação de áreas degradadas (LAFETÁ *et al.*, 2009). No entanto, por se tratar de uma espécie não nativa, torna-se necessário entender os mecanismos de germinação, crescimento e fisiologia da espécie antes de ser inserida em áreas que ela não seja nativa, buscando evitar impactos causados por espécies exóticas nos ambientes naturais (SIQUEIRA, 2006).

A Cultura de tecidos vegetais conhecida também como micropropagação, é uma ferramenta que tem grande finalidade no aumento da variabilidade genética das espécies vegetais e auxilia a entender mecanismos adaptativos da planta frente a condições de alterações do meio em que estão inseridas (ANDRADE, 2002). Nas últimas décadas, a cultura de tecidos vegetais vem sofrendo grande impulso, sendo sua utilização rotineira em muitas empresas no ramo agroflorestal. O principal motivo deste avanço é por ser uma ferramenta tecnológica viável para a produção de mudas de alto padrão genético, fisiológico e sanitário (BASSAN, 2006). Embora seja uma tecnologia que apresente uma série de vantagens, quanto ao produto final, às técnicas de cultivos *in vitro* de plantas ainda são consideradas dispendiosas, principalmente, pela aquisição e manutenção de equipamentos laboratoriais, como o uso de reagentes de elevado grau de pureza, para o preparo dos meios nutritivos (RIBEIRO *et al.*, 2012), desta forma, técnicas mais baratas são necessárias. Santana *et al.* (2009) relatam que um dos meios alternativos mais baratos no cultivo *in vitro* de tecidos e órgãos vegetais são os derivados do processamento da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).

Os derivados do processamento da cana-de-açúcar possuem um alto valor nutricional, como componente de meios nutritivos para cultivos *in vitro* (DHAMANKAR, 1992). O caldo de cana ou a garapa é o nome que se dá ao líquido extraído da cana-de-açúcar no processo de moagem. O caldo é um alimento muito energético, assim como a rapadura que é feita através de processamento após a concentração do caldo. Do caldo da cana são feitos o melado e o açúcar mascavo (FAVA, 2004). O melado da cana-de-açúcar é composto, em sua maioria, por açúcares, representando cerca 62% dos componentes químicos totais, dentre eles: a sacarose (32%), a glicose (14%) e a frutose (16%). Os demais componentes são: água (20%), materiais nitrogenados e ácidos livres e ligados (10%), bem com compostos inorgânicos (8%), incluindo alguns macronutrientes e micronutrientes (OLBRICH, 2006). Olbrich (2006) relata que este composto possui diversos tipos de nutrientes essenciais para o desenvolvimento de espécies vegetais.

Considerando que *Leucaena leucocephala* possui importâncias econômicas e ecológicas, principalmente por esta espécie ser considerada invasora em diversos biomas no Brasil, realizamos testes de cultivos *in vitro* junto a dois tipos de quebra de dormência e diferentes concentrações com o melado da cana-de-açúcar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

Avaliar a germinação *in vitro* de *Leucaena leucocephala*, variedade tipo Havaiano, e os dois métodos de quebra de dormência das sementes. Observando o desenvolvimento inicial das plântulas com o melado da cana-de-açúcar como meio alternativo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar dois tipos de quebra de dormência das sementes escarificadas mecanicamente: com imersão e sem imersão água destilada;
- ✓ Avaliar o processo de germinação *in vitro* de sementes de *L. leucocephala* nos diferentes meios de cultura produzidos;
- ✓ Avaliar a influência de diferentes concentrações do melado para o desenvolvimento inicial das plântulas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 *LEUCAENA LEUCOCEPHALA*

Leucaena leucocephala conhecida popularmente como “leucena” é uma espécie nativa da América Central e foi introduzida no Brasil de maneira acidental (AMORIN, 2014). A espécie pertence à família Fabaceae (Leguminosae) que possui uma maior diversidade no bioma da Caatinga contendo 2.735 espécies identificadas na região (AMORIN, 2014). Esta espécie é arbórea e possui fácil disseminação por produzir grandes quantidades de sementes viáveis à dispersão (OLIVEIRA, 2008), tendo vantagem de colonizar novas áreas e se adaptar em estações de secas prolongadas devido as suas raízes que são profundas (OLIVEIRA, 2008).

No Brasil, são conhecidos três tipos (LIMA; EVANGELISTA, 2001), que são: (i) o **havaiano**, caracterizado por plantas arbustivas, de até 5 m de altura, florescem de 4 a 6 meses durante o ano, as sementes são abundantes e apresentam pouca produção de madeira e folhas; (ii) o segundo tipo é o **salvador**, que exhibe plantas altas, com até 20 m de altura, folhas grandes, com troncos grossos, produz mais do dobro de biomassa que o tipo havaiano. Membros deste tipo são utilizados na produção de madeira e carvão vegetal, sendo este grupo muito usado nos sistemas silvopastoris; e (iii) é o tipo **peru**, com plantas de até 15 m de altura, ramificadas com grande quantidade de folhagem e tendo pouco material lenhoso. Essa variedade tem sido bastante empregada na pastagem animal.

Essa espécie apresenta potencial invasor devido ao seu crescimento rápido, a produção de sementes em grande quantidade e tolerância a diversos ambientes. Wietholter (2007) discute que a espécie de *L. leucocephala* se tornou invasora no Brasil devido ao forte poder de competição com outras espécies, causando uma exclusão de espécies nativas de várias regiões do Brasil. A competição entre espécies ocorre quando duas ou mais espécies habitam o mesmo nicho ecológico e consomem os mesmos recursos, como luz, água e nutrientes (WIETHOLTER, 2007).

No Nordeste, *L. leucocephala* tem sido utilizada na regeneração de sistemas florestais (LINS *et al.*, 2007), principalmente, por apresentar bons desenvolvimentos dos indivíduos de maneira mais rápida. Quando comparada às características de densidade da madeira, o rendimento gravimétrico de carbonização e os teores de carbono fixo de espécies nativas do semiárido brasileiro (DRUMOND; RIBASKI, 2010). Leucena também tem sido utilizada na melhoria de solos, forragem e adubo orgânico (LINS *et al.*, 2007). Além disso, por ser uma forrageira típica, ela é bastante usada na alimentação animal por ser rica em proteínas (JESUS

et al., 2014; TELES *et al.*, 2000). Outra vantagem é que se associam aos fungos micorrízicos, promovendo desenvolvimento da planta na absorção de nutrientes e viabilizando a utilização do fósforo, nutriente não muito disponível em grandes culturas (DRUMOND; RIBASKI, 2010).

3.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A Cultura de tecidos vegetais, conhecida também como micropropagação, é uma ferramenta que tem grande finalidade no aumento da variabilidade genética das espécies vegetais (ANDRADE, 2002). A cultura *in vitro* de plantas tem como alvo desenvolver tecidos vegetais separados de um organismo em condições assépticas e é uma das ferramentas utilizadas na biotecnologia (REIS, 2008). A Técnica é usada para a multiplicação de mudas no curto período de tempo, diferente de outros procedimentos de propagação (ROCHA; QUOIRIN, 2004).

Os primeiros trabalhos com cultura de tecidos ocorreram no século XIX (GUIMARÃES, 2016). Porém, só no ano de 1902 que o botânico fisiologista Haberlandt foi o primeiro pesquisador a mencionar a totipotencialidade nos tecidos vegetais (PEREIRA; MELO, 2017). Haberlandt observou que as células e tecidos vegetais possuem uma capacidade de se organizarem em um novo indivíduo sobre diversos estímulos apropriados, atribuindo a esta característica de totipotência vegetativa (SILVA, 2016). Desta forma, para expressar o potencial de desenvolvimento das células vegetais, as mesmas devem ser induzidas em condições de cultivos adequadas, decisivos para a diferenciação e regeneração destes tecidos (PÁDUA, 2012). O cultivo é feito através de um explante, segmento de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*, que responda às condições do meio de cultura (FERREIRA, 2012).

Nas últimas décadas, a cultura de tecidos vegetais vem sofrendo grande impulso, sendo sua utilização rotineira em muitas empresas do ramo florestal. O principal motivo deste avanço é por ser uma ferramenta tecnológica viável para a produção de mudas de alto padrão genético, fisiológico e sanitário (BASSAN, 2006). A propagação vegetativa *in vitro* vem se destacando, como ferramenta para a implantação de florestas clonais, substituindo as práticas convencionais por técnicas que passaram a garantir a superioridade genética dos indivíduos (MAMEDES, 2013). Silva (2016) menciona que a cultura *in vitro* possui vantagens econômicas como, por exemplo: (i) a rapidez com que se obtém um grande número de mudas em instalações reduzidas; (ii) e a obtenção de plantas livres de doenças e pragas, reduzindo a

dispersão de organismos fitoparasitas. Uma das desvantagens são a redução da diversidade genética e os impactos ecológicos ocasionados, direta e indiretamente, nos ecossistemas da região (SILVA, 2016).

Algumas das aplicações da cultura de tecidos vegetais estão relacionadas à conservação de germoplasma asséptico, multiplicação de genótipos superiores, cultura de embriões, germinação de sementes, aceleração de programas de melhoramento e estabilidade genética e aumento da variabilidade (FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998; SILVA, 2016). Desta maneira, as técnicas de cultura *in vitro* proporcionam a utilização de meios nutritivos na cultura de células, tecidos e órgãos vegetais, promovendo substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* (DRONK, 2014).

3.3 MEIOS ALTERNATIVOS DE CULTURA *IN VITRO* DE PLANTAS

Com relação ao meio nutritivo, este deve ser composto por elementos e componentes essenciais que atendam as necessidades específicas do organismo cultivado (DRONK, 2014). Assim, vias alternativas são criadas para aperfeiçoar o meio de cultura. Por exemplo, na cultura de tecidos vegetais os meios mais utilizados são: o meio de Murashige e Skoog (1962), conhecido como MS, é um meio padrão para cultivo de plantas, muito usado especialmente para cultura de meristemas e regeneração de tecidos; este meio é caracterizado pela sua elevada concentração em sais minerais (SCHWALBERT *et al.*, 2014).

As técnicas de cultura *in vitro* de plantas oferecem vantagens em relação ao produto final, porém ainda é um procedimento caro, principalmente por causa do alto investimento e manutenção de determinados equipamentos, bem como da utilização de reagentes com alto grau de pureza no preparo de meios de cultura (RIBEIRO *et al.*, 2014). Desta forma, novas técnicas mais baratas são utilizadas. Ribeiro *et al.* (2014), em seus estudos, afirmaram que a utilização da luz natural e a substituição de alguns reagentes do meio nutritivo por produtos mais baratos, pode haver redução no custo de produção de mudas em laboratório em até 90%. Santana *et al.* (2009) menciona que um dos meios alternativos baratos são os preparados a partir dos derivados da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).

Os derivados do processamento da cana de açúcar possuem um alto valor nutricional, como componente de meios nutritivos para cultivos *in vitro* (DHAMANKAR, 1992). O caldo de cana ou a garapa é o nome que se dá ao líquido extraído da cana de açúcar no processo de moagem. O caldo é um alimento muito energético e que é produzido o melado e o açúcar

mascavo, assim como a rapadura que é feita através de processamento após a concentração do caldo (FAVA, 2004). Trabalhos utilizando o melado da cana-de-açúcar foram realizados por Ribeiro *et al.* (2012). Estes autores verificaram o processo de germinação e crescimento *in vitro* da espécie de bananeira (*Musa spp.*) cv. Maçã e verificaram que a utilização do melado não favoreceu no desenvolvimento de plântulas, mas favoreceu o enraizamento das mesmas. Santana *et al.* (2009) usaram o melado de cana-de-açúcar como meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de mandioca e notaram que os números médios de folhas, de raízes e biomassa seca e fresca das plantas cultivadas em meio com melado.

3.4 GERMINAÇÃO *IN VITRO* E QUEBRA DE DORMÊNCIA EM SEMENTES

Uma das etapas importante para início da cultura *in vitro* de tecidos vegetais é a germinação e consiste em uma estratégia promissora na obtenção de plantas em grande quantidade (VICTÓRIO; LAGE, 2009).

A germinação *in vitro* é utilizada, principalmente, em espécies cujas taxas de germinação em condições naturais são insuficientes para a obtenção de material vegetal destinado a experimentação e/ou atendimento a demandas comerciais. A dormência de sementes é um dos fatores que pode diminuir estas taxas, dificultando o cultivo *in vitro*. Além disso, existem plantas cujas sementes são desprovidas de endosperma, necessitando de associações com outros organismos para a nutrição inicial do embrião e prosseguimento da sucessão dos eventos metabólicos associados à germinação (COUTO *et al.*, 2004; GUIMARÃES, 2016).

A germinação *in natura* pode ser afetada por diversos fatores, sejam eles internos ou externos. Os internos são intrínsecos das sementes, como longevidade e viabilidade, já os fatores externos dizem respeito às condições ambientais, tais como temperatura, umidade, presença e ausência de oxigênio (OLIVEIRA, 2008). A germinação *in vitro*, quando comparada com a germinação *in natura*, apresenta algumas vantagens que evitam problemas de aborto embrionário, aumentando a taxa de germinação (RETES-PRUNEDA *et al.*, 2007; GUIMARÃES, 2016).

O processo germinativo de sementes é considerado um dos estágios mais críticos do desenvolvimento vegetal e está caracterizado por processos fisio-metabólicos de natureza complexa. Neste processo, inicia-se com a absorção de água pela semente (embebição) e finaliza-se com o início do alongamento do eixo embrionário, usualmente a radícula

(ABBADE, 2008). Segundo Popinigis (1977), 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.

Para a germinação das sementes é necessário quebrar a dormência natural das sementes, causada pela impermeabilidade do tegumento à água. Esse tipo de dormência é o mais comum entre as espécies tropicais sendo encontrada em boa parte das leguminosas (OLIVEIRA, 2008). Vários autores afirmam que a embebição representa o passo inicial da germinação e que este processo é caracterizado pela entrada de água na semente através do tegumento, promovendo a turgescência das estruturas internas das células, aumentando a permeabilidade ao oxigênio e favorecendo o rompimento do tegumento. A absorção de água pelas sementes é influenciada, dentre outros fatores, pela composição química da semente (proteínas apresentam maior avidez por água que o amido, portanto, são hidrófilas, enquanto os lipídios são hidrófobos) e pela permeabilidade do tegumento a água (BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; MARCOS FILHO, 2005; NERY, 2008).

As sementes de *L. leucocephala* possuem o tegumento duro e para que ocorra a germinação é necessário quebrar a dormência (TELES *et al.*, 2000; PEIXOTO, 2007). O plantio de sementes desta leguminosa sem quebra da dormência física resulta, geralmente, em índice de germinação inferior a 50% (KLUTHCOUSKI, 1980; TELES, 2000). A dormência pode ser definida como a incapacidade de germinação de sementes mesmo quando são expostas a condições ambientais favoráveis e pode ter sua causa associada a fatores endógenos ou exógenos da semente (JESUS *et al.*, 2014). Existem duas categorias de dormências de sementes: dormência tegumentar ou exógena (barreira física) e dormência embrionária ou endógena (barreira química). *L. leucocephala* possui dormência tegumentar. Logo, sendo necessário, passar por processos físicos de quebra de dormência como, por exemplo, o caso da embebição das sementes. No tipo de dormência embrionária, a germinação só ocorre se o embrião for isolado (RISSI; GALDIANO JÚNIOR, 2011). Desta forma, se faz necessário entender como a quebra de dormência de sementes interfere no desenvolvimento vegetal, principalmente nas técnicas de cultivo *in vitro*, para que ocorra um melhor entendimento do desenvolvimento da espécie vegetal utilizada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E SELEÇÃO DAS SEMENTES DE *Leucaena leucocephala*

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecido Vegetais (LACTV), do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campus de Sumé, estado da Paraíba. Frutos de *Leucaena leucocephala* foram coletados durante o mês de Julho de 2017, no município de Sumé, região do Cariri Paraibano, podemos observar os frutos e as sementes na figura 1A e B. Após a coleta dos frutos, o material foi conduzido ao laboratório e 600 sementes foram extraídas, deste número foram selecionadas 200 sementes de acordo com o tamanho, forma, cor e integridade, buscando manter um padrão de boa qualidade das sementes coletadas, eliminando, assim, as sementes furadas, chochas e as que apresentavam infestações por microorganismos. Desta forma, julgamos, então, que as sementes boas foram separadas das de má qualidade, seguindo as descrições propostas por Brasil (1992).

Figura 1. A: *Leucaena leucocephala* planta arbórea de onde foram coletados os frutos no município de Sumé; **B:** Infrutescência mostrando as vagens amadurecidas com as sementes.

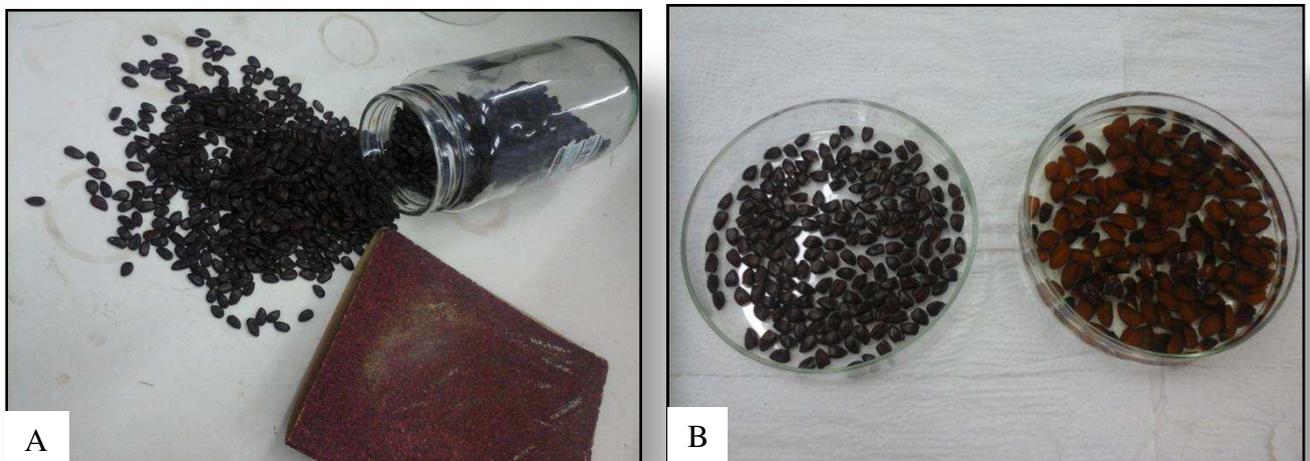


Fonte: Autoria própria.

4.2 QUEBRA DE DORMÊNCIA E ASSEPSIA DAS SEMENTES

Após a seleção das sementes, as mesmas foram submetidas a dois tipos de quebra de dormência: (i) no primeiro momento, submetemos as 200 sementes a técnica de escarificação, utilizando lixa 120 para parede observamos na figura 2A, lixando a porção do tegumento contrário à inserção da radícula do embrião; (ii) no segundo, separamos 100 sementes e colocamos submersas em água destilada por 3h, as outras 100 não foram submetidas ao mesmo processo. Desta forma, estabelecendo uma comparação entre sementes embebidas X não embebidas com água destilada, ver na figura 2B.

Figura 2. A: Procedimento de escarificação mecânica com lixa 120; **B:** Sementes depois de escarificadas com (placa de Petri à direita) e sem imersão (placa de Petri à esquerda) na água destilada.



Fonte: Autoria própria.

Para as duas formas de tratamento de quebra de dormência, as sementes foram lavadas em solução de 1L de água destilada com 6 mL de Tween-20 durante 15 minutos, posteriormente realizou três enxágues com água destilada e imersão em álcool 70% por 3 minutos. Novamente, efetuaram-se três enxágues com água destilada e as sementes foram inseridas em uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,6% durante 15 minutos e, em seguida, foram submetidas a mais três enxágues com água destilada. Todo o processo de assepsia foi realizado na Capela de Exaustão de Gases - Lucadema® retirando possíveis agentes desinfetantes. A assepsia utilizada no presente trabalho seguiu a metodologia usada por Gomes (2017).

4.2.1 Preparo do melado

O meio alternativo foi preparado com melado nas diferentes concentrações de 1%, 5% e 10% e mais uma solução controle, para os dois métodos de quebras de dormência onde se separou 20 frascos para sementes escarificadas com imersão em água e 20 frascos para sementes escarificadas sem imersão em água. Onde cada frasco possuía 50 ml de água destilada mais o melado com uma $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar para gelificar o meio.

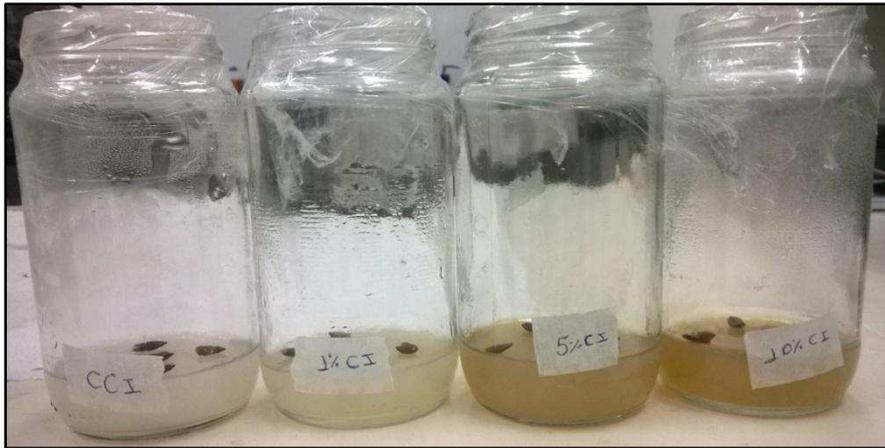
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA GERMINAÇÃO *IN VITRO*

Com o procedimento da quebra de dormência e assepsia das sementes foi preparado um meio nutritivo de cultura com *L. leucocephala* em diferentes concentrações de mel da cana-de-açúcar ou melado. Para realizar os meios nutritivos, um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) foi realizado com soluções contendo água destilada mais ágar e três tipos de concentrações diferentes do melado, avaliando também a influência da imersão das sementes com água destilada.

Para as 200 sementes selecionadas, separamos 40 frascos de 300 mL contendo 50 mL de meio. Desta maneira, 20 frascos foram separados para o tratamento com água e 20 sem água, contendo 5 sementes posicionadas de maneira homogênea para cada frasco. A solução controle de água-ágar foi montada com 50 mL de volume por frasco contendo $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar para gelificar o meio. As soluções testes com o melado foram diluídas proporcionalmente em concentrações de 1%, 5% e 10% junto ao volume preparado demonstrado na figura 3. A amostragem utilizou 5 frascos por tipo de soluções preparadas (controle, 1%, 5% e 10%) e separadas por quebra de dormência. Para montagem do experimento, os frascos foram previamente autoclavados durante 20 minutos, em uma temperatura de 121°C e pressão a 1,1 atm. Após a montagem, os meios de cultura foram incubados em gabinetes termostáticos Logen® com fotoperíodo ajustado para 12 h à temperatura de 25°C . O teor de açúcar total das soluções preparadas foi verificado com auxílio de um refratômetro em escala Brix, para determinar a concentração de açúcar das soluções preparadas. Obteve quatro diferentes graus Brix como podemos ver na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações de melado em relação aos graus Brix de cada tratamento.

TABELA DE CONCENTRAÇÕES DE MELADO				
Concentrações	Controle	1%	5%	10%
Brix	1°	3°	7°	10°

FONTE:**Figura 3.** Exemplo de concentrações preparada para o meio nutritivo (controle, 1%, 5% e 10%) para quebra de dormência escarificada embebida com água destilada.

Legenda: CCI – tratamento controle com imersão em água destilada; CI-1% - solução com 1% de teor de açúcar com imersão em água destilada; CI-5% - solução com 5% de teor de açúcar com imersão em água destilada; CI-10% - solução com 10% de teor de açúcar com imersão em água destilada.

Fonte: Autoria própria.

4.4 MEDIÇÕES APÓS A GERMINAÇÃO

A germinação *in vitro* das sementes de *L. leucocephala* teve início com as primeiras contagens e medições das radículas das plântulas após 72h de inoculação das sementes. Depois deste período, as medições ocorreram em um intervalo de 48h durante 10 dias, totalizando cinco medições exemplo na figura 5. As medições foram realizadas com auxílio de uma régua milimetrada sempre dentro de uma capela de exaustão para evitar o mínimo de contaminação e nos mesmos horários do dia. Os frascos e as sementes foram devidamente identificados para uma melhor medição.

Com as medições os seguintes parâmetros foram contabilizados de acordo com Oliveira e Gomes-Filho (2009):

- **Primeira contagem de germinação:** A contagem deve ser realizada com auxílio do teste de germinação, calculando as porcentagens de plântulas que foram normais ao terceiro dia após o cultivo.
- **Germinação:** Análise de germinação é medida no final do experimento, verificando as sementes germinadas, considerando as sementes germinadas as que emitiram raiz primária. Os valores emitidos foram expressos em porcentagem média devido ao número de plântulas normais.
- **Índice de velocidade de germinação:** É expresso através do somatório do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias sucedidos entre o cultivo e a germinação (fórmula de Maguire, 1962).

$$IVG = (G1/N1) + (G2/N2) + (G3/N3) + \dots + (Gn/Nn);$$

Em que:

- ✓ IVG = índice de velocidade de germinação;
- ✓ G1, G2, G3, ..., Gn = número de plântulas calculadas na primeira, segunda, terceira e última contagem;
- ✓ N1, N2, N3, ..., Nn = número de dias da cultivo na primeira, segunda, terceira e última contagem.
- **Tempo médio de germinação:** É adquirido através das contagens diárias das sementes que germinaram até o último dia de cultivo, a contagem começa no primeiro dia de cultivo. Os valores são adquiridos através da fórmula segundo Labouriau (1983), e os resultados expressos em horas.

$$TMG = \Sigma (ni \cdot ti) / \Sigma ni,$$

Em que:

- ✓ TMG = tempo médio de germinação (horas),
- ✓ ni = número de sementes germinadas no intervalo entre cada contagem;

✓ t_i = tempo decorrido entre o início da germinação e a i -ésima contagem.

Figura 4. Exemplo da medição do comprimento das plântulas de *L.leucocephala*.



Fonte: Autoria própria.

4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Nos ensaios do delineamento experimental inteiramente casualizado, adotou-se 40 repetições com 5 sementes, em esquema fatorial de 2 x 4, tendo como tratamentos a combinação de duas quebra de dormência (sem e com água) e quatro níveis de concentração de teor de açúcar (controle, 1%, 5% e 10%). Para os parâmetros Germinação (G%) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG), foi realizada uma Análise de Variância Fatorial ($\alpha = 0,05$), por meio do teste de Fisher (F), e verificar se existiam diferenças entre os valores amostrados entre os tratamentos realizados e os diferentes tipos de concentrações do melado. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os parâmetros Tempo Médio de Germinação (TMG) e Primeira Contagem de Germinação (PCG) foram relacionados com os graus Brix (variável independente), considerando TMG e PCG como variáveis dependentes. Assim, análises de regressão linear simples foram aplicadas entre a variável Brix e as dependentes e verificar se a germinação sofre algum efeito dependente com o aumento da dosagem do teor de açúcar. A eficácia do modelo foi testada através da análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade.

Para evitar o erro tipo I da ANOVA, foi verificada por meio do teste de Levene se as variâncias dos tratamentos estavam homogêneas, o qual não mostrou não haver necessidade de transformações dos dados (FOX, 2008).

Todos os testes foram realizados usando o software de plataforma livre R Core Team (2017). Foram utilizados os pacotes '*stats*' e '*car*' para as análises (FOX; WEISBERG, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de germinação *in vitro* das sementes de *L. leucocephala* teve duração de 14 dias de inoculação. Após 72 horas da inoculação foram observados o crescimento inicial radicular e rompimento do tegumento de algumas sementes. Realizou-se, assim, as primeiras contagens e medições do crescimento radicular dos dois fatores de quebra de dormência por escarificação (sem e com água) e analisando os três níveis de concentração de teor de açúcar e mais um controle. Os dados do experimento foram submetidos ao teste de Levene, o resultado mostrou que as variâncias dos tratamentos estavam homogêneas, não houve necessidade de transformações dos dados, ver Tabela 2.

Tabela 2. Análise do Teste de Levene para normalidade dos dados.

Teste de Levene - médias e variâncias			
	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Grupo	7	1,031	0,42
Concentrações	32	-	-

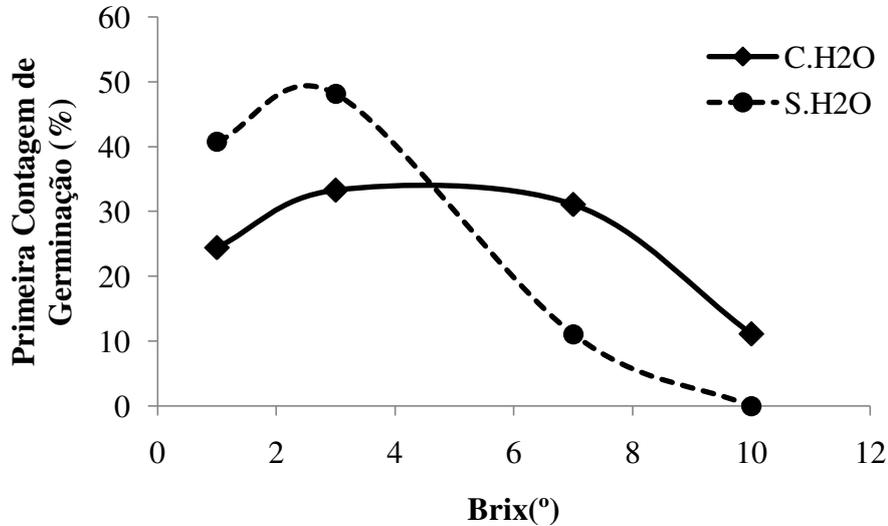
Legenda: GL- Graus de liberdade, grupos: São os dois métodos de quebra de dormência com imersão e sem imersão em água, Concentrações: concentrações de melado (controle, 1%, 5%, 10%).

FONTE:

Os resultados das análises mostraram diferenças significativas quanto aos tipos de concentrações utilizadas com o melado da cana-de-açúcar. A primeira contagem de germinação (PCG), ocorrida após as 72 h, apresentou uma queda acentuada para as maiores concentrações do teor de açúcar, equivalente a 5% e 10% de concentração junto ao meio de cultura realizado, respectivamente como vemos na figura 6.

Os resultados da regressão mostraram uma forte relação para as sementes apenas escarificadas ($R^2 = 0,81$; $F = 14,59$; $p < 0,05$), onde o alto teor de açúcar do melado diminuiu a germinação, enquanto as sementes escarificadas e imersas com água destilada não mostrou uma relação muito forte ($R^2 = 0,026$; $F = 1,08$; $p = 0,40$), apresentando melhor aceitação com o alto teor de açúcar ver Figura 6. Observou que as sementes escarificadas e não imersas em água destilada sofreram uma maior influência do meio de cultura a altas dosagens do “melado”, quando comparado às sementes escarificadas imersas em água destilada. Os resultados apresentaram também que a baixa concentração do melado concentração = 1% foi mais propícia para as sementes germinarem para os dois tipos de quebras de dormência (com imersão e sem imersão água).

Figura 6. Percentual das Primeiras Contagens de Germinação (PCG) das sementes de *L. leucocephala* em função do grau Brix nas diferentes concentrações de melado.



Legenda: C.H2O - Quebra de dormência por escarificação e imersas em água destilada; S.H2O - Quebra de dormência por escarificação sem imersão em água destilada.

Fonte: construída com dados da pesquisa.

Oliveira (2008), ao estudar a superação da dormência em sementes de *L. leucocephala*, verificou que as sementes tiveram um melhor poder germinativo utilizando o método de escarificação química com ácido sulfúrico por 10 min e imersas na água quente em temperaturas de 80°C. O próprio autor considera que as sementes de *L. leucocephala* são fotoblásticas neutras e a variação de luz não seria um fator determinante para a germinação desta espécie, o que foi evidenciado no método utilizado pelo o autor proporcionando maior poder germinativo da planta estudada. Nos resultados obtidos para PCG do presente trabalho, as quebras de dormência por escarificação mecânica das sementes, não imersas em água destilada, mostrou ser mais eficaz para a germinação de *L. leucocephala*. Porém, os altos teores de concentração do melado da cana-de-açúcar evidenciaram uma redução brusca na PCG para as sementes apenas escarificadas mecanicamente, enquanto as imersas em águas destilada observou uma maior tolerância da espécie aos altos teores de açúcar. Resultados semelhantes foram observados por Ribeiro *et al.* (2012), onde analisaram o melado de cana-de-açúcar para desenvolvimento *in vitro* de bananeira (*Musa spp.*) cv. Maçã. Estes notaram que uma concentração mais elevada de caldo no meio de cultura inibia o desenvolvimento de explantes de bananeira, sendo um fator limitante para o crescimento das plantas.

No resultado da Análise de Variância Fatorial realizada para germinação (G%) apresentou médias das concentrações do teor de açúcar para as amostras controle, 1%, 5% e 10% iguais para ambos os métodos de quebra de dormência, não havendo diferenças significativas entre as concentrações ($F=0$, $p=1$). As fortes variações, expressas na Tabela 3, são dos desvios padrões e observamos que as sementes escarificadas imersas em água destilada apresentam um desvio maior no controle e na concentração de 1% quando comparada com as sementes não imersas em água destilada. Nas sementes escarificadas e não imersas em água os desvios maiores são nas concentrações de 5% e 10%. Porém, por não encontrarmos diferenças entre as médias dos tratamentos os fortes desvios observados possam ter sido provocados pela competição entre os indivíduos, já que a percentagem de germinação foi calculada pela média final das sementes germinadas, àquelas que emitiram raiz primária no final do experimento observamos os seguintes valores na Tabela 3.

Tabela 3. Percentual das variâncias das medias de germinação das sementes *L. leucocephala* submetidas aos métodos de quebra de dormência por escarificação (sem imersão e com imersão água) em relação às concentrações de meio alternativo para (controle, 1%, 5% e 10%).

Métodos	Germinação (%)			
	Média (\pm desvio padrão)			
	C	1%	5%	10%
C.H ₂ O	20 (\pm 12)	20 (\pm 9,33)	20 (\pm 1,68)	20 (\pm 8)
S.H ₂ O	20 (\pm 1,52)	20 (\pm 2)	20 (\pm 5,54)	20 (\pm 17,3)

Legenda: C.H₂O - escarificação com imersão em água; S.H₂O - escarificação sem imersão em água; (C) – Controle; (1%), (5%), (10%)– concentrações de meios alternativos.

FONTE:

Siqueira (2006) analisou dois grupos de espécies exóticas invasoras para o campus da PUC do Rio de Janeiro. O primeiro grupo de plantas invasoras foi classificado por compor espécies que não apresentaram sinais de propagação intensiva e competitividade com as espécies nativas. O segundo grupo foi classificado por apresentar espécies que nos últimos 5 anos vem ampliando sua ocorrência no campus da PUC-RJ, competindo com outras espécies. A espécie de *Leucaena leucocephala* foi classificada no primeiro grupo de espécies exóticas invasoras não apresentando sinais de propagação intensiva e muito menos de competitividade

com as espécies nativas (SIQUEIRA, 2006). Costa e Durigan (2010) discutem que o poder de invasão de espécies exóticas depende dos ambientes e das regiões onde estão inseridas. As não diferenças de percentagens de germinação (G%) evidenciadas nesse estudo podem sugerir competição intraespecífica entre os indivíduos o que poderíamos corroborar com a ideia de Siqueira (2006), já que *L. leucocephala* não apresenta uma forte competitividade entre espécies nativas, mas sim entre os indivíduos da mesma população. Porém, vale ressaltar, que os experimentos utilizados no nosso estudo não são conclusivos e novas repetições são necessárias para verificar a competição entre os indivíduos de *L. leucocephala* através da germinação percentual (G%). Lafetá *et al.* (2009) em seus experimentos utilizaram quatro tipos de quebra de dormência: escarificação mecânica, escarificação mecânica mais pré-esfriamento a 10°C, sementes submetidas só ao pré-esfriamento e sementes naturais sem tratamentos. Estes autores verificaram para as sementes que sofreram escarificação mecânica um maior percentual de germinação.

Para o Índice de Velocidade Germinação (IVG) foi observado diferenças entre os tipos de concentrações e na interação dos métodos de quebra de dormência e tipos de concentrações, dados na Tabela 4. As sementes escarificadas não imersas em água apresentaram uma velocidade de germinação maior para as concentrações controle e 1% na Figura 7. Enquanto, para as sementes que foram imersas em água o maior IVG foi observado para as concentrações de 5% e 10% assim como demonstrado no gráfico da Figura 7. Os maiores índices foram observados para os tratamentos controle, 1% e 5%, havendo uma queda brusca para a concentração de 10%. Vale ressaltar que as sementes escarificadas com imersão em água suportaram melhor o alto teor de açúcar do meio alternativo. Oliveira e Gomes-filho (2009) avaliaram a germinação e vigor das sementes de sorgo. Estes autores mencionam que o IVG é utilizado para analisar o vigor germinativo das sementes, quando ocorre uma queda do IVG significa que houve uma diminuição no metabolismo das mesmas em função ao substrato que estão inseridas interferindo na digestão das reservas e dos produtos metabolizados.

Tabela 4. ANOVA Fatorial entre os Índices de Velocidade de Germinação para as sementes de *L. leucocephala* e as concentrações de meio alternativo.

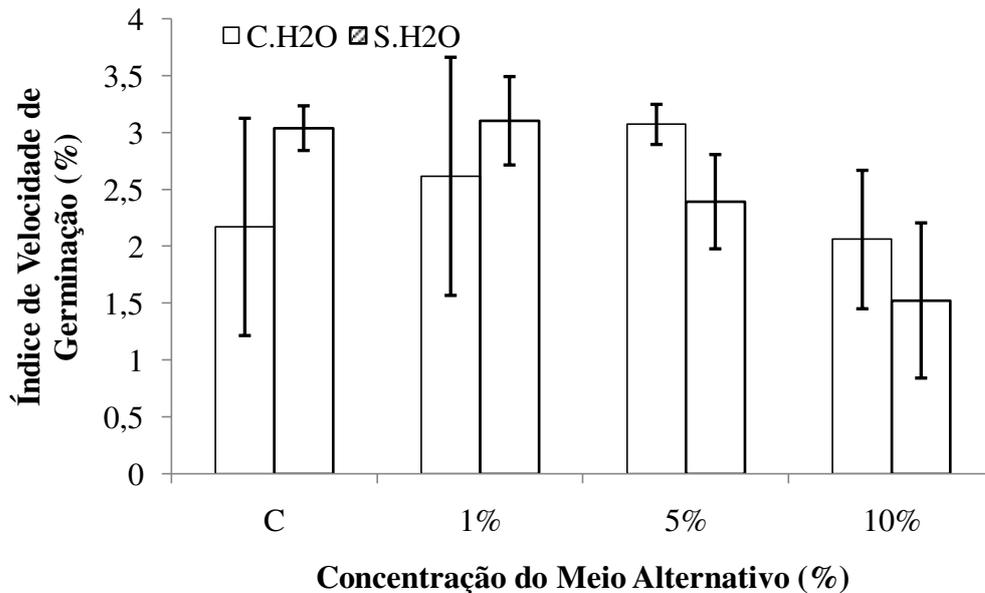
Dormência e Concentrações do meio alternativo				
	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Dormência	1	0,012	0,016	0,89 ^(ns)

Tratamentos	3	2,31	3,10	<0,05*
Tratamentos X	3	1,44	1,93	0,014*
Dormência				
Resíduos	32	0,74	-	-

Legenda: GL- Graus de liberdade, QM – Quadrado médio, (*) –significativo, (ns) – Não significativo

FONTE:

Figura 7: Percentual do Índice de Velocidade Germinação (IVG) das sementes de *L.leucocephala* em função da concentração do meio alternativo nas diferentes concentrações de melado.



Legenda: C.H2O - Quebra de dormência por escarificação e imersas em água destilada; S.H2O - Quebra de dormência por escarificação sem imersão em água destilada.

Fonte: construída com dados da pesquisa.

O resultado do teste de Tukey HSD mostrou diferenças entre as médias para os tipos de concentração do melado como vemos na Tabela 5. Mostrando que as maiores diferenças observadas foram entre as concentrações de 5%-10% e 1%-10%, o resultado nos mostra que a concentração de 10% influenciou “mais significativamente” o índice de velocidade de germinação (IVG).

No estudo realizado por Buah *et al.*, (2011) que estudaram o efeito do caldo de cana-de-açúcar sobre o desenvolvimento *in vitro* de bananeiras e observaram que os maiores valores de número médio de brotos e de biomassa fresca ocorreram nos tratamentos com sacarose e com 5% de caldo de cana-de-açúcar. Em nosso trabalho observamos um mesmo

padrão, onde a alta concentração de melado reduziu a germinação das sementes de *L. leucocephala*, principalmente na concentração de 10%.

Tabela 5. Teste de Tukey HSD comparando as médias dos tratamentos alternativos para o índice de velocidade de germinação - (IVG) das sementes.

Comparação entres os tratamentos (Teste de Tukey HSD)		
Tratamentos	Diff	p
C -10%	0,81	0,17
5% -10%	0,94	0,09*
1% -10%	1,06	<0,05*
5% - C	0,12	0,98
1% - C	0,25	0,91
1% - 5%	0,12	0,98

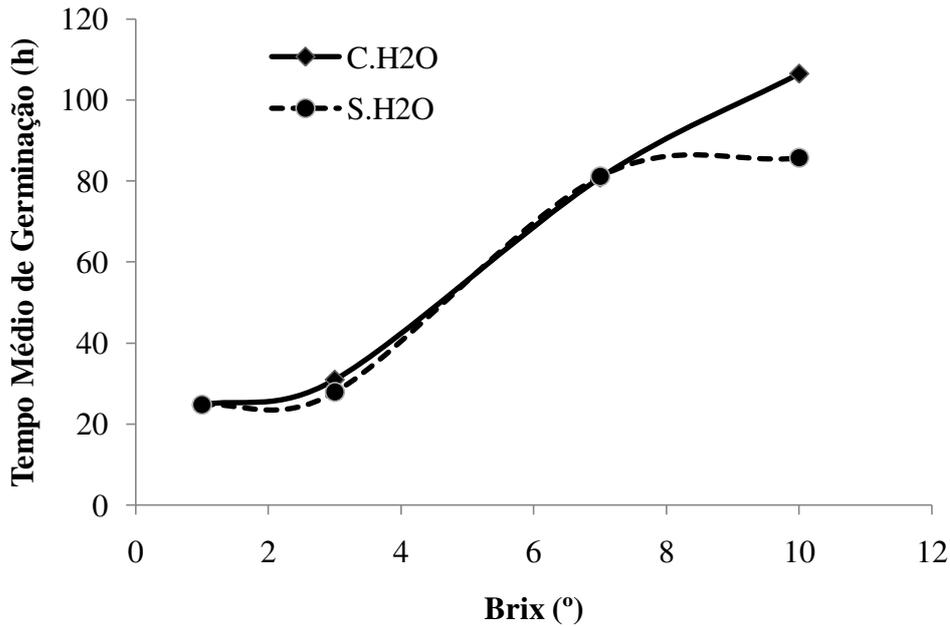
Legenda: (1%), (5%), (10%) e (C) – concentrações de meios alternativos e o Controle; (*) –significativo, (ns) – Não significativo

FONTE:

Os resultados da regressão do Brix (teor de açúcar) com o Tempo Médio de Germinação (TMG) mostraram uma forte relação para as sementes escarificadas com imersão em água e sem imersão em água apresentando o mesmo valor para os dois métodos de quebra de dormência ($R^2 = 0,9199$; $F = 81,44$; $p < 0,000$). No resultado da análise de regressão linear simples para o TMG, observamos que quanto maior a concentração do teor de açúcar houve um aumento do tempo médio de germinação para os dois tipos de quebra de dormência assim como demonstrado no gráfico da Figura 8. Este TMG foi observado de maneira mais acentuada para as sementes que passaram por escarificação mecânica e imersas em água. Percebemos que maiores concentrações do grau Brix influenciaram o poder germinativo das sementes de *L. leucocephala* tornando-as mais lentas. Santana *et al.* (2009) usaram o melado de cana-de-açúcar como meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de mandioca e notaram que os números médios de folhas, de raízes e biomassa seca e fresca das plantas cultivadas em meio com “melado” não diferiram daqueles do grupo controle. Ao contrário, os resultados obtidos neste trabalho mostrou que as concentrações com alto teor de açúcar influenciaram no metabolismo

e fisiologia das sementes utilizadas. A quebra de dormência por escarificação em água apresentou uma maior demora na germinação, porém um maior vigor germinativo quando comparadas as não imersas em água para as concentrações de 5% e 10% de melado.

Figura 8. Tempo Médio de Germinação (TMG) em horas das sementes de *Leucaena leucocephala* em relação ao teor de açúcar em grau Brix das concentrações de meio alternativo.



Legenda: C.H2O - Quebra de dormência por escarificação e imersas em água destilada; S.H2O - Quebra de dormência por escarificação sem imersão em água destilada.

Fonte: construída com dados da pesquisa.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ As concentrações com maior teor de açúcar equivalente aos graus Brix 7° e 10°, referente a 5% e 10%, respectivamente, de concentração do “melado” interferiram no processo germinativo de *Leucaena leucocephala*;
- ✓ As concentrações que possuíram grau Brix entre 1° e 3° indicaram melhores resultados.
- ✓ O método de quebra de dormência por escarificação sem imersão em água apresentou um maior poder germinativo em baixas concentrações de melado;
- ✓ Tratamento com água que apresentou uma melhor tolerância e vigor nas maiores concentrações de melado;
- ✓ Os resultados apresentados nesse trabalho indicam que a espécie *L. leucocephala* pode tolerar ambientes com baixa concentração de nutrientes, porém resistente a áreas mais secas uma vez que as maiores germinações ocorreram em sementes escarificadas não imersas em água destilada.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L. C.. **Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco**. Dissertação (Mestrado) Lavras: UFLA, p.113, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. Módulo IV. 2004.

AMORIM, L. D. M. de. **Fabaceae Lindl. da Floresta Nacional de Assú, semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. Mossoró - RN, 2014.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e Reforma Agrária**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Produção vegetal. Coordenação de laboratório vegetal. Regras para Análise de Sementes. Brasília, DF, p.365, 1992.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R.S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. P. R.; FLORES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* decanáfístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, vol.16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: lenum, p. 445, 1994.

BUAH, J.N; TACHIE-MENSON, J. W; ADDAE G; ASAREV, P. Sugarcane Juice as an Alternative Carbon Source for *in vitro* Culture of Plantains and Bananas. **American Journal of Food Technology**, v.6, p. 685-694, 2011.

COUTO, J.M.F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v.28, n.5, p.633-642, 2004.

COSTA, J. N. M. N; DURIGAN;G *Leucaena leucocephala* (lam.) de wit (fabaceae): invasora ou ruderal? **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.34, n.5, p.825-833, 2010.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. ed. 4. Jaboticabal - SP: UNESP, p.588, 2000.

DRONK, A. G. **Meios de cultura e condições de luminosidade para cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f.** Dissertação. Curitiba, 2004.

DHAMANKAR,V.S Molasses, a source of nutrients for *in vitro* sugar cane culture. **Sugar Cane**, vol.4, p.14-15, 1992.

DRUMOND, M. A.; RIBASKI, J. ***Leucena (Leucaena leucocephala)*: leguminosa de uso múltiplo para o semiárido brasileiro**. Embrapa Semiárido ISSN 1808-9984 Petrolina, PE, 2010.

FAVA, A. R. Atletas ingerem garapa para repor energia. **Jornal da Unicamp**, edição 250, de 3 a 9 de Maio de 2004. Disponível em

<www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/maio2004/ju250pag8a.html>. Acesso em: 09 Setembro 2017.

FERREIRA, F. F.; **Germinação e desenvolvimento in vitro de embriões zigóticos de tucumã-do-amazonas (*astrocaryum aculeatum meyer arecaceae*)**, Manaus, 2012.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. **Aplicações de cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas. Brasília: Embrapa- CNPH, 1998.

FOX, J. Applied Regression Analysis and Generalized Linear Models, **Second Edition**. Sage. 2008.

FOX, J.; WEISBERG, S. An {R} **Companion to Applied Regression, Second Edition**. Thousand Oaks CA: Sage. 2011. Disponível em: <<http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>>. Acesso em: 01 setembro 2017.

GUIMARÃES, D. T.. **Germinação in vitro, desenvolvimento inicial e micropropagação de *Cereus jamacaru* em meios de cultura simplificados**. Sumé - PB. 2016.

GOMES, M. L. de. O. **Germinação in vitro de *Parkinsonia aculeata* L.:** uma espécie de uso múltiplo ocorrente nas matas ciliares da caatinga. Dissertação (mestrado Botânica), 2007.

JESUS, J. M. I.de; CUNHA; A. S.S; REGES; N. P. R; BARCELOS, E. W. V; VALE, L. S.R. **Diferentes métodos para a quebra de dormência em sementes de *leucaena leucocephala* (lam.)**. II Simpósio de Pesquisa e Extensão de Ceres e Vale de São Patrício, 2014.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. washington: Secretaria Geral da organização dos Estados Americanos, p.174. 1983.

LAFETÁ, B. O.; NUNES, U. R.; SANTANA, R. C.; MACHADO, E. L. M. SILVA, J. G. M DA. **Métodos para quebra de dormência em sementes de *leucena*.Bhaia**, 60° Congresso Nacional de Botânica. 2009.

LINS, C. E.L.; MAIA, L. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; SAMPAIO E.V. de S. B. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de *leucaena leucocephala* (lam.) De wit. Em solos de caatinga sob impacto de mineração de cobre. **R. Árvore**, Viçosa-MG, Vol.31, n.2, p.355-363, 2007.

LIMA, J. A.; EVANGELISTA, A. R. **Leucena (*Leucaena leucocephala*)**. Lavras - mg: ufla, (técnico-científico). 2001.

KLUTHCOUSKI, J. **Leucena:** alternativa para a pequena e média agricultura. Brasília: EMBRAPA-DID. p.12. 1980.

NERY, F. C. **Germinação, cultivo in vitro e tolerância ao congelamento de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)**. Lavras : UFLA, p. 217. 2008.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, p.495. 2005.

MAMEDES, T. C.; **Estabelecimento in vitro de handroanthus impetiginosus (mart. Ex dc.) Mattos (bignoniaceae) e estudo da incidência de oídio (oidium sp.) Em plântulas obtidas in vitro.** Dissertação – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, p.92. 2013.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Vol.2, n.1, p.176-177. 1962.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

OLBRICH, H. **The mosasses.** Berlin, Biotechnology Kempe GmbH. p.131 .2006.

OLIVEIRA, A.B. Germinação de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit.), var. K-72 **Revista de biologia e ciências da terra** vol. 8, N° 2, 2º Semestre 2008, p. 166-172.

OLIVEIRA, A. A. B. de; GOMES-FILHO, E. Germinação e vigor de sementes de sorgo forrageiro sob estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 3, p.048-056, 2009.

PADUA, M.S.; **Germinação in vitro, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.).** Lavras-MG, 2012.

PEIXOTO, P. B.; HEMÉTRIO, N. S. & GUILHERME, F. C. **Efeitos da predação de sementes sobre a germinação em leucaena leucocephala.** Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente.** Brasília: AGIPLAN, 1977.

PROJETO VERDE. Disponível em <https://appverde.wordpress.com/2015/09/18/leucena-leucaena-leucocephala/> . Acesso em: setembro de 2017.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes in vitro e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres.** Departamento de Agricultura – Universidade Federal de Lavras Lavras-MG. Brasil, 2008.

RETES-PRUNEDA, J.L. et al. Propagación in vitro de espécies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, Vol. 81, p.9-16, 2007.

RIBEIRO, J. M; MELO, N. F. de; COELHO, Â. K. N S; PINTO, M..S.T. Efeito do melado de cana-de-açúcar no desenvolvimento *in vitro* de bananeira (*Musa* spp.) cv. Maçã **Rev. Ceres**, Viçosa, Vol. 59, n.3, p. 293-298, 2012.

RISSI, R.; GALDIANO JÚNIOR, R.F. Escarificação de sementes e quebra de dormência de Mulungu (*Erythrina velutina* Willd.-leguminosae). **Revista Biologia FAFIBE** , vol.1, p. 14, 2011.

ROCHA, S.C.; QUOIRIN, M. C. Calogênese e rizogênese em explantes de Magno (*Swietenia macrophylla* king) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**. Santa Maria, Vol.14, n.1, p. 91-101,2004.

R Core Team R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2017. Disponível em: < <https://www.R-project.org/>> Acesso em: 01 setembro 2017.

SANTANA, M. A; ROMAY, G; MATEHUS, J; VICENTE-VILLARDÓN, J.L; DEMEY J.R A simple and low-cost strategy for micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**, Vol.8 p.3789-3897. 2009.

SILVA, T. O. da. **Desinfestação e influencia do substrato na germinação in vitro de Mimosa ohtalmocentra** Mart. Ex. Benth. - Sumé - PB, 2016.

SCHWALBERT, R.; MALDANER, J.; AITA, M. F.; AMARAL, G. A. DO.; TAROUCO, A. K. **Concentrações de sais do meio ms no cultivo in vitro de Desmodium incanum**. 2014.

SIQUEIRA J. C.de Bioinvasão vegetal: dispersão e propagação de espécies nativas e invasoras exóticas no campus da pontifícia universidade católica do rio de janeiro (puc-rio). **PESQUISAS, BOTÂNICA** N° 57: 319-330. São Leopoldo, Instituto Anchieta de Pesquisas, 2006.

TELES, M. M; ALVES, A. A; OLIVEIRA; J. C. G. de; BEZERRA; A. M. E. Métodos para Quebra da Dormência em Sementes de Leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit **Revista Brasileira de Zootecnia.**, Vol.29, n.2, p.387-391.2000.

VICTÓRIO C. P.; LAGE, C. L. S. Efeitos da qualidade de luz na germinação e desenvolvimento inicial *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* **Revista Ciencia Agronomica** Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CERev. Ciên. Agron, Fortaleza, Vol.40, n. 3, p. jul-set, 2009.

WIETHOLTER, P. A. **Modelagem ecológica de dispersão e competição intraespecífica de espécies exóticas**: estudo do casoda leucena (*Leucaena leucocephala*) na mata ciliar do lago de ITAIPU. Monografia - Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, CURITIBA, 2007.