

ANDRESSA VASCONCELOS FLORES

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Melanoxylon brauna* (SCHOTT)  
SOB DIFERENTES TEMPERATURAS: ASPECTOS  
MORFOFISIOLÓGICOS E ENZIMÁTICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F634g  
2011

Flores, Andressa Vasconcelos, 1983-  
Germinação de sementes de *Melanoxylon brauna*  
(SCHOTT) sob diferentes temperaturas: aspectos  
morfofisiológicos e enzimáticos / Andressa Vasconcelos  
Flores. – Viçosa, MG, 2011.  
x, 66f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices

Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Sementes - Fisiologia. 2. Sementes – Germinação.  
3. Temperatura. 4. Enzimas. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDO adapt. CDD 634.923231

ANDRESSA VASCONCELOS FLORES

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Melanoxylon brauna* (SCHOTT) SOB  
DIFERENTES TEMPERATURAS: ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E  
ENZIMÁTICOS

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em Ciência  
Florestal, para obtenção do título de *Doctor  
Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2011.

---

Prof<sup>a</sup>. Valéria Monteze Guimarães  
Co-orientadora

---

Prof. José Francisco de Carvalho Gonçalves  
Co-orientador

---

Prof. Eduardo Fontes Araújo

---

Prof. Rinaldo Cesar de Paula

---

Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges  
Orientador

**Dedico**

À minha mãe Abigail Vasconcelos

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, pela oportunidade da realização do Curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Dr. Eduardo Euclides de Lima e Borges, pela orientação, pelos ensinamentos, pela oportunidade, pela amizade e pelo apoio, necessários e indispensáveis para realização deste trabalho.

À Professora Dra. Valéria Monteze Guimarães, uma amiga, pelas sugestões, pelo ensinamento, pelo profissionalismo e principalmente pela amizade.

Ao Professor Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves pelas importantes contribuições na minha tese.

Aos Professores Dr. Eduardo Fontes Araújo e Dr. Rinaldo Cesar de Paula, pela honrosa participação na banca de defesa.

Aos meus pais, Paulo Cesar Flores e Abigail Vasconcelos, pela educação, pelos ensinamentos, pelo exemplo de amor, dignidade, solidariedade, esperança, honestidade, inestimável apoio e carinho superando a distância e a saudade. Pela incansável dedicação, meu especial e eterno agradecimento.

Ao meu irmão, Paulo Cesar Flores Junior pelo amor, carinho e por sempre acreditar em mim, e à Mariah, Igor e Tchak pelo amor incondicional e alegrias proporcionadas.

Ao Silvano pelo companheirismo, amizade, dedicação e carinho.

Aos funcionários Francisco, Pedro, Geraldo, Márcio, Mauro e Leacir, pela dedicação e indispensável ajuda.

Aos estagiários: Daniela, Thaís, Yathaanderson e Eduarda pela ajuda incondicional, pelo companheirismo e apoio na construção deste trabalho.

À Glauciana, amiga e colega de trabalho, companheira para todas as horas, pela amizade e ajuda na realização desta tese.

Aos amigos Rita, Alexandre e Alfredo, da coordenação da Pós-graduação em Ciência Florestal, pelas orientações e amizade construída ao longo do curso.

À Marquione, pela amizade, ajuda e orientação.

Aos amigos Márcio, Magali, César, Aurora, Mychelle, Raul, Elisa, Elizabeth, Haynna, Myrian e Guilherme pelo convívio harmonioso, pela paciência, pela colaboração, pela amizade e pelos momentos de descontração, cujos laços se fortaleceram durante esse período.

À Candida Elisa Manfio, uma amiga sem igual, com a qual convivi durante todo o tempo de doutorado em Viçosa, longe de casa, ela foi uma irmã com a qual dividi todas as alegrias e tristezas, obrigada pela amizade incondicional.

À Helena, Maria Clara, Francisco e Guria, que juntamente com a Candida foram a minha família Viçosense, com vocês os dias passaram com mais leveza. Obrigada por todos os momentos vividos.

Às eternas-amigas, Daiane, Bruna, Catarina, Veridiana, Sheila, Vanessa, Camila, Angela, e respectivas famílias pelo apoio, pela amizade muito especial e por acreditarem em mim, vocês são prova de que a distância só fortalece a amizade.

Aos meus amigos distantes, que sempre estiveram presentes em todos os momentos e que de alguma forma colaboraram.

Aos meus familiares, que mesmo distantes me apoiaram, pelo carinho e incentivo para vencer na vida.

A todos que, por um lapso de memória, não tenham sido lembrados, mas que de uma forma ou outra, contribuíram para a conclusão deste trabalho, o meu respeito e gratidão.

Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

ANDRESSA VASCONCELOS FLORES, filha de Paulo Cesar Flores e Abigail Vasconcelos, nasceu na cidade de Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, em 19 de julho de 1983.

Em março de 2000, ingressou na Universidade Federal de Santa Maria, graduando-se em Engenharia Florestal, em fevereiro de 2005.

Em março de 2005, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, tendo defendido a dissertação em fevereiro de 2007.

Em agosto de 2007, iniciou o Curso de Doutorado em Ciência Florestal na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, tendo defendido tese em fevereiro de 2011.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
<b>3. CAPÍTULO I</b> .....	17
<b>EFEITO DO SUBSTRATO, DA COR E DO TAMANHO DE SEMENTES DE</b> <b><i>Melanoxylon brauna</i> NA GERMINAÇÃO E NO VIGOR</b> .....	17
RESUMO.....	17
ABSTRACT .....	18
INTRODUÇÃO .....	18
MATERIAL E MÉTODOS .....	20
RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	22
CONCLUSÕES .....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
<b>4. CAPÍTULO II</b> .....	30
<b>AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE</b> <b><i>Melanoxylon brauna</i> SCHOTT SOB DIFERENTES TEMPERATURAS</b> .....	30
RESUMO.....	30
ABSTRACT .....	31
INTRODUÇÃO .....	32
MATERIAL E MÉTODOS .....	33
RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	35
CONCLUSÕES .....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
<b>5. CAPÍTULO III</b> .....	46
<b>ATIVIDADE DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASE, ASCORBATO</b> <b>PEROXIDASE E CATALASE DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE</b> <b><i>Melanoxylon brauna</i> SCHOTT SOB DIFERENTES TEMPERATURAS</b> .....	46
RESUMO.....	46
ABSTRACT .....	47
INTRODUÇÃO .....	47
MATERIAL E MÉTODOS .....	50
RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	53
CONCLUSÕES .....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	62
<b>7. APÊNDICES</b> .....	64

## RESUMO

FLORES, Andressa Vasconcelos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011.  
**Germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* (Schott) sob diferentes temperaturas: aspectos morfofisiológicos e enzimáticos.** Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Co-orientadores: Valéria Monteze Guimarães e José Francisco de Carvalho Gonçalves.

A germinação de espécies arbóreas tropicais ainda carece de informações mais precisas sobre fatores físicos e as intrínsecas às sementes que podem interferir no processo germinativo dos mesmos. Diante deste fato, o presente trabalho teve por objetivo investigar as características morfoométricas e níveis crescentes de temperatura e suas implicações sobre a fisiologia e o metabolismo de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott durante o processo germinativo. Para tanto, os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa - UFV. As sementes utilizadas neste trabalho foram colhidas em 10 árvores-matrizes na cidade de Leopoldina - MG. No primeiro capítulo, foram realizados dois ensaios, o primeiro para avaliar o efeito da cor e do tamanho, no qual as sementes foram classificadas visualmente em claras e escuras, e em relação ao tamanho em pequenas e grandes, e posteriormente, foram semeadas sob duas folhas de papel filtro. No segundo ensaio, foi avaliado o efeito de diferentes substratos na germinação. Para tanto, foram testados os substratos sobre areia (SA), entre areia (EA), sobre papel germitest (SP), entre papel germitest (EP) e rolo de papel germitest (RP). Em ambos os ensaios, as sementes foram colocadas em câmara BOD sob temperatura constante de 25°C e luz constante, por período de 10 dias, sendo avaliadas as características índice de velocidade de germinação (IVG) e a porcentagem de germinação. No segundo capítulo foram realizados três ensaios. No primeiro foram determinadas as curvas de embebição para as temperaturas de: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. No segundo ensaio, para identificar as temperaturas cardinais, as sementes foram mantidas sob cada temperatura, pelo período de 10 dias em câmara tipo BOD, sob luz constante. No terceiro ensaio, foi realizado teste de condutividade elétrica (CE) com as

sementes incubadas por períodos de 24, 48 e 72 horas de embebição em cada uma das temperaturas citadas anteriormente, e, em seguida, as mesmas foram colocadas em erlenmeyers com 75 mL de água deionizada a 25°C, por 24 horas para posterior leitura da condutividade. No terceiro capítulo, foram realizadas análises enzimáticas. As determinações das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foram feitas no endosperma micropilar e no eixo embrionário de sementes colocadas para germinar sob as mesmas condições descritas acima, sob temperaturas de 15, 25, 30 e 40°C, e a cada 12 horas foram retiradas amostras até a protrusão radicular de 50% das sementes ou 168 horas para a temperatura de 15°C. Sementes pequenas e claras possuem germinação e IVG inferiores às sementes pequenas e escuras e às grandes, independentemente da cor. O substrato mais indicado para a realização de testes de germinação em laboratório é o rolo de papel germitest. A temperatura atuou de forma significativa na germinação e na sincronização de sementes de *Melanoxylon brauna*. As temperaturas cardinais para germinação (%) são: 12,3°C – mínima, 30,0°C – ótima (teórica) e 42,7°C – máxima. As faixas de temperatura considerando-se todas as variáveis investigadas foram: 12,1-12,6°C (mínima); 30-35,8°C (ótima); e 42,4-43°C (máxima). A espécie apresenta uma grande amplitude de germinação com relação à temperatura, sendo verificada germinação na faixa de temperatura de 12 a 42°C. O teste de CE foi eficiente para avaliar o efeito da temperatura sobre a qualidade fisiológica e segundo este, a temperatura ótima é de 27°C. Não foi detectada a atividade das enzimas SOD, APX e CAT no endosperma micropilar durante a germinação de sementes sob diferentes temperaturas. No eixo embrionário, as atividades das enzimas SOD e CAT apresentaram maiores alterações ao longo da germinação quando submetidas às temperaturas de 15 e 40°C. A atividade da enzima APX, no eixo embrionário, não foi afetada pela temperatura ao longo da germinação e sua atividade foi extremamente baixa.

## ABSTRACT

FLORES, Andressa Vasconcelos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011.  
**Germination of *Melanoxylon brauna* (Schott) seeds under different temperatures: morphophysiologic and enzymatic aspects.** Advisor: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Co-advisors: Valéria Monteze Guimarães and José Francisco Carvalho Gonçalves.

The germination of tropical tree species needs more precise information on the physical and intrinsic factors that may interfere in the germination process. Given this fact, this study aimed to investigate the morphometric characteristics and increasing levels of temperature and its implications on the physiology and metabolism of *Melanoxylon brauna* Schott seeds during the germination process. To this end, the experiments were conducted at the Laboratory of Seed Analysis of Forestry in Department of Forestry, University Federal of Viçosa - UFV. The seeds used in this study were collected from 10 trees in the city of Leopoldina - MG. In the first chapter, two assays were conducted, the first to evaluate the effect of color and size, in which the seeds were visually classified into light and dark, and in relation to size in large and small, and then were sown in two pieces of filter paper. In the second assay, were evaluated the effect of different substrates on germination. Thus, were tested the substrates on sand (SA), between sand (EA), on paper germitest (SP), between paper germitest (EP) and paper roll germitest (RP). In both trials, seeds were placed in BOD under constant temperature of 25°C and constant light for 10 days, and evaluated the characteristics of germination speed index (GSI) and percentage of germination. In the second chapter were carried out three assays. In the first were determined curves of soaking at temperatures of 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45°C. In the second trial, to identify the cardinal temperatures, seeds were kept under each temperature for a period of 10 days in BOD, under constant light. For the third test, was carried out electrical conductivity test (EC) with the seeds incubated for 24, 48 and 72 hours of immersion in each of the temperatures mentioned above, and then they were placed in erlenmeyers with 75 mL deionized water at 25°C, for 24 hours for subsequent reading of conductivity. In the third chapter, enzymatic analysis was performed. Measurements of the activities of superoxide dismutase (SOD, EC

1.15.1.1), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) and catalase (CAT, EC 1.11.1.6) were made in the micropylar endosperm and embryonic axis of seeds germinated under the same conditions described above, at temperatures of 15, 25, 30 and 40°C, and every 12 hours until the samples were taken root protrusion of 50% of the seeds or 168 hours to a temperature of 15°C. Seeds small and light have lower germination e IVG that the small and large, regardless of color. The substrate most suitable for the testing laboratory germination is the paper roll germitest. The temperature appeared significantly in germination and synchronization of *Melanoxylon brauna* seeds. The cardinal temperatures for germination (%) are: 12.3°C - minimum – 30.0°C - optimal (theoretical) and 42.7°C – maximum. The temperature ranges considering all the variables investigated were: 12.1 to 12.6°C (minimum); 30 to 35.8 ° C (optimum) and 42.4 to 43°C (maximum). The specie has a wide range of germination with respect to temperature, germination was observed in the temperature range from 12 to 42°C. The EC test was efficient to evaluate the effect of temperature on the physiology and according to this, the optimum temperature is 27°C. Did not detect the activity of SOD, APX and CAT in the micropylar endosperm during seed germination under different temperatures. In the embryonic axis, the activities of SOD and CAT showed greater changes along the germination when subjected to temperatures of 15 and 40°C. The APX enzyme activity in the embryonic axis was not affected by temperature during germination and its activity was extremely low.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, tem-se intensificado o interesse na propagação de espécies nativas, em razão da necessidade de recuperação de áreas degradadas e recomposição da paisagem, decorrentes do desmatamento e do avanço da agricultura (LIMA et al., 2006).

Ao iniciar um programa de reflorestamento com espécies nativas, independentemente da finalidade, o conhecimento sobre tecnologia de sementes é fundamental, sobretudo quanto às informações inerentes ao processo germinativo. As condições requeridas para a germinação de sementes são distintas para cada espécie e a busca pelo conhecimento das condições ótimas da germinação de sementes florestais fornece informações sobre a propagação e a fisiologia das espécies (MEDEIROS et al., 2001; VARELA et al., 2005).

No entanto, não há conhecimento suficiente sobre o manejo e análise de sementes de maioria das espécies, de modo a fornecer dados que possam caracterizar seus atributos físicos e fisiológicos. Há, também, necessidade de se obterem informações sobre a germinação, cultivo e potencialidades dessas espécies, visando à utilização para os mais diversos fins, tais como a produção de mudas e o melhoramento genético (ARAÚJO NETO et al., 2003).

Estudos dos processos fisiológicos e bioquímicos de sementes são o ponto de partida para a utilização e exploração de forma racional das espécies nativas, sendo a qualidade física, fisiológica e genética fatores preponderantes para o sucesso dos programas de produção das mudas.

Para que ocorra a germinação da semente, cada espécie exige condições específicas. A germinação é um processo complexo, que envolve uma sequência de eventos fisiológicos, controlada por diversos fatores endógenos e exógenos às sementes. Dentre os fatores exógenos, a temperatura age na germinação de três formas, determinando a capacidade e a porcentagem de germinação das sementes, eliminando as dormências primárias e secundárias ou induzindo a dormência secundária (BEWLEY e BLACK, 1994).

A germinação tem início com a embebição das sementes, estimulando a síntese de enzimas ou a ativação daquelas pré-existentes, resultando na mobilização de reservas e na digestão da parede celular, enfraquecendo-a e permitindo que a raiz primária rompa o tegumento (BORGES e RENA, 1993).

Sabe-se que o processo de germinação envolve uma série de atividades metabólicas, durante as quais ocorre uma sequência programada de reações químicas, cada uma dessas apresentando exigências próprias quanto à temperatura, principalmente porque dependem da atividade de sistemas enzimáticos específicos (MARCOS FILHO, 2005).

Há poucos trabalhos disponíveis na literatura que abordam as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de espécies nativas, como, por exemplo, as relações entre atividades enzimáticas nos diferentes compartimentos das sementes durante a germinação, sob diferentes temperaturas.

*Melanoxylon brauna* Schott é uma espécie florestal pertencente à família Fabaceae, conhecida popularmente como braúna, braúna preta, graúna, maria-preta, rabo-de-macaco (LORENZI, 2002). Ocorre naturalmente no Sul da Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Pará, Rio de Janeiro e Sergipe. Classificada como semidecídua, heliófila (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 2002). Sua madeira é muito pesada, apresentando densidade de 1,05 g cm<sup>-3</sup>, compacta, muito dura ao corte e de grande durabilidade mesmo quando em ambientes adversos, sendo própria para obras externas e hidráulicas, dentre outros. É uma espécie potencial para reflorestamentos e arborização urbana (LORENZI, 2002; ALMEIDA et al., 1998). Devido à exploração de sua madeira e à falta de replantios, a espécie está presente na “lista oficial de flora ameaçada de extinção” estabelecida pela Instrução Normativa N° 6, de 23 de setembro de 2008 (MMA, 2011).

Portanto, diante do exposto entende-se que o grande repertório de espécies nativas da diversidade vegetal brasileira, principalmente, espécies arbóreas pertencentes aos diversos biomas precisa ser urgentemente e sustentavelmente investigado do ponto de vista do processo germinativo. Uma vez que as informações obtidas até então, são quase sempre insuficientes e/ou fragmentadas para o entendimento das diferentes estratégias ou mecanismos empregados na germinação de espécies arbóreas nativas. Desta maneira, mais estudos sobre características morfométricas e fisiológicas podem ser um modelo efetivo para decifrar o nível de desempenho funcional e as implicações apresentadas para cada espécie. Assim como, explicitar os efeitos isolados ou combinados dos fatores físicos do meio, como a temperatura sobre a germinação, pode consolidar o conhecimento das relações de causa e efeito relacionados ao metabolismo celular durante o processo germinativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1998. 464p.

ARAÚJO NETO, J. C.; AGUIAR, I. B.; FERREIRA, V. M. Efeito da temperatura e da luz na germinação de sementes de *Acacia polyphylla* DC. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 249-256, 2003.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Editora UFV, Viçosa – MG, 1999. 443 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B. de; PIÑA RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.) **Sementes Florestais Tropicais**. Brasília: ABRATES, p. 83-135, 1993.

LIMA, J. D.; ALMEIDA, C. C.; DANTAS, V. A. V.; SILVA, B. M. da S.; MORAES, W. da S. Efeito da temperatura e do substrato na germinação de sementes de *Casalpinia ferrea* Mart. Ex Tul. (Leguminosae, Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, v. 30, n. 4, p. 513-518, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Ed. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2002. 368 p.

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

MEDEIROS, A. C. S.; BOSCARDIN, D. M.; ABREU, D. C. A. de **Efeito da quantidade de água do substrato na germinação de sementes de *Escallonia montevidensis* (Cham. & Schl.) DC. (*Saxifragaceae*) em laboratório**. Comunidade Técnico 68, EMBRAPA Colombo – PR, 2001. 4p.

MMA – **Lista oficial de Flora ameaçada de extinção** – acesso em 20/01/2011. Site: <[http://www.tecniflora.com.br/flora\\_brasileira\\_ameacada.pdf](http://www.tecniflora.com.br/flora_brasileira_ameacada.pdf)> ou <<http://www.mma.gov.br>>

VARELA, V. P.; RAMOS, M. B. P.; MELO, M. F. F. Umedecimento do substrato e temperatura na germinação de sementes de angelim-pedra (*Dinizia excelsa* Ducke). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 13-135, 2005.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Descrição da espécie

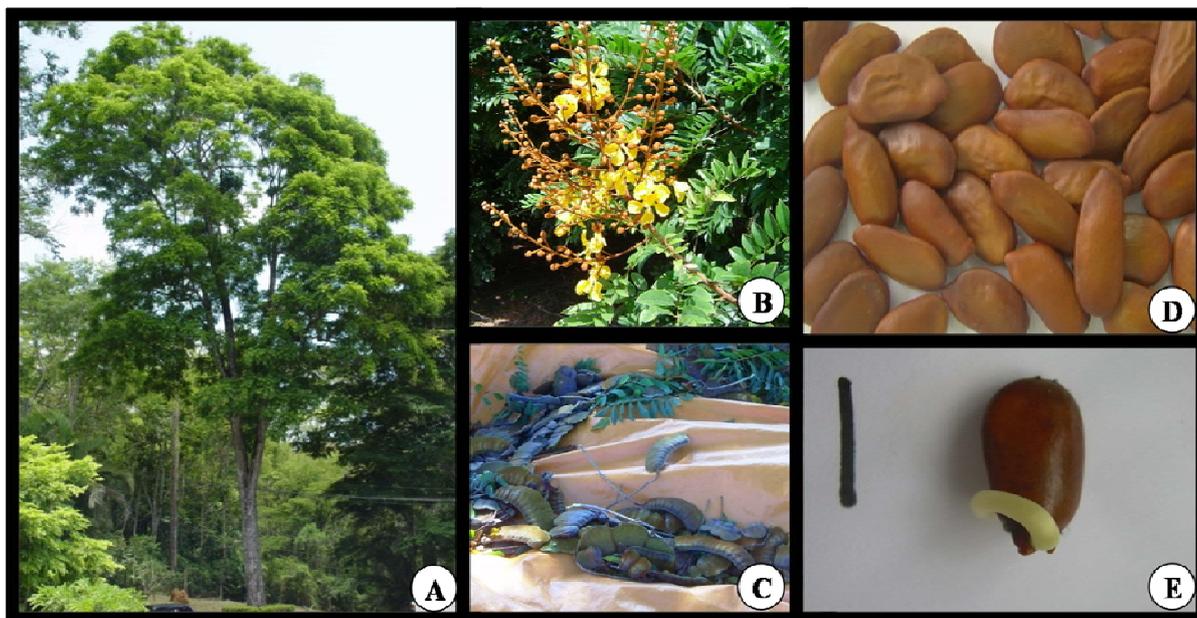
*Melanoxylon brauna* Schott é uma espécie florestal pertencente à família Fabaceae, conhecida popularmente como braúna, braúna-preta, graúna, maria-preta, rabo-de-macaco. Ocorrendo naturalmente desde o sul da Bahia até São Paulo e Minas Gerais (LORENZI, 2002).

A espécie pode atingir de 15 a 25 m de altura e 40 a 80 cm de diâmetro; suas folhas são compostas imparipinadas, com 15 a 29 folíolos opostos e glabros, de 4 a 7 cm de comprimento. As flores são amareladas, em panículas terminais amplas. O fruto é legume deiscente, contendo várias sementes duras envoltas por estrutura membranácea (asa) que possibilita sua dispersão pelo vento (BARROSO et al., 1999; LORENZI, 2002).

O florescimento ocorre de fevereiro a abril e os frutos amadurecem no período de setembro a outubro. A madeira é muito pesada, apresentando densidade de  $1,05 \text{ g cm}^{-3}$ , compacta, muito dura ao corte, superfície lisa ao tato, de pouco brilho, textura fina, grã direita, de grande durabilidade mesmo quando em ambientes adversos. A casca é utilizada em curtume para extração de tintura negra, enquanto a seiva o é na medicina e na indústria. Além disso, suas sementes são muito atacadas por insetos, o que torna difícil encontrar sementes viáveis em grandes quantidades (LORENZI, 2002).

A madeira é própria para obra externas e hidráulicas, moirões, postes, dormentes, para construção civil, como vigas, caibros, tacos e assoalhos, para confecção de peças torneadas, esquadrias, folhas faqueadas, instrumentos musicais, cabos de ferramentas, dentre outros. A árvore apresenta potencial para o paisagismo em geral, devido às suas características ornamentais, e também é muito útil para reflorestamentos. É planta semidecídua, heliófila ou de luz difusa, característica da mata pluvial atlântica (LORENZI, 2002).

Devido à exploração de sua madeira e à falta de replantios, a espécie está presente na “lista oficial de flora ameaçada de extinção” estabelecida pela Instrução Normativa N° 6, de 23 de setembro de 2008 (MMA, 2011).



**Figura 1** - *Melanoxylon brauna* Schott: aspecto geral da árvore (A); detalhe da floração (B); detalhe dos frutos (C), detalhe das sementes (D); semente germinada (E). Fonte: BORGES (2010); FLORES (2010).

## Germinação

Existem diversos conceitos para germinação, entretanto os mais aceitos são a germinação do ponto de vista agrônomo ou tecnológico na qual são consideradas germinadas as sementes que emergem parte da planta do solo ou a formação de uma plântula vigorosa sobre um substrato, sendo este mais apropriado para estudos em condições de campo; e o conceito biológico ou botânico, que considera germinadas as sementes que emergem uma das partes do embrião de dentro dos envoltórios, sendo que este processo deve ser acompanhado de algum sinal de metabolismo ativo, como a curvatura da radícula (LABOURIAU, 1983).

A germinação de sementes consiste na reativação do crescimento do embrião por meio de uma sequência ordenada de eventos metabólicos, resultando na ruptura do tegumento pela radícula. O início desse processo se dá pela absorção de água pelas sementes e termina com o alongamento do eixo embrionário. Os mesmos autores propuseram que o processo de germinação inicia com a embebição, sendo que esta última ocorre de forma trifásica. As três etapas principais compreendem a Fase I ou de reativação (embebição, ativação da respiração e das demais etapas do metabolismo); Fase II ou de indução do crescimento (fase de repouso) e a Fase III ou de crescimento (protrusão da raiz primária) (BEWLEY e BLACK, 1994).

De maneira geral, são exigidas três condições básicas para que uma semente germine: condições ideais de água, oxigênio e temperatura. A água é fundamental para a reativação do metabolismo no eixo embrionário, o oxigênio participa das reações de oxidação no processo de respiração e síntese de energia através da adenosina trifosfato (ATP) e a temperatura é um fator importante, pois as espécies são adaptadas a diferentes temperaturas, havendo uma ampla faixa de temperatura em que pode ocorrer a germinação (CASTRO et al., 2004).

Muitos outros fatores influenciam no processo de germinação, citando-se como intrínseco às sementes a viabilidade, longevidade, sanidade, genótipo, grau de maturidade, dormência, dentre outros (MARCOS FILHO, 2005).

O conhecimento das condições ideais para a germinação da semente de uma determinada espécie é de fundamental importância, principalmente, pelas respostas diferenciadas que ela pode apresentar em função dos mais diversos fatores (BEWLEY e BLACK, 1994; BRASIL, 2009). A padronização de métodos de análise de sementes é importante, pois, objetiva resultados uniformes para um determinado lote, em diferentes laboratórios. A seguir será apresentada uma breve revisão a respeito da influência de alguns fatores como cor e tamanho das sementes, substrato e temperatura, sobre a germinação e o vigor das sementes.

### *Cor e tamanho*

A coloração do tegumento tem influência sobre a qualidade fisiológica das sementes. A cor do tegumento está associada ao grau de maturação, sendo as sementes de coloração mais clara as mais imaturas (LUCENA et al., 2008).

O tamanho das sementes é uma característica que apresenta grande variabilidade, sendo definido pelo comprimento, largura e espessura. Segundo Winn (1991), as plantas produzem sementes de tamanhos completamente desuniformes, devido às variações na disponibilidade de recursos nutricionais durante o desenvolvimento dos frutos.

O tamanho pode ser um indicativo da qualidade fisiológica das sementes para muitas espécies e, geralmente, nesses casos, as pequenas apresentam menores taxas de germinação e vigor quando comparadas com as sementes de tamanho médio e grande (BIRUEL et al., 2010). Sementes maiores originam plântulas mais vigorosas, com tamanho e massa maior que plântulas provenientes de sementes menores (VANZOLINI e NAKAGAWA, 2007).

Pesquisas avaliando a influência do tamanho na qualidade fisiológica das sementes foram realizadas para diversas espécies (FIGUEIREDO, 1989; ALVES et al., 2005; COSTA

et al., 2006; GHISOLFI et al., 2006; MANDAL et al., 2008; RESENDE et al., 2010; BIRUEL et al., 2010). Contudo, esse aspecto tem sido pouco estudado com espécies nativas, apesar da grande diversidade destas (BIRUEL et al., 2010).

### *Substrato*

O substrato é outro fator que influencia o comportamento das sementes durante a condução dos testes de germinação (ALVES et al., 2002; CETNARSKI FILHO e CARVALHO, 2009). Tal influência na germinação é decorrente de características como estrutura, grau de aeração, capacidade de retenção de água e grau de infestação de patógenos dentre outros, que podem variar de acordo com o substrato (POPINIGIS, 1985).

Em função do tamanho e exigências ecofisiológicas das sementes quanto à umidade e luz, cada substrato é utilizado de maneira que ofereça maior praticidade nas avaliações, mantendo a capacidade de suprir as condições ideais no decorrer do teste de germinação (POPINIGIS, 1985)

Para a escolha do substrato de germinação devem ser observadas algumas características do material a ser utilizado, tais como composição, capacidade de retenção de água, estrutura dos poros, pH, pureza microbiológica, resistência, toxicidade, tamanho e textura (BRASIL, 2009), pois é no substrato que as sementes serão condicionadas para germinarem, e este tem a função de manter as condições adequadas para que o processo germinativo ocorra (FIGLIOLIA et al., 1993).

Os substratos mais utilizados em testes de germinação em diferentes laboratórios e pesquisas são: papel filtro, papel toalha, areia, vermiculita, terra, papel mata-borrão e carvão (OLIVEIRA et al., 1996).

O substrato ideal para condução de teste de germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* ainda é desconhecido e as Regras para Análise de Sementes vigente (BRASIL, 2009) não apresentam recomendações para esta espécie.

### *Temperatura*

Na ausência de outros fatores limitantes, a germinação ocorre em ampla faixa de temperatura, cujos limites dependem da espécie e do material genético, bem como das condições ambientais durante o processo de produção, do manejo pré e pós-colheita e da sanidade do material biológico (MARCOS FILHO, 2005).

O processo de germinação envolve uma série de atividades metabólicas, durante as quais uma sequência programada de reações químicas, cada uma dessas apresentando exigências próprias quanto à temperatura, principalmente porque dependem da atividade de sistemas enzimáticos específicos (MARCOS FILHO, 2005).

As variações da temperatura também afetam a velocidade, a percentagem e a uniformidade de germinação (MARCOS FILHO, 2005). Em função da estreita relação da temperatura com esses fatores, é de suma importância a determinação da temperatura em que a eficiência do processo é total (temperatura ótima) e seus extremos (máxima e mínima). Os extremos e a temperatura ótima representam as temperaturas cardeais ou cardinais para a germinação (LABOURIAU, 1983; MARCOS FILHO, 2005).

A temperatura ótima é aquela na qual se verifica a máxima porcentagem de germinação em menor espaço de tempo, enquanto as temperaturas máxima e mínima caracterizam pontos críticos em que acima e abaixo dessas, respectivamente, não ocorre germinação (LABOURIAU, 1983; MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1989). Entretanto, a temperatura em que se observa a máxima velocidade é ligeiramente superior à correspondente à máxima percentagem de germinação (MARCOS FILHO, 2005).

A temperatura pode afetar a absorção de água e as reações bioquímicas que regulam o metabolismo envolvido no processo germinativo, sendo que a faixa de temperatura, dentro da qual as sementes podem germinar, é característica para cada espécie (BEWLEY e BLACK, 1994). A faixa de temperatura de 20 a 30°C é adequada para a germinação da maioria das espécies subtropicais e tropicais (BORGES e RENA, 1993).

A faixa de temperatura adequada para germinação de *Cedrela odorata* encontra-se entre 25 e 30°C (ANDRADE e PEREIRA, 1994), para *Myracrodruon urundeuva* a faixa ótima é de 20 a 30°C (SILVA et al., 2002) e para *Marcetia taxifolia* de 15 a 20°C (SILVEIRA et al., 2004). Entretanto, *Matricaria recutita* possui alta taxa de germinação na temperatura de 15°C (NÓBREGA et al., 1995) e *Tabebuia aurea* apresenta temperatura ótima de 35°C para germinação (CABRAL et al., 2003).

Os limites extremos de temperatura para germinação fornecem informações de interesse ecológico, sendo importante a determinação das temperaturas mínima, ótima e máxima para cada espécie (LABOURIAU e PACHECO, 1978). Para *Tabebuia áurea*, a germinação ocorre dentro de ampla faixa de temperatura, sendo as temperaturas cardeais (mínima, ótima e máxima) de 20, 35 e 40°C, respectivamente (CABRAL et al., 2003). Essa característica significa caráter adaptativo que propicia alta capacidade de estabelecimento em campo, aumentando assim a chance de sobrevivência, em comparação com as espécies que

apresentam estreita faixa de temperatura para germinar (TOWNSEND e MCGINNIES, 1972; LABOURIAU, 1983).

A temperatura ótima, bem como seus extremos (mínima e máxima), para a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* ainda não foi estudada, e não há recomendações de temperatura para a condução de testes de germinação para a espécie nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

### **Sistema enzimático antioxidante**

Durante o processo germinativo das sementes, diversas enzimas estão envolvidas em reações metabólicas de síntese e degradação de moléculas. Considera-se ainda no processo de germinação a atividade de enzimas removedoras de radicais livres ou antioxidantes, como as superóxido dismutases, peroxidases e catalases, que são mecanismos de defesa eficientes na desintoxicação durante a embebição (McDONALD, 1999).

Enzimas são proteínas altamente especializadas, fundamentais para qualquer processo biológico, com a função de catalisar as reações químicas. As enzimas são específicas para as reações que catalisam, ou seja, uma enzima catalisa somente determinada reação. Devido à sua natureza protéica, as enzimas são extremamente afetadas pelo ambiente (LENHINGER et al., 1995).

O O<sub>2</sub> em seu estado fundamental não é uma molécula reativa, porém, pode dar origem a compostos com estados excitados, como os radicais livres, que possuem alta reatividade. O termo mais apropriado para designar agentes reativos é “espécies reativas de oxigênio” (EROs), pois, alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados na sua camada externa (OLIVEIRA, 2005).

As plantas possuem uma adaptação que permite a elas coexistirem com determinados níveis de EROs, em maior ou menor grau. No entanto, quando em quantidades excessivas, as EROs se acumulam nos tecidos, tornando-se tóxicas, o que pode levar as células à morte (RESENDE et al., 2004). Como defesa as plantas possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (SCANDALIOS, 1993).

A produção de EROs afeta a formação de várias enzimas, mediante a promoção de modificadores na sua estrutura, porém, um dos principais efeitos é a degradação do sistema de síntese de novas enzimas (McDONALD, 1999). Os danos peroxidativos decorrem principalmente da deterioração oxidativa de ácidos graxos insaturados das membranas, pela ação de EROs presentes no interior das células. As EROs incluem o oxigênio “singlete”

(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e radical hidroxila (OH<sup>-</sup>), dentre outros (SCANDALIOS, 1993).

Em condições fisiológicas normais, o equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs pode ser perturbado por fatores ambientais adversos. Como resultado desses distúrbios, o nível intracelular de EROs pode aumentar rapidamente (SCANDALIOS, 2005).

A atividade de enzimas removedoras de radicais livres constitui eficiente mecanismo de desintoxicação durante a embebição (McDONALD, 1999). Dentre as enzimas antioxidantes envolvidas na eliminação de EROs em plantas tem-se as superóxidos dismutases (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidases do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11), e a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) (MITTLER, 2002; SCANDALIOS, 2005). Estas enzimas participam diretamente na remoção das EROs ou que catalisam reações de formação ou regeneração de moléculas para remoção das EROs (MARTINS e MOURATO, 2008). O poder redutor destes mecanismos enzimáticos deriva direta ou indiretamente do NADPH ou da ferredoxina (MOLLER et al., 2007). O aumento da atividade dessas enzimas indica a evolução da deterioração, devido à necessidade de atuação mais intensa das enzimas participantes do complexo antioxidante (MARCOS FILHO, 2005).

Os principais efeitos metabólicos e bioquímicos referentes ao processo de deterioração das sementes são: a redução da respiração e da síntese de ATP, alterações em sistemas enzimáticos, alterações no metabolismo de reservas, alterações nas taxas de síntese e alterações nos sistemas de membranas (MARCOS FILHO, 2005). Segundo o mesmo autor, as alterações enzimáticas que podem ocorrer durante o processo de deterioração são: alterações na estrutura das enzimas, inativação progressiva de enzimas, redução ou paralisação da síntese de certas enzimas, menor atividade de enzimas respiratórias, a síntese “de novo” de enzimas torna-se errática ou suprimida, acarretando problemas à divisão e ao alongamento celular, respiração e atividades gerais de síntese. Sendo assim, constata-se a grande relevância das enzimas do complexo antioxidante no metabolismo das plantas.

Para evitar danos celulares irreversíveis, enzimas do sistema antioxidante entram em ação, quando os níveis de EROs ultrapassam determinados níveis, de acordo com cada espécie (SCANDALIOS, 2005).

De modo indireto, por meio de análises enzimáticas, a produção de EROs já foi relatada em diversas espécies durante a embebição das sementes. No entanto, os locais exatos de produção de EROs durante o processo de germinação ainda não são conhecidos; alguns locais como o eixo embrionário, tegumentos e camadas do aleurona são mencionados como locais favoráveis para a síntese dessas moléculas (BAILLY, 2004).

A produção de EROs durante a germinação de sementes é considerada como uma causa de estresse que pode afetar o sucesso da germinação. Sendo assim, enzimas removedoras de EROs são consideradas de grande importância para a conclusão da germinação (BAILLY, 2004). A detecção da atividade destas enzimas durante a germinação tem sido verificada em sementes de diversas espécies, tais como: *Triticum aestivum* (CAKMAK et al., 1993), *Picea omorika* (PRODANOVIC et al., 2007), *Hordeum vulgare* (MEI e SONG, 2010), *Medicago sativa* (CAKMAK et al., 2010), e *Jatropha curcas* (CAI et al., 2011). Poucos trabalhos com sementes de espécies florestais, tampouco, sob influência da temperatura, foram encontrados na literatura. Há carência de informações fisiológicas e bioquímicas em sementes de espécies florestais durante a fase de germinação (BORGES et al., 2002).

#### *Superóxido dismutase (SODs, EC 1.15.1.1)*

Dentro da célula, as superóxido dismutases constituem a primeira linha de defesa contra EROs (ALSCHER et al., 2002). Como todos os compartimentos celulares são possíveis locais de formação de  $O_2^-$ , é fundamental que SODs estejam presentes para removê-los (BORGES, 2002).

De acordo com o metal co-fator usado pela enzima, as SODs são classificadas em três grupos de coenzimas e encontram-se em compartimentos celulares específicos: FeSOD (plastídeo), MnSOD (mitocôndria), e Cu/ZnSOD (citosol) (ALSCHER et al., 2002; SCANDALIOS, 2005). SODs são encontradas principalmente no citoplasma celular e na matriz mitocondrial e constituem o primeiro grupo de enzimas que catalisa a reação de dismutação de radicais superóxido livres ( $O_2^-$ ) para oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (McDONALD, 1999).

Taiz e Zaiger (2004) relatam que, apesar de sua grande efetividade na neutralização do oxigênio reativo, a SOD produz  $H_2O_2$  que, apesar de menos reativo, em altas concentrações torna-se tóxico. Dessa forma, sua atividade isolada é pouco funcional na proteção da semente, sendo necessária a formação de um sistema removedor de radicais livres, conjuntamente com catalase, peroxidase, dentre outras (BOWLER et al., 1992; McDONALD, 1999).

### *Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)*

A ascorbato-peroxidase é uma oxidoredutase, e a reação geral da sua atividade de peroxidação é a seguinte:  $2ASC + H_2O_2 \rightarrow 2MDA + H_2O$ , em que ASC representa o ascorbato, que atua como substrato doador de elétrons (reductor) e o MDA representa o monodihidroascorbato, substrato oxidado. A ascorbato-peroxidase participa no ciclo da glutathiona-ascorbato e desempenha papel importante no metabolismo do  $H_2O_2$  das plantas superiores, compreendendo uma série de isoenzimas com diferentes características responsáveis pela sua degradação (SHIGEOKA et al., 2002).

O ciclo da glutathiona-ascorbato também pode eliminar parte do  $H_2O_2$ , e para tanto, envolve as enzimas ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDAR), dehidroascorbato redutase (DHAR) e glutathiona redutase (GR), que participam da regeneração do ácido ascórbico, um antioxidante poderoso (vitamina C), glutathiona reduzida e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (BAILLY, 2004). As enzimas deste ciclo estão presentes nos cloroplastos, citoplasma, mitocôndria, peroxissomos e apoplastos (MITTLER, 2002), e aumentam sua atividade em resposta ao estresse oxidativo.

### *Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)*

As catalases são proteínas tetraméricas que catalisam a conversão do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) (SCANDALIOS, 2005). O  $H_2O_2$  formado pode ser decomposto pela catalase, cujas subunidades são formadas no citoplasma, sendo a síntese completada no peroxissomo (McDONALD, 1999). Em outra rota, sem ação dessas enzimas, o  $H_2O_2$  pode reagir formando radicais hidroxila que causam a peroxidação de lipídios (BOWLER et al., 1992).

A influência da peroxidação dos lipídios sobre as mitocôndrias é geralmente o primeiro passo em direção à morte da célula (McDONALD, 1999). O problema da peroxidação dos lipídios não é apenas a destruição dos lipídios, mas a ocorrência de uma série de reações que originam produtos potencialmente tóxicos como a liberação de radicais, superóxido e hidroxila (MARCOS FILHO, 2005). O ataque desses radicais livres promove alterações nas membranas das cristas das mitocôndrias e conseqüente decréscimo da formação de ATP, forma de energia fundamental para os eventos metabólicos durante a germinação (MARCOS FILHO, 2005).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. U.; PAULA, R. C. de; OLIVEIRA, A. P.; BRUNO, R. L. A.; DINIZ, A. A. Germinação de sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth em diferentes substratos e temperatura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 169-178, 2002.
- ALVES, E. U.; BRUNO, R. de L. A.; OLIVEIRA, A. P. de; ALVES, A. U.; ALVES, A. U.; PAULA, R. C. de Influência do tamanho e da procedência de sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. sobre a germinação e vigor. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 877-885, 2005.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.
- ANDRADE, A. C. S. de; PEREIRA, T. S. Efeito do substrato e da temperatura na germinação e no vigor de sementes de cedro – *Cedrela odorata* L. (Meliaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, p.34-40, 1994.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004
- BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Editora UFV, Viçosa – MG, 443 p., 1999.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BIRUEL, R. P.; PAULA, R. C. de; AGUIAR, I. B. de Germinação de sementes de *Caesalpinia leiostachya* (Benth) Ducke (pau-ferro) classificadas pelo tamanho e pela forma. **Revista Árvore**, v. 34, n. 2, p. 197-204, 2010.
- BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B. de; PIÑA RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.) **Sementes Florestais Tropicais**. Brasília: ABRATES, p. 83-135, 1993.
- BORGES, E. E. L.; PEREZ, S. J. G. A.; BORGES, R. C. G.; REZENDE, S. T.; GARCIA, S. R. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (tamboril-da-mata). **Revista Árvore**, v. 26, n.5, p. 603-613, 2002.
- BOWLER, C; VAN MONTAGU, M; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 43, p.83-116, 1992.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009. 399p.

- CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. DE A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. F. ex. S. Moore. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, p. 609-617, 2003.
- CAI, F.; MEI, L.; AN, X.; GAO, S.; TANG, L.; CHEN, F. Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. **Journal of Agriculture and Biology**, v. 13, p. 25-30, 2011.
- CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 258, p. 127-132, 1993.
- CAKMAK, T.; ATICI, O.; AGAR, G.; SUNAR, S. Natural aging-related biochemical changes in alfafa (*Medicago sativa* L.) seeds stored for 42 years. **International Research Journal of Plant Science**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2010.
- CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 149-162, 2004.
- CETNARSKI FILHO, R.; CARVALHO, R. I. N. de Massa da amostra, substrato e temperatura para teste de germinação de sementes de *Eucalyptus dunni* Maiden. **Ciência Florestal**, v. 19, n. 3, p. 257-265, 2009.
- COSTA, E. S.; OLIVEIRA, I. V. de M.; MÔRO, F. V.; MARTINS, A. B. G. Aspectos morfológicos e influência do tamanho da semente na germinação do jambo-vermelho. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 117-120, 2006.
- FIGLIOLIA, M. B.; OLIVEIRA, E. C.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Análise de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (coords.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, p. 137-174, 1993.
- FIGUEIREDO, S. F. L. Germinação de sementes de jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 1, n. 1, p. 99-107, 1989.
- GHISOLFI, E. M.; EFFGEN, E. M.; MENDONÇA, A. R. da; NAPPO, M. E.; SILVA, A. G. da Influência do tamanho da sementes e tipo de recipiente na germinação de *Schizolobium amazonicum* (Herb) Ducke. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, ano. V, n. 9, 2006.
- LABOURIAU, L. G.; PACHECO, A. On the frequency of isothermal germination in seeds of *Dolichos biflorus* L. **Plant & Cell Physiology**, v. 19, n. 3, p. 507-512, 1978.
- LABOURIAU, L. G. **Germinação das sementes**. Washington: Secretaria-Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.
- LENHINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (Trad. SIMÕES, A. A.; LODI, W. R. N.) **Princípios de Bioquímica**. 2ª Edição, São Paulo: SARVIER, 1995. 839 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Ed. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2002. 368 p.

LUCENA, A. M. A. de; SEVERINO, L. S.; BELTRÃO, N. E. de M.; SOFIATTI, V.; MEDEIROS, K. A. A. L.; OLIVEIRA, M. I. P. de; BORTOLUZI, C. R. D. Influência do estágio de maturação da semente e da profundidade de semeio I: emergência das plântulas e área dos cotilédones. In: III Congresso Brasileiro de Mamona, Energia e Ricinoquímica. **Anais**, 2008. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/cbm3/trabalhos/SEMENTES/S%2008.pdf>> Acessado em: 02 de janeiro de 2011.

MANDAL, S. M.; CHAKRABORTY, D.; GUPTA, K. Seed size: influence on germination and subsequent seedling performance in *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae). **Research Journal of Seed Science**, v. 1, n. 1, p. 26-33, 2008.

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

MARTINS, L.; MOURATO, M. Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo. **Revista Agros**, n. 2, 2008.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon press, McMillan, 1975, 236p.

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MEI, Y.; SONG, S. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 11, n. 12, p. 965-972, 2010.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

MMA – **Lista oficial de Flora ameaçada de extinção** – acesso em 20/01/2011. Site: <[http://www.tecniflora.com.br/flora\\_brasileira\\_ameacada.pdf](http://www.tecniflora.com.br/flora_brasileira_ameacada.pdf)> ou <<http://www.mma.gov.br>>

MOLLER, I.; JENSEN, P.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.

NÓBREGA, L. H. P.; CORREA JUNIOR, C.; RODRIGUES, T. de J. D.; CARREGARI, S. M. R. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de camomila (*Matricaria recutita*). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n. 2, p. 137-140, 1995.

OLIVEIRA, E. C.; PIÑA-RODRIGUES, F. C.; FIGLIOLIA, M. B. Propostas para a padronização de metodologias em análise de sementes florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 11, n. 1-3, p. 1-42, 1996.

OLIVEIRA, G. M. R. de Estresse oxidativo mediado por paraquat e clonagem do gene da dismutase do superóxido (Cu/Zn-SOD) em *Coffea canephora*. **Dissertação de Mestrado - UFV**, 2005. 62p.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

PRODANOVIĆ, O.; PRODANOVIĆ, R.; BOGDANOVIĆ, J.; MITROVIĆ, A.; MILOSAVIĆ, N.; RADOTIĆ, K. Antioxidative enzymes during germination of two lines of serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. **Archives Biological Science**, v. 59, n. 3, p. 209-216, 2007.

RESENDE, J. M.; CHITARRA, M. I. F.; MALUF, W. R.; CHITARRA, A. B.; SAGGIN JÚNIOR, O. J. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 20-212, 2004.

RESENDE, R. T.; ATAIDE, G. M.; BORGES, E. E. de L. Interação do tamanho com a composição química em fedegoso (*Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn.). **In: Anais do Simpósio de Integração Acadêmica – SIA (CD-ROM)**, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, 2010.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxides dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n. 372, p. 1305-1319, 2002.

SILVA, L. M. de M.; RODRIGUES, T. de J.; AGUIAR, D. I. B. de Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Árvore**, v.26, p.691-697, 2002.

SILVEIRA, F. A. O.; NEGREIROS, D.; FERNANDES, G. W. Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Marcetia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC. (Melastomataceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.847-851, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Califórnia: Cummings, 2004. 565p.

TOWNSEND, C. E.; MCGINNIES, W. J. Mechanical scarification of cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.) seed. **Crop Science**, v. 12, p. 392-394, 1972.

VANZOLINI, S.; NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. **Informativo ABRATES**, v. 17, n. 1-3, p. 76-83, 2007.

WINN, A. A. Proximate and ultimate sources of within individual variation in seed mass in *Prunella vulgaris* (Lamiaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 78, p. 838-844, 1991.

### 3. CAPÍTULO I

## **EFEITO DO SUBSTRATO, DA COR E DO TAMANHO DE SEMENTES DE *Melanoxylon brauna* NA GERMINAÇÃO E NO VIGOR**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do substrato, da cor e do tamanho das sementes sobre a germinação e vigor de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. Para tanto foram realizados dois ensaios. No primeiro ensaio, as sementes foram classificadas visualmente quanto à cor (claras e escuras) e ao tamanho (pequenas e grandes). No segundo ensaio foi investigada a influência do substrato sobre a germinação, para tanto os substratos testados foram: sobre areia (SA), entre areia (EA), sobre papel germitest (SP), entre papel germitest (EP) e rolos de papel germitest (R). Em ambos os ensaios, as sementes foram semeadas nos diferentes substratos, e colocadas durante período de 10 dias em câmara tipo BOD, com temperatura constante de 25°C, sob luz constante. Foi avaliado o número de sementes germinadas, e a partir deste resultado foi calculado o percentual de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG). Além disso, foi determinado o peso de mil sementes e a germinação da espécie foi caracterizada mediante acompanhamento visual de uma semente, até a formação da plântula. O peso de 1000 sementes de *Melanoxylon brauna* foi de 133,43 g. Em um quilograma de sementes foram encontradas 7.494 sementes. A protrusão da radícula ocorre em torno de 72 horas após início da embebição e é epígea. Sementes pequenas e claras possuem germinação e IVG inferiores às sementes pequenas e escuras, bem como às grandes, independente da cor. O substrato mais indicado para a realização de teste de germinação em laboratório foi o rolo de papel germitest.

**Palavras-chave:** substratos, sementes florestais, braúna

# **EFFECT OF SUBSTRATE, COLOR AND SIZE OF *Melanoxylon brauna* SEEDS ON GERMINATION AND VIGOUR**

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to investigate the effect of substrate, color and seed size on germination and vigor of *Melanoxylon brauna* Schott seeds. Therefore, were conducted two tests. In the first test, seeds were classified visually for color (light and dark) and size (small and large). In the second assay were investigated the influence of substrate on germination, for both the substrates tested were: on sand (SA), between sand (EA), paper germitest (SP) between paper germitest (EP) and paper roll germitest (R). In both assays, the seeds were sown on different substrates, and placed over a period of 10 days in BOD with constant temperature of 25°C under constant light. Were evaluated the number of seeds germinated, and from this result were calculated the germination percentage and germination speed index (GSI). Furthermore, were determined the weight of thousand seeds and the germination of the specie was characterized by visual monitoring of a seed, until the formation of the seedling. The weight of 1000 seeds of *Melanoxylon brauna* was 133.43 g. In one kg of seeds were found 7494 seeds. The radicle protrusion occurs around 72 hours after start of imbibition and is epigeal. Seeds small and light have germination and IVG lower than small and dark, as well as large, regardless of color. The substrate most suitable for carrying out germination test in the laboratory was the paper roll germitest.

**Keywords:** substrates, forest seeds, braúna

## **INTRODUÇÃO**

Ao iniciar um programa de reflorestamento com espécies nativas, independentemente da finalidade, o conhecimento sobre da germinação das sementes é fundamental, sobretudo quanto às informações básicas sobre a germinação. As condições requeridas para a germinação de sementes são distintas para cada espécie (MEDEIROS et al., 2001). A busca pelo conhecimento das condições ótimas da germinação de sementes florestais pode fornecer

informações consistentes sobre a fisiologia e a propagação das espécies (VARELA et al., 2005).

A coloração do tegumento das sementes tem influência sobre a qualidade fisiológica das sementes. A cor do tegumento está associada ao grau de maturação, sendo as sementes de coloração mais clara as mais imaturas (LUCENA et al., 2008).

O tamanho das sementes é uma das características que apresenta grande variabilidade, sendo definido pelo comprimento, largura e espessura. As plantas produzem sementes de tamanhos completamente desuniforme pelas variações na disponibilidade de recursos nutricionais durante o desenvolvimento dos frutos (WINN, 1991). O tamanho pode ser um indicativo da qualidade fisiológica das sementes para muitas espécies e, geralmente, nesses casos, as pequenas apresentam menores valores de germinação e vigor quando comparadas com as de tamanho médio e grande (BIRUEL et al., 2010). Sementes maiores originam plântulas mais vigorosas, com tamanho e massa maior que plântulas provenientes de sementes menores (VANZOLINI e NAKAGAWA, 2007).

Pesquisas avaliando a influência do tamanho na qualidade fisiológica das sementes foram realizadas com *Simmondsia chinensis* (FIGUEIREDO, 1989), *Mimosa caesalpiniiifolia* (ALVES et al., 2005), *Syzygium malaccense* (COSTA et al., 2006), *Schizolobium amazonicum* (GHISOLFI et al., 2006), *Hyptis suaveolens* (MANDAL et al., 2008), *Senna macranthera* (RESENDE et al., 2010) e *Caesalpinia leiostachya* (BIRUEL et al., 2010). Contudo, esse aspecto vem sendo pouco estudado com espécies nativas, apesar da grande diversidade (BIRUEL et al., 2010).

Além da cor e do tamanho, o substrato é outro fator que afeta o comportamento das sementes durante a condução dos testes de germinação (ALVES et al., 2002; CETNARSKI FILHO e CARVALHO, 2009). Para a escolha do substrato de germinação devem ser observadas algumas características do material a ser utilizado, tais como a composição, a capacidade de retenção de água, a estrutura porosa, o pH, a pureza microbiológica, a resistência, a toxidez, o tamanho e a textura (BRASIL, 2009). O fato é que no substrato as sementes são condicionadas para germinarem, e este tem a função de manter as condições adequadas para que o processo germinativo ocorra (FIGLIOLIA et al., 1993). Os substratos mais utilizados em testes de germinação em diferentes laboratórios e pesquisas são: papel filtro, papel toalha, areia, vermiculita, terra, papel mata-borrão e carvão (OLIVEIRA et al., 1996).

*Melanoxylon brauna* Schott é uma espécie florestal pertencente à família Fabaceae. Na nomenclatura popular é conhecida como braúna, braúna preta, graúna, maria-preta, rabo

de macaco (LORENZI, 2002). Ocorre naturalmente no Sul da Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Pará, Rio de Janeiro e Sergipe. Classificada como semidecídua, heliófila, com ocorrência também na floresta pluvial da encosta atlântica (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 2002). Plantas adultas dessa espécie normalmente possuem entre 15 a 25 m de altura e 40 a 80 cm de diâmetro. As flores são amareladas, em panículas terminais amplas. O fruto é um legume deiscente, contendo várias sementes duras envoltas por estrutura membranácea (sementes aladas) que possibilita dispersão pelo vento (BARROSO et al., 1999; LORENZI, 2002). O florescimento ocorre de fevereiro a abril e os frutos amadurecem no período de setembro a outubro. Sua madeira é muito pesada, apresentando densidade de  $1,05 \text{ g cm}^{-3}$ , compacta, muito dura ao corte e de grande durabilidade mesmo quando em ambientes adversos, sendo própria para obras externas e hidráulicas, dentre outros. É uma espécie potencial para reflorestamentos (LORENZI, 2002). Apesar de seu crescimento lento, pode ser utilizada na arborização urbana (ALMEIDA et al., 1998). Devido à exploração de sua madeira e à falta de replantios, a espécie está presente na “lista oficial de flora ameaçada de extinção” estabelecida pela Instrução Normativa N° 6, de 23 de setembro de 2008 (MMA, 2011).

As sementes de *Melanoxylon brauna* constituem a via mais utilizada na propagação desta espécie. No entanto, as condições ótimas de germinação são pouco elucidadas. O efeito da cor do tegumento, do tamanho da semente e do de substratos de germinação ainda não foram pesquisadas para a espécie. Além disso, nas Regras para Análise de Sementes não há recomendações sobre os métodos para condução de testes de germinação desta espécie (BRASIL, 2009). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da cor, tamanho e substrato sobre a germinação e vigor de sementes de *Melanoxylon brauna*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal e beneficiamento**

As sementes de *Melanoxylon brauna* foram colhidas em 10 árvores-matrizes na cidade de Leopoldina - MG. Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa - UFV. Após a colheita, os frutos foram secos ao sol até sua abertura e as sementes, contendo aproximadamente 13% de teor de água, foram armazenadas em tamboretas de fibra, a 5°C e 60% de umidade relativa do ar. Durante o beneficiamento foram eliminadas as sementes imaturas, deterioradas ou danificadas.

### **Determinação do peso de 1000 sementes**

A peso de 1000 sementes foi calculado para o lote de acordo com o procedimento descrito nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

### **Avaliação do processo germinativo**

Durante o teste de germinação das sementes no substrato rolo de papel germitest selecionou-se uma semente para avaliação do processo germinativo. Essa avaliação ocorreu de forma visual, observando-se as alterações morfológicas que ocorriam ao longo de oito dias.

### **Ensaio I**

Para avaliar o efeito da cor e do tamanho, as sementes foram classificadas visualmente em claras e escuras, e em relação ao tamanho em pequenas e grandes (Figura 1). Em seguida, seu comprimento e sua largura foram medidos para a definição das classes.



Figura 1 – Sementes de *Melanoxylon brauna* classificadas em relação à cor e ao tamanho. A) PC – pequenas e claras; B) GC – grandes e claras; C) PE – pequenas e escuras; e D) GE – grandes e escuras. Barra=5 mm.

### **Ensaio II**

Foram testados os substratos sobre areia (SA), entre areia (EA), sobre papel germitest (SP), entre papel germitest (EP) e rolo de papel germitest (RP). As sementes foram colocadas para germinar conforme descrito anteriormente, nos diferentes substratos.

### **Condições de germinação e delineamento experimental**

No teste de germinação, as sementes foram imersas em solução de fungicida CAPTAN 0,5% por dois minutos e colocadas em placas de petri de 9 cm de diâmetro sobre

duas folhas de papel germistet umedecidos com água destilada (Experimento I) ou diferentes substratos (Experimento II), e colocadas por período de 10 dias em câmara tipo BOD, com temperatura constante de 25°C, sob luz constante, proporcionada por quatro lâmpadas de 20 W, tipo luz do dia. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 (duas cores e dois tamanhos) (Experimento I) e inteiramente casualizado (Experimento II), com cinco repetições de 20 sementes para ambos.

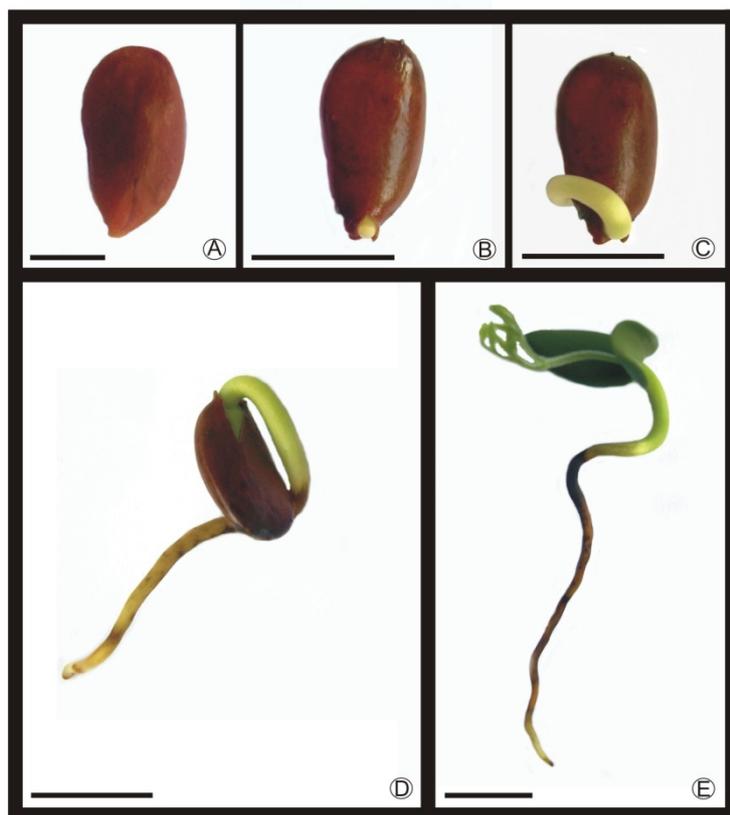
Nos dois experimentos foram consideradas germinadas as sementes que emitiram radícula (2 mm). O reumedecimento foi feito sempre que necessário, com água destilada.

O número de sementes germinadas foi avaliado diariamente, sendo calculados a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação – IVG (MAGUIRE, 1962). A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa SAS.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

As sementes com teor de água de 13% apresentaram peso de 133,43 gramas para 1000 sementes, sendo o coeficiente de variação de 1,5%. Um quilograma de sementes de *Melanoxylon brauna* possui 7.494 sementes. Já Lorenzi (2002) encontrou aproximadamente 30.000 sementes por quilograma. Para Cetnarski Filho e Nogueira (2005), essa variação pode ocorrer devido a diversos fatores como o local de coleta, a idade das matrizes e o teor de água das sementes, dentre outros.

As etapas do processo de germinação das sementes de *Melanoxylon brauna* em função do tempo podem ser observadas na Figura 2. A primeira alteração observada foi o aumento significativo do tamanho das sementes. Com 72 horas, ocorre a protrusão radicular. No decorrer do crescimento e desenvolvimento da plântula observa-se a diferenciação entre a radícula e o hipocótilo, com a concomitante liberação dos cotilédones, por volta do 6° dia. Em seguida, a partir do 8° dia começam a surgir os primeiros folíolos. A germinação das sementes de *Melanoxylon brauna* é epígea.



**Figura 2** – Aspectos da germinação da semente de *Melanoxylon brauna* e da formação da plântula, sob temperatura de 25°C em câmara tipo BOD. Onde: A) zero hora de embebição; B) 72 horas de embebição (protrusão radicular); C) 96 horas de embebição; D) 120 horas de embebição; E) plântula com 192 horas de embebição. Figura 2A, Barra = 5 mm, e Figuras 2B, 2C, 2D e 2E, Barra = 10 mm.

As dimensões médias observadas para as sementes com base em sua largura x comprimento para sementes pequenas foram de 5,05 ( $\pm 0,41$ ) x 11,59 ( $\pm 0,99$ ) mm e grandes de 6,00 ( $\pm 0,64$ ) x 13,33 ( $\pm 0,81$ ) mm.

As características cor e tamanho apresentaram interação significativa para o percentual de germinação e IVG (Tabela 1). Sementes pequenas e claras apresentaram 69% de germinação e IVG de 2,44, valores inferiores aos demais tratamentos. As sementes grandes não diferiram quanto à coloração para germinação e IVG, enquanto as pequenas escuras foram estatisticamente superiores às claras, para ambas as características. Mesmo considerando que as sementes pequenas e claras diminuem a qualidade fisiológica do lote, possuem um percentual de germinação relevante de 69%.

**Tabela 1** – Germinação (%) e índice de velocidade germinação (IVG) de sementes de *Melanoxylon brauna* para diferentes cores e tamanhos.

Cor	Tamanho			
	G (%)		IVG	
	pequena	grande	pequena	grande
Clara	69Bb	96Aa	2,44Bb	3,34Aa
Escura	93Aa	91Aa	3,46Aa	3,33Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas (cor) e minúscula nas linhas (tamanho) não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Lucena et al. (2008) classificaram as sementes de *Ricinus communis* nas cores preta, bronzeada, avermelhada e amarelada e concluíram que, quanto mais clara, menor é o percentual de emergência e o vigor. Os autores afirmam que a cor do tegumento está associada ao grau de maturação, sendo que sementes mais claras são mais imaturas.

O tamanho das sementes também foi estudado para as espécies *Simmondsia chinensis* (FIGUEIREDO, 1989), *Mimosa caesalpiniiifolia* (ALVES et al., 2005), *Syzygium malaccense* (COSTA et al., 2006), *Schizolobium amazonicum* (GHISOLFI et al., 2006), *Hyptis suaveolens* (MANDAL et al., 2008) e *Caesalpinia leiostachya* (BIRUEL et al., 2010), onde sementes grandes apresentaram maior percentual de germinação e vigor. No entanto, Pivetta et al. (2008) não verificaram diferenças na germinação de *Archontophoenix cunninghamii* com relação ao tamanho das sementes. Além disso, verificou-se também que o efeito do tamanho sobre a qualidade fisiológica das sementes é intrínseco a cada espécie. A relação entre o tamanho e a composição química de sementes de *Senna mancranthera* foi investigada, mas não se verificou diferenciação entre as reservas de carboidratos, lipídios e proteínas para as diferentes classes de tamanho, embora houvesse variações na porcentagem de germinação (RESENDE et al., 2010). Por outro lado, durante a germinação de sementes de *Gossypium hirsutum* verificou-se aumento linear com o tamanho, havendo alta correlação linear do parâmetro com o teor de lipídios (PAHLAVANI et al., 2008). Entretanto, a correlação de germinação com o teor de proteínas foi baixa ( $r = 0,43$ ).

O efeito do substrato sobre a porcentagem de germinação não foi verificado, demonstrando que todos os substratos testados podem ser recomendados para realização de teste de germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* (Tabela 2). Comportamento semelhante foi obtido em estudo com diferentes substratos (vermiculita, entre areia, sobre papel, sobre areia e rolo de papel) para sementes de *Solanum sessiflorum* (LOPES e PEREIRA, 2005). Entretanto, foram observadas diferenças significativas entre os substratos

testados para *Torresia acreana* (ALBRECHT et al., 1986), *Cedrela odorata* (ANDRADE e PEREIRA, 1994), *Sebastiania commersoniana* (SANTOS e AGUIAR, 2000), *Mimosa caesalpiniaefolia* (ALVES et al., 2002), *Cnidoscylus phyllacanthus* (SILVA e AGUIAR, 2004), *Eucalyptus dunnii* (CETNARSKI FILHO e CARVALHO, 2009) e *Eugenia uniflora* (SENA et al., 2010).

As sementes semeadas em rolo de papel e entre areia proporcionaram maiores valores de IVG, mas não houve diferença entre os mesmos. Por outro lado, os tratamentos sobre papel e sobre areia não diferiram entre si e tiveram os valores significativamente menores em relação aos demais. Isto sugere que a área de contato do substrato umedecido com a semente é muito importante, podendo não ser crítica para a germinação total, mas afeta a velocidade de germinação. Os resultados observados estão de acordo com Carneiro e Guedes (1992), que verificaram que quanto maior é o contato das sementes com o substrato, maior a percentagem de germinação e menor o tempo necessário para alcançá-la. Dessa forma, devido à praticidade de utilizar o rolo de papel germitest como substrato em laboratório, à baixa contaminação por microorganismos e à facilidade de avaliação das sementes, este é indicado para a condução do teste de germinação em sementes de *Melanoxylon brauna*.

**Tabela 2** – Germinação (%) e índice de velocidade de germinação (IVG) para sementes de *Melanoxylon brauna* em diferentes substratos de germinação.

Substratos	Variáveis	
	Germinação (%)	IVG
Sobre areia (SA)	79a	2,55c
Entre areia (EA)	89a	3,79ab
Sobre papel (SP)	88a	2,62c
Entre papel (EP)	92a	3,43b
Rolo (R)	94a	4,52a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

## CONCLUSÕES

Um quilograma de sementes de *Melanoxylon brauna* possui 7.494 sementes.

A protrusão da radícula ocorre em torno de 72 horas após início da embebição e a germinação é epígea.

Sementes pequenas e claras possuem germinação e IVG inferiores às sementes pequenas e escuras, e às grandes, independentemente da cor.

O substrato mais indicado para a realização de testes de germinação em laboratório foi o rolo de papel germitest.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, J. M. F.; ALBUQUERQUE, M. C. de L. F.; SILVA, V. S. de M. e Influência da temperatura e do tipo de substrato na germinação de sementes de cerejeira. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 8, n. 1, p. 49-55, 1986.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1998. 464p.

ALVES, E. U.; PAULA, R. C. de; OLIVEIRA, A. P.; BRUNO, R. L. A.; DINIZ, A. A. Germinação de sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth em diferentes substratos e temperatura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 169-178, 2002.

ALVES, E. U.; BRUNO, R. de L. A.; OLIVEIRA, A. P. de; ALVES, A. U.; ALVES, A. U.; PAULA, R. C. de Influência do tamanho e da procedência de sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. sobre a germinação e vigor. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 877-885, 2005.

ANDRADE, A. C. S. de; PEREIRA, T. S. Efeito do substrato e da temperatura na germinação e no vigor de sementes de cedro – *Cedrela odorata* L. (Meliaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, p.34-40, 1994.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Editora UFV, Viçosa – MG, 443 p., 1999.

BIRUEL, R. P.; PAULA, R. C. de; AGUIAR, I. B. de germinação de sementes de *Caesalpinia leiostachya* (Benth) Ducke (pau-ferro) classificadas pelo tamanho e pela forma. **Revista Árvore**, v. 34, n. 2, p. 197-204, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009. 399p.

CARNEIRO, J. W. P.; GUEDES, T. A. Influência do contato das sementes de stevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii) no substrato avaliada pela função de Weibull. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 1, p. 65-68, 1992.

CETNARSKI FILHO, R.; CARVALHO, R. I. N. de Massa da amostra, substrato e temperatura para teste de germinação de sementes de *Eucalyptus dunni* Maiden. **Ciência Florestal**, v. 19, n. 3, p. 257-265, 2009.

CETNARSKI FILHO, R.; NOGUEIRA, A. C. Influência da temperatura na germinação de diásporos de *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer (canela-sassafrás). **Ciência Florestal**, v. 14, n. 2, p. 191-198, 2005.

COSTA, E. S.; OLIVEIRA, I. V. de M.; MÔRO, F. V.; MARTINS, A. B. G. Aspectos morfológicos e influência do tamanho da semente na germinação do jambo-vermelho. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 117-120, 2006.

FIGLIOLIA, M. B.; OLIVEIRA, E. C.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Análise de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (coords.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 137-174.

FIGUEIREDO, S. F. L. Germinação de sementes de jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 1, n. 1, p. 99-107, 1989.

GHISOLFI, E. M.; EFFGEN, E. M.; MENDONÇA, A. R. da; NAPPO, M. E.; SILVA, A. G. da. Influência do tamanho da semente e tipo de recipiente na germinação de *Schizolobium amazonicum* (Herb) Ducke. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, ano. V, n. 9, 2006.

LOPES, J. C.; PEREIRA, M. D. Germinação de sementes de cubiu em diferentes substratos e temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 146-150, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Ed. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2002. 368 p.

LUCENA, A. M. A. de; SEVERINO, L. S.; BELTRÃO, N. E. de M.; SOFIATTI, V.; MEDEIROS, K. A. A. L.; OLIVEIRA, M. I. P. de; BORTOLUZI, C. R. D. Influência do estágio de maturação da semente e da profundidade de semeio I: emergência das plântulas e área dos cotilédones. In: III Congresso Brasileiro de Mamona, Energia e Ricinoquímica. **Anais**, 2008. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/cbm3/trabalhos/SEMENTES/S%2008.pdf>> Acessado em: 02 de janeiro de 2011.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination and in selection and evaluation from seeding emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MANDAL, S. M.; CHAKRABORTY, D.; GUPTA, K. Seed size: influence on germination and subsequent seedling performance in *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae). **Research Journal of Seed Science**, v. 1, n. 1, p. 26-33, 2008.

MEDEIROS, A. C. S.; BOSCARDIN, D. M.; ABREU, D. C. A. de Efeito da quantidade de água do substrato na germinação de sementes de *Escallonia montevidensis* (Cham. & Schl.) DC. (*Saxifragaceae*) em laboratório. **Comunidade Técnico 68**, EMBRAPA Colombo – PR, 2001. 4p.

MMA – Lista oficial de Flora ameaçada de extinção – acesso em 20/01/2011. Site: <[http://www.tecniflora.com.br/flora\\_brasileira\\_ameacada.pdf](http://www.tecniflora.com.br/flora_brasileira_ameacada.pdf)> ou <<http://www.mma.gov.br>>

OLIVEIRA, E. C.; PIÑA-RODRIGUES, F. C.; FIGLIOLIA, M. B. Propostas para a padronização de metodologias em análise de sementes florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 11, n. 1-3, p. 1-42, 1996.

PAHLAVANI, M.H.; MIRI, A.A.; KAZEMI, G. Response of Oil and Protein Content to Seed Size in Cotton. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.10, p. 643–7, 2008.

PIVETTA, K. F. L.; SARZI, I.; ESTELLITA, M.; BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z. Tamanho do diásporo, substrato e temperatura na germinação de sementes de

*Archontophoenix cunninghamii* (Arecaceae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n.1, p. 126-134, 2008.

SANTOS, S. R. G. dos; AGUIAR, I. B. de Germinação de sementes de branquilo (*Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs) em função do substrato e do regime de temperatura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 1, p. 120-126, 2000.

SENA, L. H. de M.; MATOS, V. P.; SALES, A. G. de F. A.; FERREIRA, E. G. B. de S.; PACHECO, M. V. Qualidade fisiológica de sementes de pitangueira submetidas a diferentes procedimentos de secagem e substratos – Parte 2. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 4, p. 412-417, 2010.

RESENDE, R. T.; ATAIDE, G. M.; BORGES, E. E. de L. Interação do tamanho com a composição química em fedegoso (*Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn.). In: Anais do Simpósio de Integração Acadêmica – SIA (CD-ROM), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, 2010.

SILVA, L. M. de M.; AGUIAR, I. B. Efeito dos substratos e temperaturas na germinação de sementes de *Cnidoscopus phyllacanthus* Pax & K. Hoffm. (faveleira). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 9-14, 2004.

VANZOLINI, S.; NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. **Informativo ABRATES**, v. 17, n. 1-3, p. 76-83, 2007.

VARELA, V. P.; RAMOS, M. B. P.; MELO, M. F. F. Umedecimento do substrato e temperatura na germinação de sementes de angelim-pedra (*Dinizia excelsa* Ducke). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 13-135, 2005.

WINN, A. A. Proximate and ultimate sources of within individual variation in seed mass in *Prunella vulgaris* (Lamiaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 78, p. 838-844, 1991.

## 4. CAPÍTULO II

### **AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Melanoxylon brauna* SCHOTT SOB DIFERENTES TEMPERATURAS**

#### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da temperatura sobre a fisiologia de sementes de *Melanoxylon brauna* e identificar as temperaturas cardinais de germinação, bem como avaliar a eficiência do teste de condutividade elétrica para determinação das temperaturas cardinais. Para tanto foram realizados três ensaios. No primeiro, foi realizada a determinação das curvas de embebição, em cada temperatura (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C), as sementes foram pesadas a cada duas horas por um período de 12 horas e após a cada 12 horas até a protrusão radicular de 50% das sementes, ou até 120 horas quando na ausência de germinação. No segundo ensaio, para identificar as temperaturas cardinais, as sementes foram mantidas sob cada temperatura, pelo período de 10 dias em câmara tipo BOD, sob luz constante. No terceiro ensaio, foi realizado um teste de condutividade elétrica com as sementes incubadas por períodos de 24, 48 e 72 horas de embebição em cada uma das temperaturas, e, em seguida, foram colocadas em erlenmeyers com 75 mL de água deionizada a 25°C, por 24 horas para posterior leitura da condutividade elétrica. A temperatura atuou de forma significativa na germinação e na sincronização de sementes de *Melanoxylon brauna*. É mais criterioso recomendar faixas de temperaturas para germinação do que temperaturas pontuais. As temperaturas cardinais (teóricas) para a característica porcentagem de germinação são: 12,3°C – mínima, 30°C – ótima (teórica) e 42,7°C – máxima. As faixas de temperatura considerando-se todas as variáveis investigadas foram: 12,1-12,6°C (mínima); 30-35,8°C (ótima); e 42,4-43°C (máxima). A espécie apresenta uma grande amplitude de germinação com relação à temperatura, sendo verificada germinação na faixa de temperatura de 12 a 42°C. O teste de CE foi eficiente para avaliar o efeito da

temperatura sobre a qualidade fisiológica e segundo este teste a temperatura ótima foi de 27°C.

**Palavras-chave:** embebição, condutividade elétrica, sementes florestais, qualidade fisiológica.

## **PHYSIOLOGIC EVALUATION OF GERMINATION OF *Melanoxylon brauna* SCHOTT SEEDS UNDER DIFFERENT TEMPERATURES**

### **ABSTRACT**

The objective of this study was to investigate the effect of temperature on the physiology of *Melanoxylon brauna* seeds and identify cardinal temperatures for germination, as well as evaluate the efficiency of the electrical conductivity test to determine the cardinal temperatures. Therefore, were conducted three tests. In the first, was performed the determination of imbibition curves at each temperature (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45°C), the seeds were weighed every two hours for a period of 12 hours and after every 12 hours until the root protrusion of 50% of the seeds, or 120 hours when no germination. In the second assay, to identify the cardinal temperatures, seeds were kept under each temperature for a period of 10 days in BOD under constant light. In the third assay, was performed a test of electrical conductivity with the seeds incubated for 24, 48 and 72 hours of immersion in each of the temperatures, and then were placed in flasks with 75 mL of deionized water at 25°C for 24 hours for subsequent reading of the electrical conductivity. The temperature appeared significantly in germination and synchronization of *Melanoxylon brauna* seeds. It is more judicious to recommend temperature ranges for germination than punctual temperatures. The cardinal temperatures (theoretical) for the characteristic germination rates are: 12.3°C – minimum - 30°C - optimal (theoretical) and 42.7°C - maximum. The temperature ranges considering all the variables investigated were: 12.1 to 12.6°C (minimum); 30 to 35.8°C (optimum) and 42.4 to 43°C (maximum). The specie has a wide range of germination with respect to temperature, germination was observed in the temperature range from 12 to 42°C. The EC test was efficient to evaluate the effect of temperature on the physiology quality and according to this test the optimal temperature was 27°C.

**Keywords:** imbibition, electrical conductivity, forest seeds, physiology quality.

## INTRODUÇÃO

A germinação é um processo complexo, que envolve uma sequência de eventos fisiológicos, controlados por diversos fatores, os quais são individualmente afetados pela temperatura. Esta atua no processo germinativo, determinando a velocidade e a porcentagem de germinação das sementes. A ação da temperatura sobre a germinação ocorre pelas modificações na estrutura e conformação das moléculas, em especial proteínas e lipídeos, envolvidas em reações químicas durante a germinação, podendo afetar a absorção de água e as reações bioquímicas que regulam o metabolismo envolvido nesse processo, além de alterações na estrutura de membranas (BEWLEY e BLACK, 1994).

A temperatura ótima de germinação propicia a máxima porcentagem de germinação no menor tempo, enquanto sob temperaturas mínima e máxima a minoria das sementes germinam (BEWLEY e BLACK, 1994).

A faixa de temperatura na qual as sementes podem germinar é característica de cada espécie, podendo variar de 15 a 40°C para várias espécies. Para *Cedrela odorata*, a faixa de temperatura adequada para germinação encontra-se entre 25 e 30°C (ANDRADE e PEREIRA, 1994), enquanto para *Myracrodruon urundeuva* a faixa ótima é de 20 a 30°C (SILVA et al., 2002) e para *Marcetia taxifolia* de 15 a 20°C (SILVEIRA et al., 2004). Cabral et al. (2003) verificaram que *Tabebuia aurea* apresenta germinação dentro de ampla faixa de temperatura, sendo as temperaturas cardinais para o processo germinativo são: 20°C (mínima), 35°C (ótima) e 40°C (máxima). Algumas espécies necessitam ainda, de temperaturas alternadas para sua germinação (CETNARSKI FILHO e NOGUEIRA, 2005). Porém, para a maioria das sementes florestais, a temperatura ótima é constante, e situa-se entre 15 e 30°C. Isto significa que o caráter adaptativo pode propiciar alta capacidade de estabelecimento das espécies no campo, aumentando assim a chance de sobrevivência, em comparação com as espécies que apresentam estreita faixa de temperatura para germinar (TOWNSEND e MACGINNIES, 1972; LABOURIAU, 1983).

*Melanoxylon brauna* Schott é uma espécie florestal pertencente à família Fabaceae. Na nomenclatura popular é conhecida como braúna, braúna-preta, graúna, maria-preta, rabo-de-macaco (LORENZI, 2002), ocorrendo naturalmente no Sul da Bahia, São Paulo, Minas

Gerais, Espírito Santo, Pará, Rio de Janeiro e Sergipe. Classificada como semidecídua, heliófila, com ocorrência também na floresta pluvial da encosta atlântica (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 2002). Plantas adultas dessa espécie normalmente possuem entre 15 a 25 m de altura e 40 a 80 cm de diâmetro. As flores são amareladas, em panículas terminais amplas. O fruto é um legume deiscente, contendo várias sementes duras envoltas por estrutura membranácea (asa) que possibilita sua dispersão pelo vento (BARROSO et al., 1999; LORENZI, 2002). O florescimento ocorre de fevereiro a abril e os frutos amadurecem no período de setembro a outubro. Sua madeira é muito pesada, apresentando densidade de  $1,05 \text{ g cm}^{-3}$ , compacta, muito dura ao corte e de grande durabilidade mesmo quando em ambientes adversos, sendo própria para obra externas e hidráulicas, dentre outros. É uma espécie potencial para reflorestamento (LORENZI, 2002), e apesar de seu crescimento lento pode ser utilizada na arborização urbana (ALMEIDA et al., 1998).

As sementes constituem a via mais utilizada para propagação desta espécie (ALMEIDA et al., 1998). No entanto, a amplitude de temperatura em que ocorre a germinação e as consequências sobre a fisiologia das sementes não são conhecidas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar as implicações da temperatura sobre a fisiologia de sementes de *Melanoxylon brauna*, e identificar as temperaturas cardinais de germinação para a espécie, além de verificar a eficiência do teste de condutividade elétrica para determinação das temperaturas cardinais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal e beneficiamento**

As sementes de *Melanoxylon brauna* foram colhidas em 10 árvores-matrizes na cidade de Leopoldina - MG, em setembro de 2010. Após a colheita, os frutos foram secos ao sol até sua abertura e as sementes, contendo aproximadamente 13% de teor de água, foram armazenadas em tambores de fibra, a  $5^{\circ}\text{C}$  e 60% de umidade relativa do ar. Durante o beneficiamento foram eliminadas as sementes imaturas, deterioradas ou danificadas.

### **Determinação da curva de embebição**

A determinação da curva de embebição foi feita em rolos de papel germitest para cada uma das temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e  $45^{\circ}\text{C}$ , pelo período de 240 horas ou 10 dias, em câmara tipo BOD, sob luz constante, proporcionada por quatro lâmpadas de 20 W, tipo luz do dia. Antes de iniciar a embebição, as sementes foram pesadas em balança analítica

digital com precisão de 0,0001 g. Posteriormente, as sementes foram pesadas a cada duas horas por um período de 12 horas e, após, a cada 12 horas até a protrusão radicular (2 mm) de 50% das sementes, ou, quando na ausência da protrusão, até 120 horas ou 5 dias. O ganho de peso (GP) das sementes foi calculado de acordo com a fórmula:  $GP = \left( \frac{Pf - Pi}{Pi} \right) \times 100$ , onde: Pf = peso final (ganho de umidade a cada período de embebição); Pi = peso inicial das sementes antes da embebição. Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes para cada temperatura. Os gráficos foram elaborados no programa Sigma Plot 11.0.

### **Determinação das temperaturas cardinais**

Para determinação das temperaturas cardinais de germinação as sementes foram semeadas em rolos de papel germitest umedecidos com água destilada e embalados em sacos plásticos fechados com ligas de borracha para evitar a dessecação, sendo submetidos às temperaturas constantes citadas anteriormente, sob as mesmas condições para o teste de germinação (10 dias em câmara tipo BOD, sob luz constante, proporcionada por quatro lâmpadas de 20 W, tipo luz do dia). Foram consideradas germinadas as sementes que emitiram radícula (2 mm). O número de sementes germinadas foi avaliado diariamente. O reumedecimento do substrato foi feito sempre que necessário. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e em cada temperatura foram realizadas cinco repetições de 20 sementes.

A partir do número de sementes germinadas foi calculada a porcentagem de germinação – G%, índice de velocidade de germinação – IVG (MAGUIRE, 1962), a velocidade média de germinação –  $V_m$  (LABOURIAU e VALADARES, 1976; LABOURIAU, 1983) e a frequência relativa – FR (LABOURIAU e VALADARES, 1976; SANTANA e RANAL, 2004b). Os dados, com exceção da frequência relativa, foram submetidos à análise de variância e à análise de regressão não-linear a 5% de significância, utilizando-se a função Weibull de dois parâmetros para a característica G% e IVG, sendo estas ajustadas pelo método da máxima verossimilhança, empregando-se o algoritmo desenvolvido por Gove e Fairweather (1989) e a função Polinomial para a característica  $V_m$  que foi ajustada no software Curve Expert versão 1.3.

### **Teste de condutividade elétrica**

Para o teste de condutividade elétrica (CE), as sementes, sem danos aparentes, foram pesadas em balança eletrônica de precisão 0,0001 g, colocadas em rolos de papel e mantidas

por 24, 48 e 72 horas de embebição em cada uma das temperaturas citadas anteriormente. Em seguida, foram colocadas em erlenmeyers com 75 mL de água deionizada a 25°C, por 24 horas. A CE do lixiviado foi determinada utilizando-se condutivímetro MICRONAL, modelo B 330, eletrodo com constante 1,0, conforme procedimento descrito por Woodstock (1973) e o resultado expresso em  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ . Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes para cada temperatura em cada tempo de embebição. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 9 (três tempos de embebição e nove temperaturas) e os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão, utilizando-se o programa SAS.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

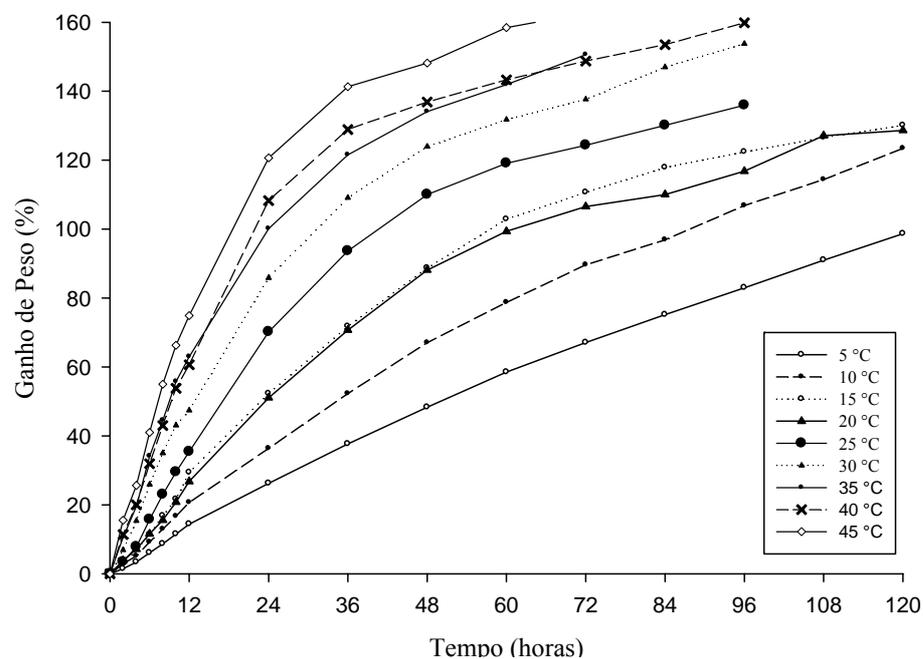
Conforme apresentado nas curvas de embebição a temperatura atuou diretamente sobre a velocidade de embebição e na quantidade final de água absorvida pelas sementes (Figura 1). A embebição acelerou com o aumento da temperatura, obtendo-se maior quantidade final de água.

Parte do aumento da quantidade de água embebida se deve ao menor valor do potencial hídrico das sementes, o que determina o sentido do fluxo de água do ambiente para as sementes, independentemente da temperatura, que, é próprio da fase I da embebição (BEWLEY e BLACK, 1994). A temperatura, por sua vez, exerce seu efeito por razões metabólicas e fluidez da água. Neste caso, o aumento da temperatura torna a água mais fluida, permitindo que se movimente com mais facilidade do meio para as sementes. Como as enzimas têm parte de suas atividades influenciadas pela temperatura, é esperado que seu aumento reflita na maior atividade das enzimas que atuam no enfraquecimento das paredes celulares, permitindo que a turgescência celular dos tecidos amplie o tamanho dos tecidos com a entrada de água (WELBAUM e BRADFORD, 1990; CHEN e BRADFORD, 2000; NONOGAKI et al., 2007). As enzimas relacionadas com a degradação de reservas, quando pré-formadas, são ativadas pela hidratação e pelo aumento da temperatura, promovendo a hidrólise das reservas que são direcionadas, em parte, para estruturas físicas, respiração e para redução do potencial hídrico, mantendo assim o fluxo de água para as células, e permitindo a sua expansão.

Na temperatura de 45°C, onde se observou início de deterioração das sementes, ocorre ganho de peso de aproximadamente 120% nas primeiras 24 horas, enquanto a 5°C o ganho é de aproximadamente 20% do peso inicial. Nesta, e na temperatura de 10°C, a curva

se mostra ascendente, enquanto nas demais há tendência de início da fase II da germinação. Nas duas temperaturas mais baixas, a maior permeabilidade das membranas, por possíveis danos por frio, permite a saída de solutos para o apoplasto tornando o potencial hídrico celular menos negativo, com conseqüente queda na taxa de embebição. Neste caso, é de se supor que parte dos solutos osmoticamente ativos seja perdida para o meio, uma vez que a parede celular não tem capacidade de regular a movimentação de solutos. É possível classificar a embebição das sementes em três grupos, sendo o primeiro constituído pelo intervalo de 5 a 15°C, o segundo de 20 a 35°C e o terceiro pelas temperaturas de 40 e 45°C.

No primeiro grupo a porcentagem de germinação está em fase crescente, não sendo verificada germinação nas temperaturas de 5 e 10°C, a mesma se inicia em 15°C (Figura 2). A faixa de temperatura de 20 a 35°C foi adequada para germinação das sementes, com porcentagens acima de 65%. No terceiro grupo, embora haja o máximo de embebição, a germinação é decrescente, pelos potenciais efeitos deletérios da temperatura sobre o metabolismo das células. Mesmo que na fase I da embebição não haja efeito da temperatura, a manutenção das sementes em alta temperatura por curto período de tempo estimula a embebição, por efeito metabólico.



**Figura 1** - Curvas de embebição de sementes de *Melanoxylon brauna* sob diferentes temperaturas.

O efeito da temperatura na germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* apresentou comportamento não-linear descrito pela função Weibull, onde se verifica o

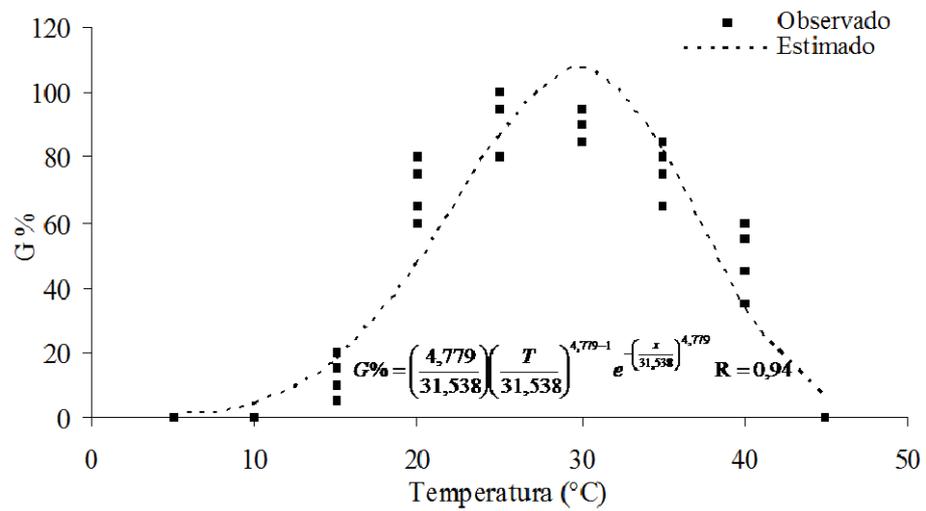
máximo percentual médio de germinação a 30°C (Figura 2). Na temperatura de 35°C verifica-se a ocorrência de 50% da geminação com apenas 72 horas de embebição. Para as temperaturas no intervalo de 20 a 40°C, a porcentagem de 50% ocorre com 96 horas. Nas temperaturas de 5, 10, e 45°C não foram observadas protrusão de radícula. Na temperatura de 15°C as sementes não atingem 50% de germinação durante o período de observação. Sob temperaturas baixas ou muito altas o metabolismo não é ativado de forma correta, e as reservas desdobradas na fase I e necessárias para o crescimento e desenvolvimento do embrião na fase III não são levadas até as regiões meristemáticas (BEWLEY e BLACK, 1994). Sendo assim, não se verifica a finalização da germinação e as sementes não passam da fase II.

Segundo a característica percentual de germinação a temperatura mínima foi de 12,3°C, ótima de 30°C e máxima de 42,7°C (Figura 2). Para a característica IVG as temperaturas cardinais foram de 12,1°C (mínima), 33,1°C (ótima) e 42,4°C (máxima) (Figura 3). Com relação à  $V_m$  as temperaturas encontradas foram semelhantes, sendo estas de 12,6°C (mínima), 35,8°C (ótima) e 43,0°C (máxima) (Figura 4). Verifica-se que as características investigadas classificam as temperaturas de modo semelhante. Sendo assim, pode-se inferir que é mais criterioso sugerir faixas de temperaturas do que temperaturas pontuais.

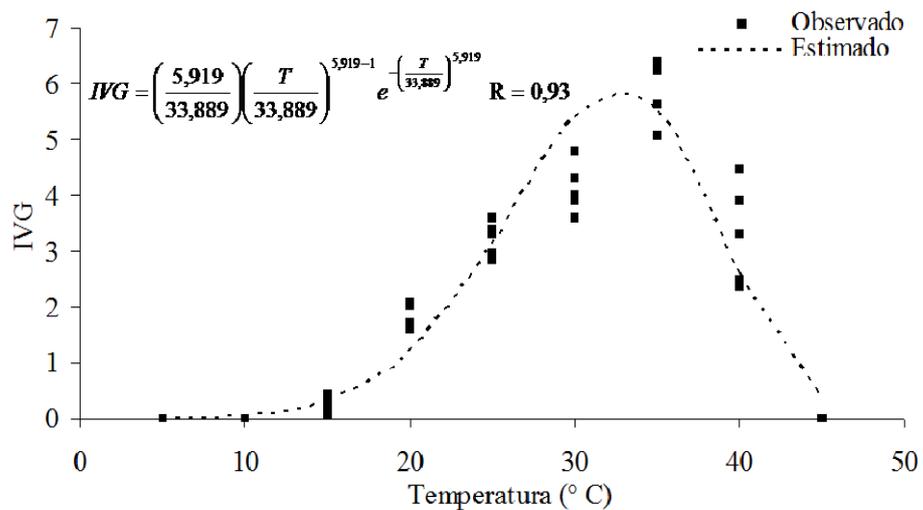
Redução da velocidade de germinação na temperatura de 25°C em relação a 35°C, também foi observada em sementes de *Torresia acreana*, contudo, o percentual total de germinação a 35°C foi menor que a 25°C (ALBRECHT et al., 1986). Godoi e Takaki (2005) também observaram este padrão em sementes de *Cecropia glaziovi*. Para Larcher (1986), a faixa ótima de temperatura para germinação de espécies de regiões tropicais está entre 20 e 35°C, e estas apresentam maior dificuldade de se adaptarem a temperaturas baixas do que às altas, diminuindo a área de ocorrência natural destas espécies.

Em *Miconia cinnamomifolia*, sob temperatura mais baixa, o metabolismo é reduzido e a semente pode germinar em período mais longo (AMARAL e PAULILO, 1992). No entanto, em temperaturas mais altas, a velocidade de absorção de água e das reações químicas é maior, e as sementes germinam mais rapidamente, até certo limite (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). A temperatura ótima para germinação total é diferente da temperatura ótima para velocidade de germinação das sementes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Assim, a temperatura ótima para germinação total de *Melanoxylon brauna* foi de 30,0°C, e a temperatura ótima para velocidade média de germinação foi de 35,8°C.

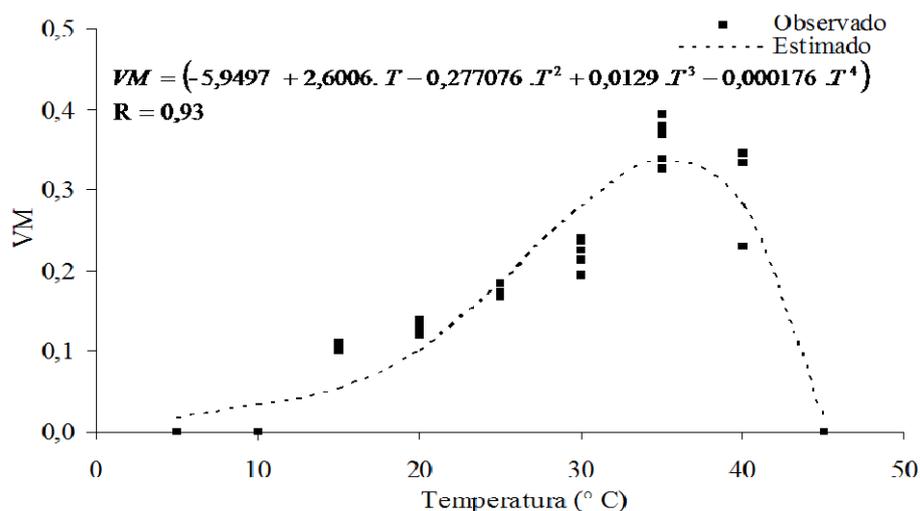
A temperatura mínima e máxima, independentemente da característica avaliada foi de aproximadamente 12°C e 42°C, respectivamente. Isto demonstra a grande amplitude de germinação desta espécie com relação à temperatura.



**Figura 2** – Efeito de diferentes temperaturas sobre o percentual de germinação de sementes de *Melanoxylon brauna*. Onde G: germinação (%), T: temperatura (°C).



**Figura 3** – Efeito de diferentes temperaturas sobre o índice de velocidade de germinação de sementes de *Melanoxylon brauna*. Onde IVG: índice de velocidade de germinação (%), T: temperatura (°C).

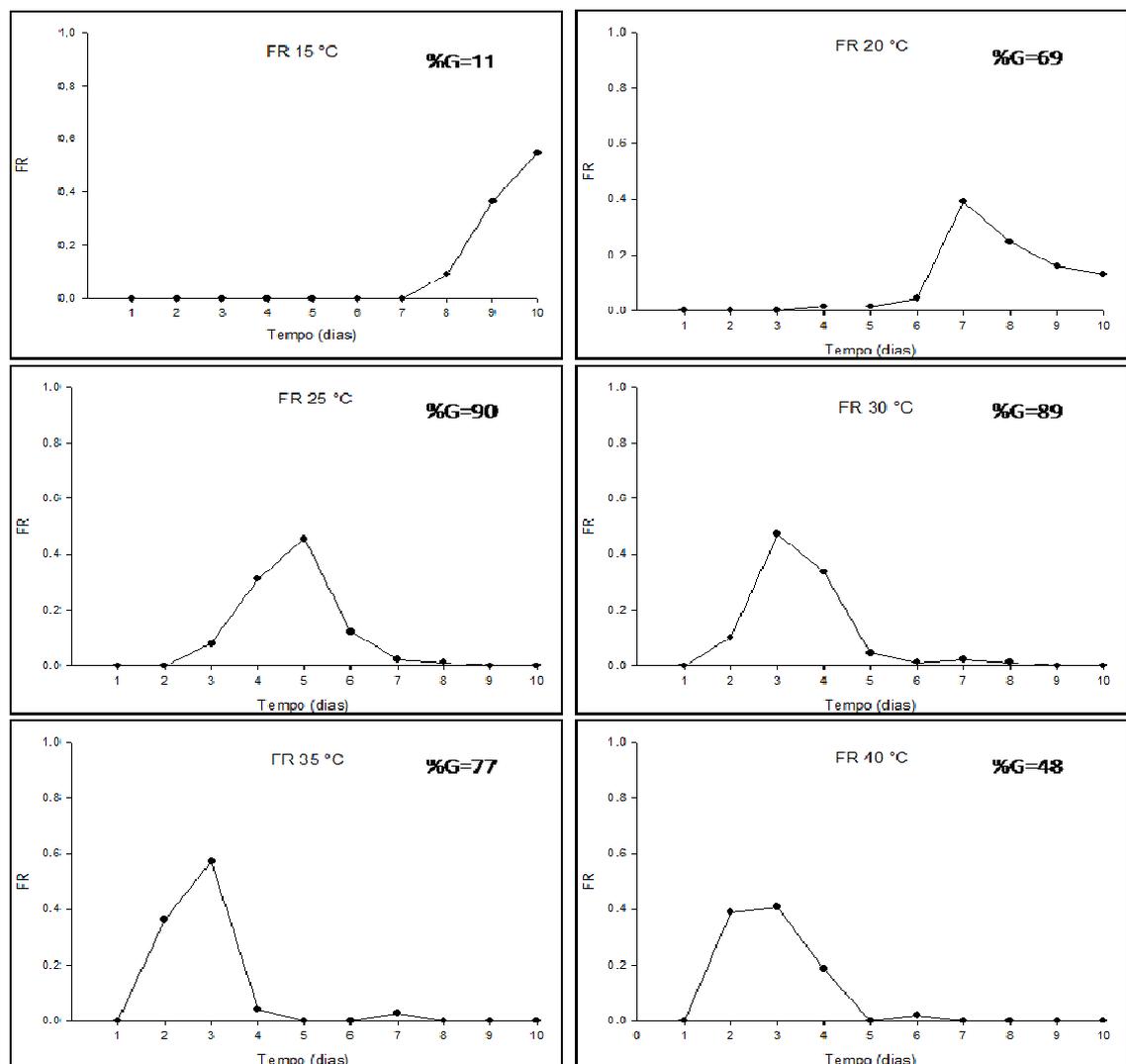


**Figura 4** – Efeito de diferentes temperaturas sobre a velocidade média de germinação de sementes de *Melanoxylon brauna*. Onde VM: velocidade média de germinação (%), T: temperatura (°C).

A sincronização da germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* pode ser verificada nos polígonos de frequência relativa (Figura 5). As temperaturas de 25, 30 e 35°C favorecem a sincronização da germinação e apresentam comportamento unimodal, ou seja, apenas um pico de germinação. Percebe-se o efeito da temperatura no deslocamento dos picos para a esquerda, com aumento da velocidade de germinação e, ao mesmo tempo, redução nas frequências relativas nas temperaturas de 35 e 40°C, quando em ambas ocorreu também significativa redução da germinação (Figura 2). A sincronização em determinada faixa ótima de germinação tem implícito o estabelecimento de maior número de plântulas, com aumento da possibilidade de sobrevivência de grande número de indivíduos, em caso de outros fatores adversos. A sincronização em faixa restrita de temperatura pode limitar o estabelecimento da espécie, pois a ocorrência de temperaturas fora desta faixa ocasiona redução na germinação, tanto no maior tempo para estabelecimento da plântula e, conseqüentemente, maior exposição às adversidades do meio que poderiam comprometer o sucesso no estabelecimento, quanto na redução da viabilidade de grande parte do banco de sementes, quando em temperaturas mais altas.

O padrão de distribuição das frequências tem significado adaptativo, indicando compensação das condições desfavoráveis de temperatura por uma maior distribuição da germinação no tempo (LABOURIAU, 1983). Comportamento contrário aos observados neste trabalho, para sementes de *Cecropia glaziovii*, ou seja, a germinação distribuída no tempo ou baixa sincronização, demonstrando a capacidade de adaptação desta espécie, classificada

como pioneira, às flutuações de temperatura (GODOI e TAKAKI, 2005). Este comportamento também foi observado na germinação de sementes de *Pterogyne nitens* (NASSIF e PEREZ, 2000), *Dalbergia nigra* (FERRAZ-GRANDE e TAKAKI, 2001), *Senna macranthera* (CASSARO-SILVA, 2001), *Myracrodruon urundeuva* (SILVA et al., 2002) e *Erythrina variegata* (MATHEUS e LOPES, 2009).



**Figura 5** – Distribuição de frequência relativa (FR) da germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* em função do período de incubação em diferentes temperaturas.

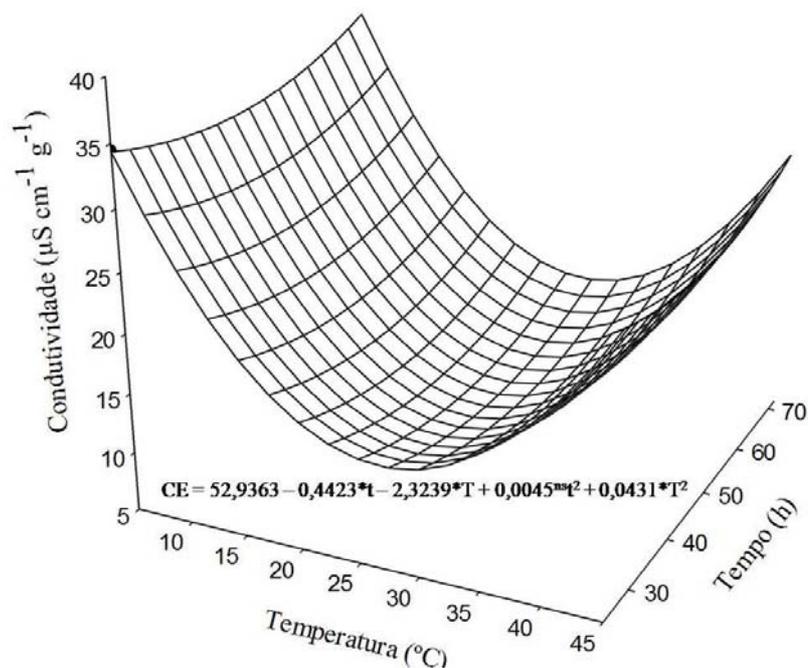
Houve interação significativa entre a temperatura e o tempo, para a condutividade (Figura 6). Para a temperatura o comportamento foi quadrático, sendo verificados maiores valores de CE para baixas e altas temperaturas. Nas temperaturas de 5 a 10°C podem ocorrer danos por frio, resultado de alterações na semi-permeabilidade das membranas. Wang et al. (2006) verificaram maior absorção de água e maior perda de  $K^+$  em sementes pequenas de *Krascheninnikovia lanata*, espécie arbustiva, quando a temperatura foi reduzida de 10 para

5°C. Nesse caso, a temperatura de mudança ( $T_m$ ) na insaturação de ácidos graxos faz com que haja vazamento até que a hidratação induza subida na  $T_m$  e resulte na reorganização da membrana, com conseqüente redução na liberação de solutos da célula (TASSEVA et al. (sem data); BADEA e BASU, 2009). Por outro lado, sob temperatura mais alta a semi-permeabilidade é perdida pela incapacidade de recuperação das funções das membranas devido à completa desorganização da bicamada lipo-proteica.

A temperatura de 27°C apresentou o menor valor de CE. Esta temperatura está próxima à temperatura ótima total de germinação de 30°C, indicando que provavelmente temperaturas próximas aquela estabelecida como ótima para a germinação deve promover a estabilidade térmica necessária para o funcionamento das membranas celulares. Diante disso, também pode ser sugerido que o teste de CE seja usado como bom indicador para investigar as implicações da temperatura sobre a fisiologia das sementes.

Para o fator tempo, o comportamento foi linear negativo, observando-se menores valores nos tempos mais longos de embebição. Isto se deve ao fato de que, nas primeiras horas de embebição, a absorção de água ocorre com maior velocidade, não permitindo que a reidratação das membranas celulares aconteça na mesma velocidade, resultando em maior perda de constituintes celulares para o meio. Uma vez reidratadas, as membranas estão reorganizadas e a perda de constituintes celulares é menor, independentemente da temperatura.

O teste de condutividade elétrica (CE) baseia-se no princípio de que com o processo de deterioração ocorre a lixiviação dos constituintes celulares das sementes embebidas em água, devido à perda da integridade das membranas celulares (DUTRA et al. 2007). Sendo assim, menores valores de CE indicam maior qualidade das sementes, como no caso, por exemplo, do efeito da temperatura sobre os sistemas de membranas.



**Figura 6** – Condutividade elétrica em sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas a diferentes temperaturas e tempos embebição. Onde CE: condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ ), t: tempo de embebição (horas) e T: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

## CONCLUSÕES

A temperatura atuou de forma significativa sobre a porcentagem final, velocidade e sincronização da germinação de sementes de *Melanoxylon brauna*.

É mais criterioso recomendar faixas de temperaturas para germinação do que temperaturas pontuais.

As temperaturas cardinais para germinação (%) são:  $12,3^{\circ}\text{C}$  – mínima,  $30,0^{\circ}\text{C}$  – ótima (teórica) e  $42,7^{\circ}\text{C}$  – máxima.

As faixas de temperatura considerando-se todas as variáveis investigadas foram:  $12,1$ - $12,6^{\circ}\text{C}$  (mínima);  $30$ - $35,8^{\circ}\text{C}$  (ótima); e  $42,4$ - $43^{\circ}\text{C}$  (máxima).

A espécie apresenta uma grande amplitude de germinação com relação à temperatura, sendo verificada germinação na faixa de temperatura de  $12$  a  $42^{\circ}\text{C}$ .

O teste de CE foi eficiente para avaliar o efeito da temperatura sobre a qualidade fisiológica das sementes e por este teste a temperatura ótima foi de  $27^{\circ}\text{C}$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, J. M. F.; ALBUQUERQUE, M. C. de L. F.; SILVA, V. S. de M. e Influência da temperatura e do tipo de substrato na germinação de sementes de cerejeira. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 8, n. 1, p. 49-55, 1986.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1998. 464p.

AMARAL, L. I. V.; PAULILO, M. T. F. Efeito da luz, temperatura, regulador de crescimento e nitrato de potássio na germinação de *Miconia cinnamomifolia* (DC.) Naudim. **Insula**, n. 21, p. 59-86, 1992.

ANDRADE, A. C. S. de; PEREIRA, T. S. Efeito do substrato e da temperatura na germinação e no vigor de sementes de cedro – *Cedrela odorata* L. (Meliaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, p.34-40, 1994.

BADEA, C.; BASU, S.K. The effect of low temperature on metabolism of membrane lipids in plants and associated gene expression. **Plant Omics Journal**, v.2, n.2, p.78-84, 2009.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Editora UFV, Viçosa – MG, 443 p., 1999.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. DE A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. F. ex. S. Moore. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, p. 609-617, 2003.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Germinação de sementes. In: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 Ed., Jaboticabal: FUNEP, 2000. P. 128-166.

CASSARO-SILVA, M. Efeito da temperatura na germinação de sementes de manduirana (*Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn. – Caesalpinaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 92-99, 2001.

CETNARSKI FILHO, R.; NOGUEIRA, A. C. Influência da temperatura na germinação de diásporos de *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer (canela-sassafrás). **Ciência Florestal**, v. 14, n. 2, p. 191-198, 2005.

CHEN, F.; BRADFORD, K.J. Expression of an expansin is associate with endosperm weakening during tomato seed germination. **Plant Physiology**, v.124, p.1265-1274, 2000.

DUTRA, A. S.; MEDEIROS FILHO, S.; DINIZ, F. O. Teste de condutividade elétrica em sementes de *Senna siamea* (Lam.) H. S. Irwin e Barneby. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 38, n. 3, p. 280-285, 2007.

- FERRAZ-GRANDE, F. G. A.; TAKAKI, M. Temperature dependent seed germination of *Dalbergia nigra* Allem (Leguminosae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 4, p. 401-404, 2001.
- GODOI, S.; TAKAKI, M. Efeito da temperatura e a participação do fitocromo no controle da germinação de sementes de embaúba. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 87-90, 2005.
- GOVE, J. H.; FAIRWEATHER, S. E. Maximum-likelihood estimation of Weibull function parameters using a general interactive optimizer and grouped data. **Forest Ecology and Management**, v.28, p.61-99, 1989.
- HYAMS, D. G. **Curve Expert 1.3**: a comprehensive curve fitting package for Windows. 2005. Disponível em: <http://curveexpert.webhop.biz/>
- LABOURIAU, L. G. **Germinação das sementes**. Washington: Secretaria-Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.
- LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.E.B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.48, n.2, p. 263-284, 1976.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1986. 319p
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Ed. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2002. 368 p.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination and in selection and evaluation from seeding emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.
- MATHEUS, M. T.; LOPES, J. C. Temperaturas cardinais para a germinação de sementes de *Erythrina variegata* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 3, p. 115-122, 2009.
- NASSIF, S. M. L.; PEREZ, S. C. J. G de A. Efeito da temperatura na germinação de sementes de amendoim-do-campo (*Pterogyne nitens* Tul.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 2000.
- NOGGLE, G.R.; FITES, R.C. The mechanisms of chilling damage in germinating seeds. In: NONOGAKI, H.; CHEN, F.; BRADFORD, K.J. Mechanism and genes involved in germination *sensu stricto*. In: Bradford, K.J.; Nonogaki, H. (Ed.). **Seed development, dormancy and germination**. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 264-304.
- SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. **Análise da germinação**: um enfoque estatístico. Brasília, DF: UnB, 2004. 248p.

- SILVA, L. M. de M.; RODRIGUES, T. de J.; AGUIAR, D. I. B. de Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Árvore**, v.26, p.691-697, 2002.
- SILVEIRA, F. A. O.; NEGREIROS, D.; FERNANDES, G. W. Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Marcetia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC. (Melastomataceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.847-851, 2004.
- TASSEVA, G.; VAULTIER, M. N., CANTREL, C.; COCHET, F.; DAVY de VIRVILLE, J.; DEMANDRE, C.; JUSTIN, A.-M.; KADER, J.-C.; MOREAU, F.; RUELLAND, E.; ZACHOWSKI, A. Implication of membrane lipids in plant response to a cold shock, from signalling to adaptation. Site : < <http://www.mete.mtesz.hu/pls/proceedings/eloadasok-pdf/o-6-7-zachowski.pdf>>. Acessado em 31 de janeiro de 2011.
- TOWNSEND, C. E.; MCGINNIES, W. J. Mechanical scarification of cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.) seed. **Crop Science**, v. 12, p. 392-394, 1972.
- WANG, R.; BAI, Y.; LOW, N.H.; TANINO, K. Seed size variation in cold and freezing tolerance during seed germination of winterfat (*Krascheninnikovia lanata*) (Chenopodiaceae). **Canadian Journal Botany**, v. 84, n.1, p.49-59, 2006.
- WELBAUM, G.E.; BRADFORD, K.J. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.): V. Water relations of imbibitions and germination. **Plant Physiology**, v.92, p.1046-1052, 1990.
- WOODSTOCK, L.M. Physiological and biochemical of seed vigor. **Seed Science and Technology**, v.1, n.1, p.127-157, 1973.

## 5. CAPÍTULO III

### ATIVIDADE DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASE, ASCORBATO PEROXIDASE E CATALASE DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Melanoxylon brauna* SCHOTT SOB DIFERENTES TEMPERATURAS

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de níveis crescentes de temperaturas sobre o metabolismo oxidativo, por meio da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) no eixo embrionário e no endosperma micropilar de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott durante a germinação. Para avaliação da germinação, as sementes foram semeadas em rolos de papel germitest umedecidos com água destilada e submetidas às temperaturas constantes de 15, 25, 30 e 40°C, durante 10 dias. As determinações das atividades das enzimas SOD, APX e CAT foram feitas nas sementes colocadas para germinar sob as mesmas condições descritas acima e a cada 12 horas foram retiradas amostras até a protrusão radicular de 50% das sementes ou 168 horas para a temperatura de 15°C. Não foram detectadas atividades das enzimas SOD, APX e CAT no endosperma micropilar durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna*, sob diferentes temperaturas. No eixo embrionário, as atividades das enzimas SOD e CAT apresentaram maiores alterações ao longo da germinação em 15 e 40°C, demonstrando que temperaturas estressantes provocam danos oxidativos. A atividade da enzima APX, no eixo embrionário, não foi afetada pela temperatura ao longo da germinação e sua atividade foi extremamente baixa.

**Palavras-chave:** antioxidantes, atividade enzimática, estresse oxidativo

# **ACTIVITY OF ENZYMES SUPEROXIDE DISMUTASE, ASCORBATE PEROXIDASE AND CATALASE DURING GERMINATION OF *Melanoxylon brauna* SCHOTT SEEDS UNDER DIFFERENT TEMPERATURES**

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to investigate the effect of increasing levels of temperature on the oxidative metabolism, through the activity of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in the embryonic axis and endosperm micropylar of *Melanoxylon brauna* Schott seeds during germination. To assess germination, seeds were sown in paper germitest moistened with distilled water and subjected to constant temperatures of 15, 25, 30 and 40°C for 10 days. Measurements of the activities of SOD, APX and CAT were made in the seeds placed to germinate under the same conditions described above and every 12 hours the samples were taken until root protrusion of 50% of the seeds or 168 hours to a temperature of 15°C. Was not detected activity of SOD, APX and CAT in the micropylar endosperm during germination of seeds of *Melanoxylon brauna* under different temperatures. In the embryonic axis, the activities of SOD and CAT showed greater changes along the germination of 15 and 40°C, demonstrating that temperature stress causes oxidative damage. The APX enzyme activity in the embryonic axis was not affected by temperature during germination and its activity was extremely low.

**Keywords:** antioxidants, enzyme activity, oxidative stress

## **INTRODUÇÃO**

A germinação da semente é uma fase fundamental no ciclo de vida das plantas, que se inicia com a absorção de água e termina com o alongamento do eixo embrionário e protrusão da radícula (BEWLEY e BLACK, 1994). A germinação de sementes consiste na reativação do metabolismo e crescimento do embrião por meio de eventos metabólicos ordenados, cada um deles apresentando exigências próprias quanto à temperatura, principalmente porque

dependem da atividade de sistemas enzimáticos específicos (BEWLEY e BLACK, 1994; MARCOS FILHO, 2005).

A germinação das sementes envolve a regulação e a ativação de enzimas específicas nos momentos apropriados (TOMMASI et al., 2001). No início da embebição ocorre aumento rápido na captação de oxigênio e na fosforilação oxidativa, processos que requerem muita energia (TOMMASI et al., 2001). A fosforilação oxidativa e a mobilização de reservas geram espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem causar dano estrutural e funcional às células (PRODANOVIC et al., 2007). As EROs estão envolvidas em vários aspectos da fisiologia de sementes e normalmente são consideradas como moléculas tóxicas cujo acúmulo pode acarretar danos celulares e perturbações no processo de germinação (BAILLY, 2004). Os danos peroxidativos decorrem, principalmente, da deterioração oxidativa de ácidos graxos insaturados das membranas, pela ação de EROs presentes no interior das células. As espécies reativas de oxigênio incluem o oxigênio “singleto” ou molecular ( $O_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^-$ ) e radical hidroxila ( $OH^-$ ), dentre outros (SCANDALIOS, 1993).

As moléculas de EROs estão envolvidas nos processos de crescimento que acontecem durante o desenvolvimento da semente, como a embriogênese, e também em mecanismos paralelos à protrusão da radícula (BAILLY, 2004). Para que a célula não se deteriore por intoxicação, elas possuem eficiente mecanismo de enzimas removedoras de EROs (McDONALD, 1999; BAILLY, 2004).

Dentre as enzimas antioxidantes envolvidas na eliminação de EROs em plantas incluem as superóxidos dismutases (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidases do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11), e a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) (MITTLER, 2003; SCANDALIOS, 2005). O aumento da atividade dessas enzimas indica a evolução da deterioração, com atuação mais intensa do complexo antioxidante. O equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs pode ser perturbado por fatores ambientais adversos, tendo como consequência o aumento do nível intracelular de elementos reativos (SCANDALIOS, 2005).

Dentro da célula, as superóxido dismutases constituem a primeira linha de defesa contra EROs (ALSCHER et al., 2002) e podem ser encontradas na matriz mitocondrial (MnSOD), citoplasma celular (Cu/ZnSOD) ou cloroplastos (CuZnSOD, FeSOD) (BOWLER et al., 1992; ALSCHER et al., 2002; SCANDALIOS, 2005), sendo responsáveis por catalisar a dismutação do superóxido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (McDONALD, 1999; SCANDALIOS, 2005). O peróxido de hidrogênio é convertido em água pela ação da catalase (CAT), que está situada em glioxissomos e peroxissomos (WILLEKENS et al., 1995;

SCANDALIOS, 2005). O ciclo da glutathiona-ascorbato também pode eliminar parte do  $H_2O_2$ , e para tanto, envolve as enzimas ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDAR), dehidroascorbato redutase (DHAR) e glutathiona redutase (GR), que participam da regeneração do ácido ascórbico, um antioxidante poderoso (vitamina C), glutathiona reduzida e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (BAILLY, 2004). As enzimas deste ciclo estão presentes nos cloroplastos, citoplasma, mitocôndria, peroxissomos e apoplastos (MITTLER, 2003), e aumentam sua atividade em resposta ao estresse oxidativo.

Taiz e Zaiger (2004) relatam que apesar de sua grande efetividade na neutralização do oxigênio reativo, a SOD produz  $H_2O_2$  que, apesar de menos reativo, em altas concentrações torna-se tóxico. Dessa forma, sua atividade isolada é pouco funcional na proteção da semente, sendo necessária a formação de um sistema removedor de EROs, conjuntamente com catalase e peroxidases (BOWLER et al., 1992; McDONALD, 1999).

De modo indireto, por meio de análises enzimáticas, a produção de EROs já foi relatada em diversas espécies durante a embebição das sementes. No entanto, os locais exatos de produção de EROs durante o processo de germinação ainda não são conhecidos, alguns locais como o eixo embrionário, tegumentos e camadas do aleurona são mencionados como locais favoráveis para a síntese dessas moléculas (BAILLY, 2004).

A produção de EROs durante a germinação de sementes é considerada como uma causa de estresse que pode afetar o sucesso da germinação. Sendo assim, enzimas removedoras de EROs são consideradas de grande importância para a conclusão da germinação (BAILLY, 2004), tendo sido detectada durante a germinação de sementes de diversas espécies tais como: *Triticum aestivum* (CAKMAK et al., 1993), *Picea omorika* (PRODANOVIC et al., 2007), *Hordeum vulgare* (MEI e SONG, 2010), *Medicago sativa* (CAKMAK et al., 2010) e *Jatropha curcas* (CAI et al., 2011). Entretanto, poucos trabalhos com sementes de espécies florestais, tampouco, sob influência da temperatura, foram encontrados na literatura.

A temperatura é um dos muitos fatores ecológicos que influenciam na germinação, determinando a taxa de germinação (BASKIN e BASKIN, 1998). De acordo com Bewley e Black (1994), a temperatura pode afetar a absorção de água e as reações bioquímicas que regulam o metabolismo envolvido nesse processo.

*Melanoxylon brauna* Schott é uma espécie florestal pertencente à família Fabaceae. A espécie é popularmente conhecida como braúna, braúna-preta, graúna, maria-preta, rabo-de-macaco (LORENZI, 2002). Ocorrendo naturalmente no Sul da Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Sergipe e Pará, bem como na floresta pluvial da

encosta atlântica (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 2002). É classificada como semidecídua, heliófila. Plantas adultas dessa espécie normalmente possuem entre 15 a 25 m de altura e 40 a 80 cm de diâmetro. As flores são amareladas, em panículas terminais amplas. O fruto é um legume deiscente, contendo várias sementes duras envoltas por estrutura membranácea (asa) que possibilita sua dispersão pelo vento (BARROSO et al., 1999; LORENZI, 2002). O florescimento ocorre de fevereiro a abril e os frutos amadurecem no período de setembro a outubro. Sua madeira é muito pesada, apresentando densidade de  $1,05 \text{ g cm}^{-3}$ , compacta, muito dura ao corte e de grande durabilidade mesmo quando em ambientes adversos, sendo própria para obra externas e hidráulicas, dentre outros. É uma espécie potencial para reflorestamentos (LORENZI, 2002), e apesar de seu crescimento lento pode ser utilizada na arborização urbana (ALMEIDA et al., 1998). Devido à exploração de sua madeira e a falta de replantios a espécie está presente na “lista oficial de flora ameaçada de extinção” estabelecida pela Instrução Normativa N° 6, de 23 de setembro de 2008 (MMA, 2011).

Apesar da importância ecológica e econômica da espécie verifica-se que há poucos trabalhos disponíveis na literatura que abordam as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de espécies nativas como, por exemplo, as relações entre atividade enzimática nos diferentes compartimentos das sementes durante a germinação sob diferentes temperaturas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade das enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase, durante a germinação no eixo embrionário e endosperma micropilar de sementes de *Melanoxylon brauna* sob diferentes temperaturas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal e beneficiamento**

As sementes de *Melanoxylon brauna* foram colhidas em 10 árvores-matrizes na cidade de Leopoldina - MG, em setembro de 2010. Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa - UFV. Após a colheita, os frutos foram secos ao sol até sua abertura e as sementes, contendo aproximadamente 13% de teor de água, foram armazenadas tamboretas de fibra, a 5°C e 60% de umidade relativa do ar. Durante o beneficiamento foram eliminadas as sementes imaturas, deterioradas ou danificadas.

### **Condições de germinação e delineamento experimental**

Para determinação do percentual de germinação, as sementes foram semeadas em rolos de papel germitest umedecidos com água destilada e submetidas às temperaturas (constantes) mínima – 15°C, faixa ótima – 25 e 30°C e máxima – 40°C (determinadas previamente) em germinador sob luz constante, proporcionada por quatro lâmpadas de 20 W, tipo luz do dia, durante 10 dias. Foram consideradas germinadas as sementes que emitiram radícula (2 mm). O número de sementes germinadas foi avaliado diariamente. O reumedecimento do substrato foi feito sempre que necessário. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e em cada temperatura foram realizadas cinco repetições de 20 sementes. A partir do número de sementes germinadas foi calculada a porcentagem de germinação – G% e o índice de velocidade de germinação – IVG (MAGUIRE, 1962). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SAS.

### **Ensaio enzimáticos**

Na avaliação da atividade enzimática, as sementes foram semeadas em rolos de papel germitest e submetidas às temperaturas (constantes) mínima – 15°C, faixa ótima – 25 e 30°C e máxima – 40°C em germinador sob luz constante, proporcionada por quatro lâmpadas de 20 W, tipo luz do dia. A cada 12 horas foram retiradas amostras das sementes para análise da atividade enzimática até a protrusão radicular de 50% das sementes ou 168 horas para a temperatura mínima. Estas amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) até o momento das análises.

Os extratos enzimáticos brutos, usados para as determinações das atividades da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) foram obtidos por meio da metodologia descrita por Hodges et al. (1997), com pequenas adaptações. Amostras de 16 eixos embrionários e 16 endospermas micropilares foram separadamente trituradas em gelo, usando gral e pistilo, seguido da adição de 2,0 mL do seguinte meio de homogeneização: tampão fosfato 50 mM, pH 7,8 e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). Em seguida o extrato foi centrifugado a 19.000 xg durante 30 minutos, a 4°C, e o sobrenadante obtido foi utilizado como extrato enzimático bruto. Foram realizadas três repetições de cada extração.

**Atividade de SOD:** A atividade da superóxido dismutase foi determinada pelo ensaio contendo 30 µL do extrato enzimático bruto e 2,97 mL de um meio de reação constituído de: 1500 µL de tampão fosfato de 100 mM, pH 7,5, 780 µL de metionina 50 mM, 225 µL de azul

de p-nitro tetrazólio (NBT) 1mM, 60 µL de EDTA 5 mM, 60 µL de riboflavina 2 µM e 345 µL de água destilada (DEL LONGO et al., 1993). A reação foi conduzida a 25°C em câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após cinco minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). A absorbância a 560 nm, de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro, por igual tempo, foi usado como controle, e a leitura obtida em  $A_{560nm}$  foi subtraída da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971).

**Atividade de APX:** A atividade da ascorbato peroxidase foi determinada pelo ensaio contendo 100 µL do extrato enzimático bruto e 1400 µL de um meio de reação constituído de: 700 µL de tampão de fosfato 50 mM, pH 7,8, 400 µL de ácido ascórbico 0,25 mM contendo EDTA 0,1 mM, e 300 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mM (adaptado de RAMALHEIRO, 2009). O decréscimo na absorbância a 210 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante dois minutos com intervalo de 10 segundos entre cada leitura, sendo, a atividade da APX determinada com base na inclinação da reta após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM cm<sup>-1</sup> (NAKANO e ASADA, 1981). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 nmol de substrato em produto por minuto, por mL, nas condições do ensaio.

**Atividade de CAT:** A atividade da catalase foi determinada pelo ensaio contendo 100 µL do extrato enzimático bruto e 1400 µL de um meio de reação constituído de: 900 µL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,8 e 500 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,97 M (adaptado de HODGES et al., 1997). O decréscimo na absorbância a 240 nm, à temperatura de 25°C foi medido durante dois minutos de reação a cada 10 segundos, sendo, a atividade da CAT determinada com base na inclinação da reta após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M cm<sup>-1</sup> (ANDERSON et al., 1995). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 mmol de substrato em produto por minuto, por mL, nas condições do ensaio.

Os dados de determinação das atividades enzimáticas apresentados foram valores médios de ensaios em triplicata e os valores do desvio padrão foram calculados. As atividades enzimáticas foram expressas em atividade específica (SOD - U SOD min<sup>-1</sup> mg prot<sup>-1</sup>; APX - nmol ASC min<sup>-1</sup> µg prot<sup>-1</sup>; CAT- mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> µg prot<sup>-1</sup>).

### Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteínas para todas as amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA), de 2,5 a 50 µg de proteína.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados de germinação e IVG são mostrados na Tabela 1. Sob temperatura de 15°C, a germinação foi de apenas 11%. Nas temperaturas de 25 e 30°C as médias de germinação não diferiram entre si, observando-se o máximo de germinação. A germinação volta a decrescer na temperatura de 40°C. Os valores de IVG aumentam significativamente com o aumento da temperatura até 30°C, decrescendo significativamente em 40°C. Percebe-se que o aumento da temperatura até 30°C aumentou a velocidade de germinação, embora a porcentagem final não tenha diferenciado significativamente da observada a 25°C. Como em qualquer sistema biológico, o aumento da temperatura resulta no aumento da velocidade das reações, tendo limites específicos para a progressão. Os resultados para *Melanoxylon brauna* diferem parcialmente daqueles apresentados por Bracalioni et al. (2010), em avaliação das diferentes temperaturas de germinação de espécies florestais brasileiras no bioma Mata Atlântica. Os autores constataram que nas diferentes pesquisas publicadas a temperatura de 25°C foi a mais adequada para a maior germinação, ficando a temperatura de 30°C como a mais apropriada para espécies amazônicas. Segundo os mesmos autores, a temperatura reflete o bioma original das sementes. No presente caso, a *Melanoxylon brauna* mostra amplitude de temperatura que é apropriada para a sua vasta região de ocorrência, do Pará a São Paulo.

**Tabela 1** – Germinação (%) e índice de velocidade de germinação - IVG de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas a diferentes temperaturas.

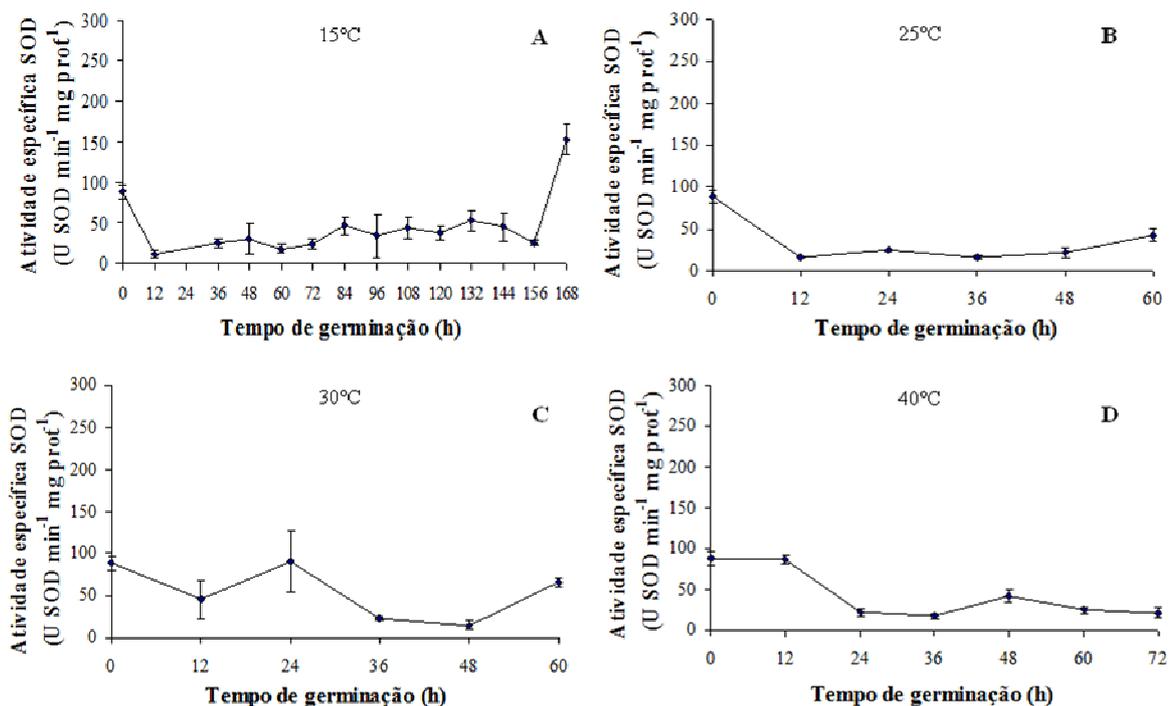
Temperatura (°C)	Germinação (%)	IVG
15	11 c	0,23 c
25	90 a	3,22 b
30	89 a	4,13 a
40	48 b	3,31 b

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Não foram detectadas, pela metodologia utilizada, atividade das enzimas SOD, APX e CAT no endosperma micropilar de sementes de *Melanoxylon brauna*, nas diferentes

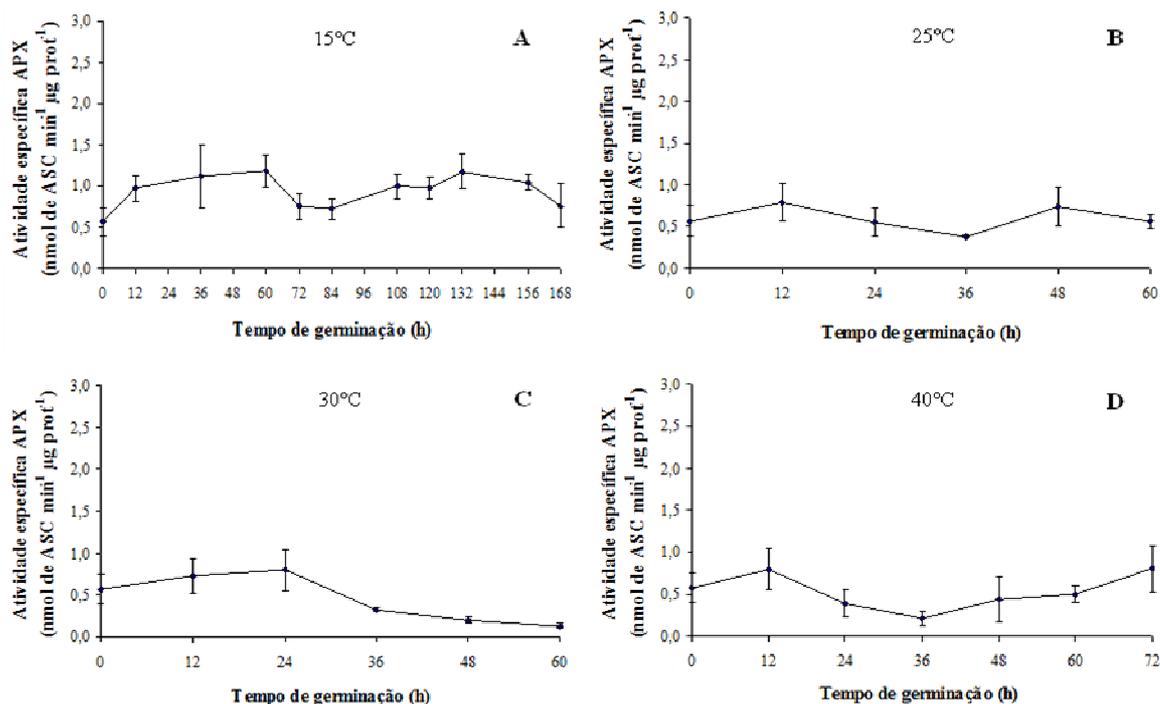
temperaturas, estes resultados discordam dos observados no endosperma de sementes de *Jatropha curcas* durante a germinação para as atividades das enzimas SOD e CAT (CAI et al., 2011). Cakmak et al. (1993) também relatam a atividade das enzimas SOD, APX e CAT em endosperma de sementes de *Triticum aestivum*, porém, com valores inferiores aos observados no eixo embrionário. Altas taxas do radical superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são sintetizadas quando as células não estão sob condições ideais (APEL e HIRT, 2004), entretanto diferentes compartimentos das sementes comportam-se de maneira específica. Sementes de braúna submetidas ao envelhecimento acelerado a 45°C por 48 horas não apresentaram alterações significativas na atividade da SOD nos cotilédones, diferentemente do comportamento do eixo cuja atividade se alterou em 24 horas de envelhecimento (CORTE et al., 2010). Como o endosperma micropilar é composto por células de reserva, é de se esperar que não houvesse outra atividade que não a degradação das reservas, sem os mecanismos de proteção, caracterizados pelas enzimas de decomposição das EROs.

Os valores de atividade da SOD no eixo embrionário encontram-se na Figura 1 e Apêndice 1. Observa-se queda da atividade na temperatura de 15°C nas primeiras 12 horas de germinação, mantendo-se particularmente constante até próximo à protrusão da radícula, entre 156 e 168 horas, quando foi observado aumento da atividade (Figura 1A). Sob temperatura de 25, 30 e 40°C a atividade decresceu a partir do tempo zero (testemunha) e se manteve praticamente constante durante todo o período de germinação (Figura 1B, 1C e 1D), demonstrando não sofrer influência das temperaturas durante a germinação, provavelmente por não serem temperaturas que causem estresse às sementes. Porém, sua presença ao longo deste processo sugere que esta enzima esteja participando da proteção contra radicais superóxidos. Resultados semelhantes foram observados por Prodanovic et al. (2007), onde a atividade da enzima SOD apresentou comportamento constante ao longo do período de germinação de semente de *Picea omorika*, sob temperatura de 25°C. Os resultados encontrados neste trabalho, estão de acordo com os observados por Cakmak et al. (2010), que verificaram, durante a germinação de sementes recém colhidas de *Medicago sativa*, sob temperatura de 22°C, comportamento constante da atividade da enzima SOD. Ressalta-se, que a atividade da enzima SOD durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* é considerada alta, quando comparada aos resultados encontrados para outras espécies durante a germinação de sementes (CAKMAK et al., 1993; MEI e SONG, 2010).



**Figura 1** – Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no eixo embrionário durante o período de germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott sob efeitos das temperaturas: A) 15°C, B) 25°C, C) 30°C, D) 40°C. Barras verticais indicam o valor do desvio padrão da média.

Detectou-se baixa atividade da enzima APX no eixo embrionário ao longo da germinação nas diferentes temperaturas (Figura 2 e Apêndice 2). Analisando o comportamento da SOD e considerando que a APX é uma rota alternativa na retirada de peróxido de hidrogênio do meio, pode-se supor que a produção de EROs é baixa nessas sementes durante o processo de germinação, o que mantém a atividade desta enzima em níveis extremamente baixos. Estes resultados discordam dos observados por Mei e Song (2010), que verificaram aumento da atividade da enzima APX em sementes de *Hordeum vulgare* com a elevação da temperatura de 0 a 25°C e decréscimo da atividade a partir desta temperatura. Ramalheiro (2009) também verificou aumento na atividade da enzima APX em algumas variedades de *Olea europaea*, em diferentes estádios de maturação e afirmou que este comportamento pode significar importante capacidade da espécie em desenvolver mecanismos de tolerância ao estresse, especialmente no combate as EROs.

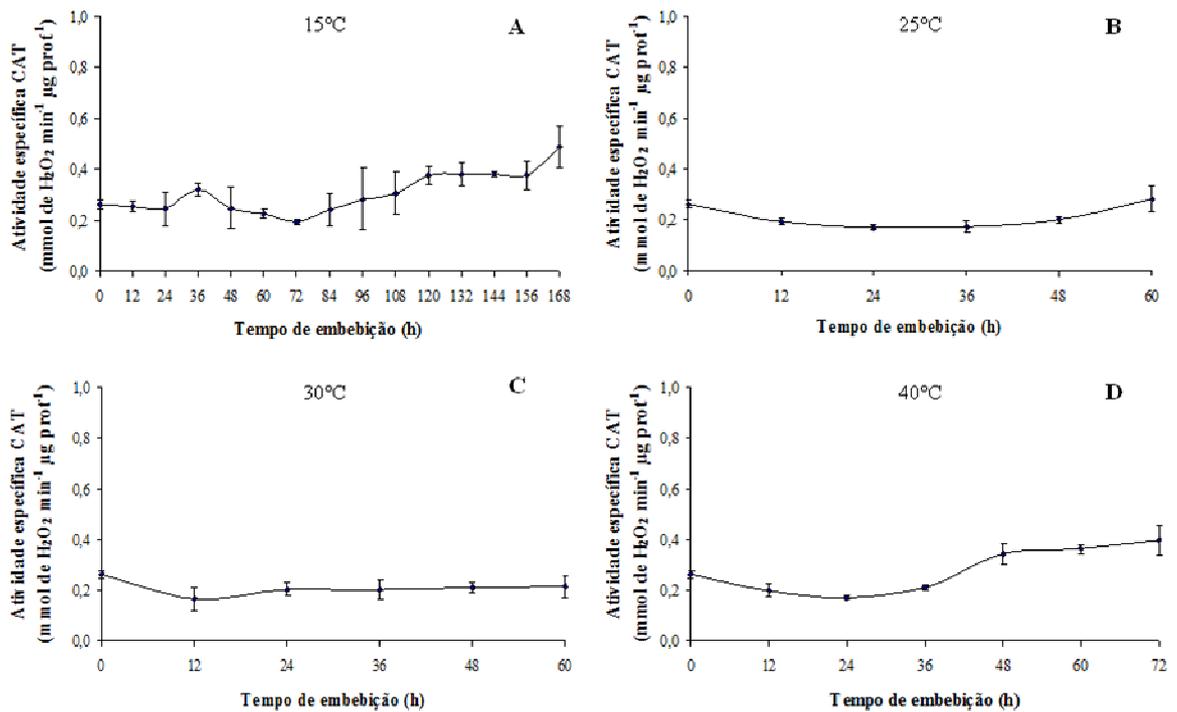


**Figura 2** – Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) no eixo embrionário durante o período de germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott sob efeitos das temperaturas: A) 15°C, B) 25°C, C) 30°C, D) 40°C. Barras verticais indicam o valor do desvio padrão da média.

A enzima CAT no eixo embrionário apresentou alterações no seu comportamento ao longo da germinação, sob diferentes temperaturas (Figura 3 e Apêndice 3), cujos níveis foram mais baixos que o da rota da APX. Nas temperaturas de 15°C (Figura 3A) observa-se aumento na atividade ao longo da germinação, a partir de 84 horas, demonstrando que há produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células. A atuação das rotas envolvendo a APX e CAT são concomitantes, o que pode resultar na baixa atividade de ambas, mas com provável eficiente desempenho de desintoxicação. Na temperatura de 25°C observa-se pequeno declínio nas primeiras 24 horas e aumento a partir de 36 horas, quando atingiu valores próximos ao da testemunha em 60 horas. Em 30°C houve redução da atividade nas primeiras 12 horas, permanecendo constante e em valores próximos àqueles de 25°C. Sob 40°C o comportamento foi semelhante ao de 25°C nas primeiras 36 horas, mas com elevação em 48 horas, permanecendo estável a seguir. Considerando que 15 e 40°C foram temperaturas fora da faixa ótima de germinação, é razoável supor situação de estresse influenciando a maior atividade da enzima. Entretanto, Mei e Song (2010) verificaram aumento da atividade da enzima CAT em sementes de *Hordeum vulgare* com o aumento da temperatura de 0 a 25°C e decréscimo a partir desta temperatura, com 48 horas de germinação. Cakmak et al. (1993) também observaram aumento da atividade desta enzima, no eixo embrionário, sob

temperatura de 24°C, ao longo do período de germinação de sementes de *Triticum aestivum*. Já Cakmak et al. (2010) observaram diminuição da atividade da enzima CAT ao longo da germinação de *Medicago sativa*, sob temperatura de 22°C.

Pode-se concluir, diante desses resultados, que o comportamento da enzima CAT durante o processo de germinação é intrínseco a cada espécie.



**Figura 3** – Atividade da enzima catalase (CAT) no eixo embrionário durante o período de germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott sob efeitos das temperaturas : A) 15°C, B) 25°C, C) 30°C, D) 40°C Barras verticais indicam o valor do desvio padrão da média.

Sob mudanças lentas nas condições ambientais muitas plantas desenvolvem mecanismos de tolerância a situações de estresse. Frequentemente a exposição a um tipo particular de estresse, sob níveis moderados, pode aumentar a resistência a outros estresses (MEI e SONG, 2010). Segundo os mesmos autores, aumentos nas atividades de enzimas removedoras de EROs podem ser um elemento comum durante a germinação de sementes que possuem mecanismos de tolerância ao estresse. Para Prodanovic et al. (2007), as atividades das enzimas SOD e CAT podem estar envolvida na preservação da viabilidade e proteção das sementes contra as EROs produzidas durante a germinação. Huang e Guo (2005), em estudo com duas cultivares de *Oryza* sp.(Xiangnuo-1 e IR-50), uma tolerante e outra não tolerante ao resfriamento, observaram que as atividades das enzimas SOD, APX e

CAT se mantiveram alta na cultivar tolerante, quando submetidas à temperatura de 8°C, e decresceu na cultivar não tolerante, nesta mesma condição. Os autores concluíram que a atividade mais alta das enzimas antioxidantes está associada à tolerância da cultivar à baixa temperatura.

## **CONCLUSÕES**

Não foram detectadas atividades das enzimas SOD, APX e CAT no endosperma micropilar durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna*, sob diferentes temperaturas.

No eixo embrionário, as atividades das enzimas SOD e CAT apresentaram maiores alterações ao longo da germinação em 15 e 40°C, demonstrando que temperaturas estressantes provocam danos oxidativos.

A atividade da enzima APX, no eixo embrionário, não foi afetada pela temperatura ao longo da germinação e sua atividade foi extremamente baixa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1998. 464p.

ANDERSON M. D; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 5, n. 1, p. 373-399, 2004.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Editora UFV, Viçosa – MG, 443 p., 1999.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004

BASKIN, C.C., BASKIN, J.M. **Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination**. Academic Press, San Diego, p.5-85, 1998.

BEAUCHAMP C., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase improved as says and as say applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**. v. 44, p. 276-287, 1971.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BORGES, E.E.L. Comportamento bioquímico e fisiológico de sementes florestais nativas durante a embebição. **Tese (Doutorado em Ecologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP: UFSCAR, 2003, 100p.**

BOWLER, C; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p.83-116, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANCALION, P.H.S.; NOVENBRE, A.D.L.C.; RODRIGUES, R.R. Temperatura ótima de germinação de sementes de espécies arbóreas brasileiras. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.4, p.15-21, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009. 399p.

CAI, F.; MEI, L.; AN, X.; GAO, S.; TANG, L.; CHEN, F. Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. **Journal of Agriculture and Biology**, v. 13, p. 25-30, 2011.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 258, p. 127-132, 1993.

CAKMAK, T.; ATICI, O.; AGAR, G.; SUNAR, S. Natural aging-related biochemical changes in alfafa (*Medicago sativa* L.) seeds stored for 42 years. **International Research Journal of Plant Science**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2010.

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; LEITE, H.G.; PEREIRA, B.C.; GONÇALVES, J.F.C. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.83-91, 2010.

DEL LONGO, O. T.; GOINZ'ZLEZ, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential to drought. **Plant Cell Physiology**, v. 37, n. 7, p. 1023-1028, 1993.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases - I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

HODGES, D.M.; ANDREWS, C.J.; JOHNSON, D.A.; HAMILTON, R.I. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 310, p. 1105-1113, 1997.

HUANG, M.; GUO, Z. Responses of antioxidative system to chilling stress in two Rice cultivars differing in sensitivity. **Biology Plantarum**, v. 49, n. 1, p. 81-84, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Ed. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2002. 368 p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination and in selection and evaluation from seeding emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

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

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MEI, Y.; SONG, S. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 11, n. 12, p. 965-972, 2010.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**. v. 7, n. 9, set., p. 405-410, 2003.

MMA – Lista oficial de Flora ameaçada de extinção – acesso em 20/01/2011. Site: <[http://www.tecniflora.com.br/flora\\_brasileira\\_ameacada.pdf](http://www.tecniflora.com.br/flora_brasileira_ameacada.pdf)> ou <<http://www.mma.gov.br>>

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

PRODANOVIĆ, O.; PRODANOVIĆ, R.; BOGDANOVIĆ, J.; MITROVIĆ, A.; MILOSAVIĆ, N.; RADOTIĆ, K. Antioxidative enzymes during germination of two lines of serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. **Archives of Biological Science**, v. 59, n. 3, p. 209-216, 2007.

RAMALHEIRO, J. P. da S. C. Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades. **Dissertação de Mestrado** em Engenharia Alimentar - Qualidade e Segurança Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa. 2009. 51p.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxides dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Califórnia: Cummings, 2004. 565 p.

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C., PINTO, M. C.; GARA, L. A. Comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. **Journal Experimental Botany**, v. 52, p. 647-1654, 2001.

WILLEKENS, H. I. D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP W. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, v. 1, p. 207- 228, 1995.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Para sementes de *Melanoxylon brauna* pode-se concluir:

A protrusão da radícula ocorre em torno de 72 horas após início da embebição e a germinação é epígea.

O tamanho e a cor das sementes influenciam sobre a qualidade fisiológica do lote de sementes. Para a espécie, as sementes pequenas e claras possuem qualidade fisiológica inferior às pequenas escuras e, às grandes, independentemente da cor do tegumento.

O substrato mais indicado para a realização de teste de germinação em laboratório é o rolo de papel germitest.

A temperatura atuou de forma significativa sobre a porcentagem final, velocidade e sincronização da germinação de sementes.

É mais criterioso recomendar faixas de temperaturas para germinação do que temperaturas pontuais.

As faixas de temperatura considerando-se todas as variáveis investigadas foram: 12,1-12,6°C (mínima); 30-35,8°C (ótima); e 42,4-43°C (máxima).

A espécie apresenta uma grande amplitude de germinação com relação à temperatura, sendo verificada germinação na faixa de temperatura de 12 a 42°C.

O teste de CE foi eficiente para avaliar o efeito da temperatura sobre a qualidade fisiológica das sementes e por este teste a temperatura ótima foi de 27°C.

Não foram detectadas atividades das enzimas SOD, APX e CAT no endosperma micropilar durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna*, sob diferentes temperaturas.

No eixo embrionário, as atividades das enzimas SOD e CAT apresentaram maiores alterações ao longo da germinação em 15 e 40°C.

A atividade da enzima APX, no eixo embrionário, não foi afetada pela temperatura ao longo da germinação e sua atividade foi extremamente baixa.

**APÊNDICE 1** – Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott durante a germinação sob diferentes temperaturas. Os valores são expressos em U mL<sup>-1</sup> e U mg prot<sup>-1</sup> (atividade específica) (±desvio padrão da média).

Temperatura	Tempo de germinação (h)	U mL <sup>-1</sup>	U mg prot <sup>-1</sup>
15°C	0	247,10 (±52,27)	88,41 (±8,42)
	12	27,76 (±10,85)	10,45 (±4,36)
	24	198,83 (±60,11)	59,15 (±10,11)
	36	80,96 (±20,49)	24,31 (±5,97)
	48	91,89 (±42,68)	29,34 (±18,32)
	60	64,56 (±22,24)	17,49 (±5,44)
	72	87,49 (±28,41)	23,31 (±5,96)
	84	144,48 (±43,78)	45,89 (±11,20)
	96	110,37 (±86,26)	33,43 (±27,22)
	108	155,14 (±46,72)	43,21 (±14,30)
	120	137,94 (±30,35)	36,70 (±8,11)
	132	190,15 (±51,77)	52,19 (±13,27)
	144	160,48 (±64,33)	44,45 (±17,76)
	156	91,83 (±12,51)	25,13 (±3,58)
168	375,81 (±63,00)	152,80 (±19,72)	
25°C	0	247,10 (±52,27)	88,41 (±8,42)
	12	39,71 (±4,94)	15,64 (±1,45)
	24	62,17 (±10,26)	24,06 (±0,40)
	36	57,87 (±10,06)	16,63 (±2,92)
	48	59,21 (±13,92)	21,78 (±6,46)
	60	127,79 (±28,08)	42,75 (±8,38)
30°C	0	247,10 (±52,26)	88,41 (±8,42)
	12	137,27 (±64,61)	45,431 (±22,11)
	24	277,42 (±93,02)	90,34 (±36,08)
	36	53,45 (±3,29)	23,33 (±1,86)
	48	44,71 (±15,97)	14,99 (±4,43)
	60	162,89 (±20,98)	65,43 (±5,37)
40°C	0	247,10 (±52,26)	88,41 (±8,42)
	12	202,06 (±20,00)	87,00 (±6,44)
	24	69,01 (±11,48)	22,14 (±4,19)
	36	53,28 (±14,74)	17,29 (±3,54)
	48	124,02 (±41,40)	41,78 (±7,99)
	60	82,40 (±4,96)	24,94 (±3,31)
	72	55,14 (±17,47)	21,74 (±6,71)

**APÊNDICE 2** – Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) no eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott durante a germinação sob diferentes temperaturas. Os valores são expressos em U mL<sup>-1</sup> e U µg prot<sup>-1</sup> (atividade específica) (±desvio padrão da média).

Temperatura	Tempo de germinação (h)	U mL <sup>-1</sup>	U µg prot <sup>-1</sup>
15°C	0	2420,63 (±930,43)	0,56 (±0,18)
	12	2916,67 (±362,07)	0,97 (±0,16)
	24	2103,17 (±655,66)	0,62 (±0,15)
	36	3035,71 (±1194,90)	1,12 (±0,38)
	48	1726,19 (±371,73)	0,58 (±0,26)
	60	3750,00 (±586,24)	1,18 (±0,20)
	72	2519,84 (±454,62)	0,76 (±0,15)
	84	2638,89 (±446,76)	0,72 (±0,12)
	96	4900,79 (±953,00)	1,57 (±0,46)
	108	2837,30 (±149,8)	0,99 (±0,15)
	120	2996,03 (±604,14)	0,98 (±0,13)
	132	3869,33 (±119,05)	1,17 (±0,22)
	144	2083,33 (±178,57)	0,68 (±0,08)
	156	3353,17 (±137,46)	1,04 (±0,10)
168	2162,70 (±446,76)	0,76 (±0,27)	
25°C	0	2420,63 (±930,43)	0,56 (±0,18)
	12	3234,13 (±895,50)	0,78 (±0,23)
	24	2460,32 (±717,58)	0,57 (±0,17)
	36	1884,92 (±90,92)	0,38 (±0,02)
	48	3313,49 (±1014,24)	0,74 (±0,24)
	60	2619,05 (±362,07)	0,56 (±0,09)
30°C	0	2420,63 (±930,43)	0,56 (±0,18)
	12	30315,87 (±655,66)	0,73 (±0,21)
	24	3452,38 (±1250,00)	0,79 (±0,24)
	36	1468,25 (±149,80)	0,31 (±0,03)
	48	873,02 (±225,35)	0,20 (±0,04)
	60	496,03 (±123,91)	0,13 (±0,03)
40°C	0	2420,63 (±930,43)	0,56 (±0,18)
	12	3095,24 (±826,93)	0,80 (±0,25)
	24	1895,08 (±785,92)	0,38 (±0,16)
	36	1061,51 (±507,12)	0,21 (±0,09)
	48	2043,65 (±1282,64)	0,43 (±0,27)
	60	2222,22 (±382,68)	0,50 (±0,10)
	72	2857,14 (±778,37)	0,80 (±0,28)

**APÊNDICE 3** – Atividade da enzima catalase (CAT) no eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott durante a germinação sob diferentes temperaturas. Os valores são expressos em U mL<sup>-1</sup> e U µg prot<sup>-1</sup> (atividade específica) (±desvio padrão da média).

Temperatura	Tempo de germinação (h)	U mL <sup>-1</sup>	U µg prot <sup>-1</sup>
15°C	0	1097,22 (±149,01)	0,26 (±0,01)
	12	776,23 (±118,97)	0,25 (±0,01)
	24	841,05 (±291,94)	0,24 (±0,06)
	36	853,39 (±75,41)	0,32 (±0,02)
	48	756,17 (±100,83)	0,25 (±0,08)
	60	729,94 (±94,46)	0,23 (±0,01)
	72	655,86 (±43,02)	0,19 (±0,01)
	84	873,46 (±168,29)	0,24 (±0,06)
	96	856,48 (±164,60)	0,28 (±0,12)
	108	861,11 (±143,74)	0,30 (±0,08)
	120	1138,89 (±116,85)	0,38 (±0,03)
	132	1274,69 (±239,51)	0,38 (±0,04)
	144	1185,19 (±150,23)	0,38 (±0,01)
	156	1214,51 (±115,77)	0,38 (±0,05)
168	1439,81 (±166,92)	0,49 (±0,08)	
25°C	0	1097,22 (±149,01)	0,26 (±0,01)
	12	800,93 (±28,16)	0,19 (±0,01)
	24	754,63 (±41,15)	0,17 (±0,01)
	36	856,48 (±113,78)	0,17 (±0,02)
	48	901,23 (±67,46)	0,20 (±0,01)
	60	1308,64 (±201,39)	0,28 (±0,04)
	0	1097,22 (±149,01)	0,26 (±0,01)
30°C	12	694,44 (±216,11)	0,16 (±0,04)
	24	851,08 (±87,97)	0,20 (±0,02)
	36	942,90 (±256,53)	0,20 (±0,04)
	48	925,93 (±91,07)	0,21 (±0,02)
	60	814,81 (±166,73)	0,21 (±0,04)
	0	1097,22 (±149,01)	0,26 (±0,01)
40°C	12	785,49 (±150,75)	0,20 (±0,03)
	24	830,25 (±48,63)	0,17 (±0,01)
	36	1001,54 (±85,53)	0,21 (±0,01)
	48	1595,68 (±153,15)	0,34 (±0,04)
	60	1629,63 (±72,76)	0,36 (±0,02)
	72	1421,30 (±36,16)	0,40 (±0,06)