

ANTÔNIO CÉSAR BATISTA MATOS

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES DE
JACARANDÁ-DA-BAHIA (*Dalbergia nigra*) ((VELL.) FR. ALL. EX BENTH)
SOB ESTRESSE TÉRMICO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

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

T

M433a
2013 Matos, Antônio César Batista, 1984-
Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de
jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*) ((Vell.) Fr. All. Ex Benth)
sob estresse térmico / Antônio César Batista Matos. – Viçosa,
MG, 2013.
vii, 36 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Jacarandá - Semente. 2. Germinação - Efeito da
temperatura. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Engenharia Florestal. Programa de Pós-Grauação em
Ciência Florestal. II. Título.

CDO adapt. CDD 634.9181525

ANTÔNIO CÉSAR BATISTA MATOS

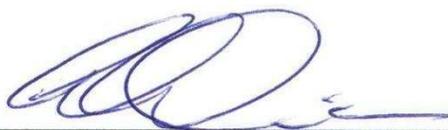
**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES DE
JACARANDÁ-DA-BAHIA (*Dalbergia nigra*) ((VELL.) FR. ALL. EX BENTH)
SOB ESTRESSE TÉRMICO**

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

APROVADA: 29 de julho de 2013.



Prof.^a Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias



Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias



Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges
(Orientador)

Aos meus pais, Antônio e Maria das Graças.

À minha irmã, Ilmara Lícia.

À minha namorada, Fernanda Lima.

Ao meu orientador, Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me proporcionar saúde para conquistar mais esta etapa na minha vida.

Aos meus pais, Antônio e Maria das Graças, pelo amor incondicional e por serem a base deste sonho.

À minha irmã Ilmara Lícia, por sempre dividir momentos inesquecíveis e pela cumplicidade.

À minha namorada, Fernanda Lima, pelo carinho, paciência, amor e incentivo para superar os diversos desafios.

Aos meus familiares, pela união e carinho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade, em especial ao Departamento de Engenharia Florestal e aos professores do DEF, por participarem da minha formação; e ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Eduardo pela disponibilidade, excelente orientação, entusiasmo e incentivo durante todo este trabalho.

À professora Denise pela participação da banca e pelas sugestões a este trabalho.

Ao professor Luiz Antônio por aceitar participar da banca e pelas sugestões a este trabalho.

Aos técnicos do LASF, principalmente ao Mauro, Leacir e Merrinho pela ajuda nas várias etapas deste trabalho.

Aos amigos e professores Amaral (UNESP), José Márcio, Anderson e Cláudio Davide (UFLA) pela primeira oportunidade cedida para trabalhar com sementes e pelo constante incentivo.

Agradeço a atenção e carinho das minhas amigas Giuliana, Ana Carla e Daniele Arriel durante a minha chegada à Viçosa e pela amizade ao longo destes anos.

Aos amigos do Gsem, principalmente aos amigos Marcelo e Laércio pela amizade e por ajudar nas análises e sugestões feitas a este trabalho.

Aos amigos do LASF, Glauciana, Paulo, Luana, Argemiro, Giovani e Lucas pela amizade e fazer deste laboratório um ótimo ambiente de trabalho.

Aos amigos de mestrado, pela amizade conquistada.

A todos, meu sincero agradecimento!

BIOGRAFIA

ANTÔNIO CÉSAR BATISTA MATOS, filho de Antônio Batista de Matos e Maria das Graças Dias Matos, nasceu na cidade de Divinópolis, Minas Gerais, em 21 de novembro de 1984.

Em novembro de 2006, ingressou na Universidade Federal de Lavras, graduando-se em Engenharia Florestal em julho de 2011.

Em março de 2012, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae* em julho de 2013, com defesa da dissertação.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAS E MÉTODOS.....	3
2.1 Material Vegetal.....	3
2.2 Determinação do grau de umidade	3
2.3 Curvas de embebição	3
2.4 Germinação	4
2.5 Condutividade elétrica.....	4
2.6 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	5
2.6.1 Ânion superóxido	5
2.6.2 Peróxido de hidrogênio	5
2.7 Determinação da atividade de enzimas antioxidativas.....	6
2.7.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos	6
2.7.2 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)	6
2.7.3 Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	7
2.7.4 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)	7
2.7.5 Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)	7
2.7.6 Determinação de proteínas	7
2.8 Análise dos dados.....	8
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
3.1 Grau de umidade	8
3.2 Curvas de embebição	8
3.3 Germinação	10
3.4 Condutividade elétrica.....	15
3.5 Análise das espécies reativas de oxigênio (EROs)	16
3.6 Análise do sistema antioxidativo enzimático.....	21
4 CONCLUSÕES	28
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

RESUMO

MATOS, Antônio César Batista, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*) ((Vell.) Fr. All. Ex Benth) sob estresse térmico.** Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

A germinação de sementes é dependente de fatores abióticos, sendo a temperatura um dos principais, influenciando de forma diversa na atividade metabólica. Dentro da faixa ideal estimula a germinação, mas, em condições extremas, causa danos às sementes. O presente trabalho teve por objetivo investigar o efeito das diferentes temperaturas durante a germinação de sementes de *Dalbergia nigra* e suas implicações sobre a fisiologia e a bioquímica das sementes. As sementes foram coletadas na região de Viçosa-MG em setembro de 2012. Avaliaram-se o percentual de germinação, a integridade de membranas, a produção de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a ação do sistema defesa antioxidativo, pela atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase (POX), em diferentes tempos de exposição às temperaturas de 5, 15, 25 (controle), 35 e 45 °C. Sob temperaturas de 5 e 45 °C a germinação é nula. A semi-permeabilidade da membrana não é recuperada nas temperaturas de 5 e 45 °C. As produções de superóxido e de peróxido de hidrogênio reduzem com a hidratação, em qualquer temperatura. Há atividades efetivas das enzimas SOD e POX em todas as temperaturas e em todos os tempos. A atividade da APX somente é detectada na fase inicial da embebição nas temperaturas de 5 e 45 °C. A atividade da CAT não é detectada após 48 horas de embebição na temperatura de 45 °C.

ABSTRACT

MATOS, Antônio César Batista, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2013. **Physiological and biochemical changes in Brazilian rosewood seeds (*Dalbergia nigra*) ((Vell.) Fr All. Ex Benth) under thermal stress.** Advisor: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

The seeds germination is abiotic factors dependent, being the temperature one of the most important, influencing differently in metabolic activity. In an ideal range, temperature stimulates germination, but in extreme conditions, causes damage to the seeds. This study aimed to investigate the different temperatures effect during the seeds germination of *Dalbergia nigra* and its implications on the seeds physiology and biochemistry. The seeds were collected in the Viçosa-MG region, in September 2012. It was evaluated the germination percentage, the membrane integrity, the superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) production, and the action of the antioxidante defence system, quantifying the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POX) in the different exposure times to temperatures of 5, 15, 25 (control), 35 and 45 °C. There was not germination at the 5 and 45 °C. The membrane semipermeability was not recovered at the 5 and 45 °C. The superoxide anion and hydrogen peroxide production reduced with the seeds rehydration in all temperatures. There is an effective activity of the enzymes SOD and POX in all temperatures and times evaluated. The activity of APX just is detected in the initial phase of imbibition at the 5 and 45 °C. The CAT activity is not detected after 48 hours of imbibition at the 45 °C.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a taxa de desmatamento nos trópicos tem diminuído, mas ainda merece um alerta. Segundo relatório da FAO (FAO, 2010), durante a década de 1990 o desmatamento de florestas tropicais foi de aproximadamente 16 milhões de hectares por ano e de 13 milhões de hectares na década seguinte, pela conversão de áreas florestais para a agricultura, infraestrutura ou por desastres naturais. O Brasil foi responsável por devastar 2,64 milhões de hectares por ano durante os últimos 10 anos. A intensa exploração e ocupação das áreas florestais no Brasil, principalmente do domínio Atlântico, resultaram na fragmentação florestal. Os remanescentes florestais são historicamente degradados por ação antrópica decorrentes da extração de madeira, intenso cultivo agrícola, invasão de gado, incêndios e caça (Tabarelli et al., 2005; Ribeiro et al., 2009). Entretanto, a crescente conscientização ambiental e maior esclarecimento sobre as leis que regulamentam as florestas de proteção resultaram em maior incentivo para programas de recomposição ambiental (Nascimento et al., 2012).

Desta forma, a demanda por mudas de espécies florestais nativas tem sido crescente. Como a maioria delas é propagada via semente, é fundamental o conhecimento a respeito da fisiologia das mesmas, sendo que para cada espécie são necessárias condições ambientais específicas para garantir a germinação (Araújo Neto et al., 2003; Rego et al., 2009). Para temperatura, por exemplo, a faixa de adaptação ambiental está relacionada com as temperaturas cardinais (mínima, ótima e máxima) que cada espécie requer para conseguir germinar. Assim, essas amplitudes térmicas determinam os limites de distribuição das espécies e são compatíveis com as suas taxas de germinação e crescimento (Orozco-Almanza et al., 2003; Borghetti, 2005; Oliveira & Garcia, 2005; Bewley et al., 2013). Principalmente, com relação as sementes de espécies florestais, a faixa térmica adequada de germinação está frequentemente entre 20 e 30 °C (Santos et al., 2004; Mello & Barbedo, 2007; Stockman et al., 2007; Coelho et al., 2008; Cardoso & Pereira, 2009; Pires et al., 2009; Brancalion et al., 2010; Pimenta et al., 2010; Dousseau et al., 2013).

O início do processo de germinação se dá pela absorção de água pela semente e termina com o alongamento do eixo embrionário e protrusão da radícula. Este processo envolve uma série de atividades metabólicas, que são orientadas por uma sequência de reações químicas, sendo estas reações dependentes da temperatura, principalmente para garantir o funcionamento adequado de sistemas enzimáticos específicos (Bewley et al., 2013).

Sob condições de estresses abióticos como a seca, salinidade, inundações, altas e baixas temperaturas tem-se a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são formas reduzidas do oxigênio molecular (O_2), extremamente reativas e que podem causar danos oxidativos a diversos componentes celulares, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomos, parede celular e apoplasto. Esses incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e o oxigênio “singlete” ($O^$) (Mittler, 2002). Também podem ter duplo papel nas plantas, seja como subproduto tóxico do metabolismo bem como reguladoras de vários processos biológicos, tais como crescimento, ciclo celular, sinalização hormonal, respostas a estresses bióticos e abióticos e morte celular programada (Foyer e Noctor, 2005; Fujita et al., 2006; Mittler et al., 2004).

Em sementes ortodoxas, o teor de água é elevado durante as fases iniciais de desenvolvimento e, ao longo do tempo, ocorrem variações nesse conteúdo até sofrer perdas drásticas de água na fase de maturação (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008). Assim, ocorrem variações também na produção de EROs desde o início da embriogênese até o fim da germinação, dependendo também dos diferentes tecidos e níveis de hidratação das células das sementes (Bailly, 2008). Esses danos oxidativos podem ser atenuados pela ação de enzimas responsáveis pela eliminação das EROs, como dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidases (POX) (Mittler et al., 2004; Gill e Tuteja, 2010). Assim, para manter os níveis homeostáticos das EROs nas células é necessário que estas enzimas atuem de forma conjunta e integrada (Mittler, 2002).

Dalbergia nigra, também conhecida como jacarandá-da-bahia, jacarandá-caviúna ou jacarandá-preto, é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae, subfamília Faboideae. No Brasil, tem ocorrência nos estados de MG, BA, ES, RJ e SP, principalmente em áreas de fitofisionomias do Domínio Atlântico, mas também pode ser encontrada em áreas do Domínio do Cerrado. Seu status de conservação é considerado ocasional (Carvalho, 2003; Oliveira-Filho, 2006). É indicada como espécie para programas de recuperação de áreas degradadas, devido a sua alta regeneração e adaptação em terrenos de baixa fertilidade, e também pelo alto potencial para o manejo florestal sustentável, principalmente pela facilidade de comercialização da madeira de alta qualidade. Devido à intensa exploração e a falta de programas de reflorestamento com a espécie, desde 1998 está listada como vulnerável na Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2013), e com proibição do seu

comércio desde a década de 1990 (CITES, 2008). Está incluída também na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (IBAMA, 2008).

Pesquisas a respeito dos aspectos fisiológicos e bioquímicos durante a germinação de sementes de espécies tropicais sob condições de estresses abióticos, especialmente estresse térmico, se tornam de grande relevância frente às adversidades ambientais encontradas nos ecossistemas tropicais, e também pela escassez de informações sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na tolerância de sementes a determinados níveis de estresse. Diante disso, é importante o estudo da influência de diferentes temperaturas, especialmente aquelas fora da faixa ótima de germinação, no processo germinativo e na produção de substâncias produzidas pelo estresse térmico, que podem resultar na perda de qualidade ou na morte das sementes.

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a germinação de sementes de *Dalbergia nigra* sob condições de estresse térmico e, como objetivos específicos, avaliar a viabilidade das sementes após exposição em diferentes temperaturas, examinar a condutividade elétrica, a produção de espécies reativas de oxigênio e a atividade das enzimas do sistema antioxidante durante a germinação sob estresse térmico.

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

As sementes foram coletadas em setembro de 2012 na região de Viçosa - MG, beneficiadas e armazenadas em câmara fria (5 °C/60% umidade relativa-UR). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.2 Determinação do grau de umidade

O grau de umidade foi determinado pelo método de estufa a 105 °C±3 °C por 24 horas (Brasil, 2009), sendo utilizadas três repetições de 20 sementes. O cálculo foi feito na base úmida, sendo o grau de umidade expresso em porcentagem.

2.3 Curvas de embebição

A porcentagem de ganho de água (%) foi calculada em relação ao peso inicial das sementes de cada tratamento. Antes de iniciar a embebição, as sementes foram pesadas em balança digital com precisão de 0,0001 g e, em seguida, foram colocadas

para embeber em placa de petri, forrada com duas folhas de papel de filtro, umedecidas com 4,0 mL em água destilada, e mantidas sob luz constante, nas temperaturas de 5, 15, 25, 35 e 45 °C. As sementes foram pesadas em intervalos de duas horas durante as primeiras 12 horas e, após, em intervalos de 12 horas até que atingissem 50% de germinação ou até o 10º dia após o início da embebição. Antes de cada pesagem, as sementes foram secas superficialmente com papel absorvente e, em seguida, recolocadas em placas de petri com papel umedecido com água destilada. Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes.

2.4 Germinação

Primeiramente as sementes foram imersas em solução de Captan® 0,5%, por três minutos e, em seguida, foram dispostas sobre duas folhas de papel umedecidas com água, em placas de petri, e mantidas em germinador do tipo BOD, nas temperaturas de 5, 15, 25, 35 e 45 °C sob luz constante durante 12 dias. Paralelamente, foi estabelecido outro experimento de germinação para analisar o tempo de tolerância das sementes às diferentes temperaturas. Assim, as sementes foram incubadas por 24, 48, 72 e 96 h para as temperaturas de 5 e 15 °C; e por 8, 16 e 24 h para as temperaturas de 35 e 45 °C. Após estes períodos, foram transferidas para o germinador, a 25 °C, sob luz constante, pois esta temperatura é considerada ideal para germinação da espécie (Ferraz-Grande e Takaki, 2001). Estes períodos foram considerados para a duração total do teste de germinação, que totalizaram 12 dias. Foram feitas avaliações diárias, tendo como critério de germinação a emissão de radícula. Para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962): $IVG = \sum \left(\frac{n_i}{t_i} \right)$, onde n_i é o número de sementes por dia e t_i é o tempo (dias). Cada tratamento (temperatura) foi constituído de cinco repetições de 20 sementes.

2.5 Condutividade elétrica

Para o teste de condutividade elétrica (CE), as sementes, sem danos aparentes, foram pesadas em balança eletrônica de precisão 0,0001 g e foram dispostas sobre duas folhas de papel umedecidas com água, em placas de petri, e mantidas em germinador do tipo BOD nas temperaturas de 5, 15, 25, 35 e 45 °C sob luz constante, e mantidas por 24, 72 e 120 horas de embebição em cada uma das temperaturas. Em seguida, foram colocadas em copo plástico contendo 75 mL de água destilada a 25 °C, por 24 horas (Marques et al., 2002). A CE do lixiviado foi determinada utilizando-se condutivímetro

MICRONAL, modelo B 330, eletrodo com constante 1.0 e o resultado expresso em $\text{mS cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

2.6 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O efeito da temperatura na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliado comparando-se as produções durante a germinação. As análises foram realizadas em eixos embrionários de sementes que foram embebidas por 0 (sementes secas), 24, 72 e 120 horas sob as temperaturas de 5, 15, 25 e 35 °C, e por 8, 24 e 48 horas para a temperatura de 45 °C. Para as análises das produções de EROs, as sementes foram colocadas nas mesmas condições do teste de germinação.

2.6.1 Ânion superóxido

Amostras de 20 eixos embrionários foram pesadas em balança de precisão 0,0001g e cortadas ao meio no sentido transversal em dois segmentos e incubadas em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (Na_2EDTA) 100 μM , β -nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) 20 μM e tampão de fosfato de sódio 20mM, pH 7,8 (Mohammadi & Karr, 2001) em tubos, tipo “penicilina”, hermeticamente fechados. A reação foi iniciada pela introdução de 100 μL de epinefrina 25,2mM em HCl 0,1N, utilizando-se seringa cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28 °C, permanecendo em agitação, por 5 min. Depois disso, os segmentos foram removidos e, a partir do sétimo minuto, iniciou-se a leitura da absorvância em 480 nm, em espectrofotômetro, durante cinco minutos. O branco foi realizado sob as mesmas condições, mas sem tecido vegetal. A produção de ânion superóxido foi avaliada pela determinação da quantidade de adenocromo acumulado (Misra & Fridovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Boveris, 1984).

2.6.2 Peróxido de hidrogênio

Amostras de 20 eixos embrionários foram pesadas em balança de precisão 0,0001g, trituradas em nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizadas em 2,0mL de tampão fosfato de potássio 50mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1mM, seguido de centrifugação a 10.000 g, por 15min, 4 °C, e coletado o sobrenadante (Kuo & Kao, 2003).

Alíquotas de 100 μL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal 250 μM , ácido sulfúrico 25mM, laranja de

xilenol 250 μ M e sorbitol 100mM, em volume final de 2mL (Gay & Gebicki, 2000), homogeneizadas e mantidas no escuro por 30 min. A determinação da absorvância foi feita em espectrofotômetro, em 560 nm, e a quantificação de H₂O₂ foi realizada com base em curva de calibração, utilizando-se de concentrações de peróxido como padrão. Brancos para os reagentes e os extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra.

2.7 Determinação da atividade de enzimas antioxidativas

O efeito da temperatura nas atividades das enzimas dismutase do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase foi avaliado comparando-se as atividades durante a germinação. As análises foram realizadas em eixos embrionários de sementes que foram embebidas por 0 (sementes secas), 24, 72 e 120 horas sob as temperaturas de 5, 15, 25 e 35 °C, e por 8, 24 e 48 horas sob a temperatura de 45 °C. Para as análises das atividades das enzimas, as sementes foram colocadas nas mesmas condições do teste de germinação.

2.7.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos

Os extratos enzimáticos foram obtidos pela homogeneização de amostras de 0,1 g de eixos embrionários na presença de 2mL de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato bruto na determinação das atividades enzimáticas, avaliadas em quatro repetições de cada tratamento.

2.7.2 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da dismutase do superóxido foi determinada pela adição de 50 μ L do extrato enzimático bruto a 2,95mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,8, contendo metionina 13mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μ M, EDTA 5mM e riboflavina 2 μ M (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C, sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após cinco minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro pela absorvância em 560 nm. A absorvância em 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por

igual período, serviu de branco e foi subtraído da amostra que recebeu iluminação (Giannopolis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

2.7.3 Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 30 μ L do extrato enzimático bruto a 2,97mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância a 240nm, à temperatura de 25 °C foi medido até o segundo minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e o resultado expresso em μ mol/min/mg de proteína.

2.7.4 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada pela adição de 150 μ L do extrato enzimático bruto a 2,85mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8mM e H₂O₂ 1mM. O decréscimo na absorvância a 290nm, a 25 °C, foi medido até o segundo minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano e Asada, 1981; Koshiba, 1993), e o resultado expresso em μ mol/min/mg de proteína.

2.7.5 Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 30 μ L do extrato enzimático bruto a 2,97mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25mM, pH 6,8, pirogallol 20mM e H₂O₂ 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância em 420nm, em espectrofotômetro, a 25 °C, até o segundo minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1995) e expressa em μ mol/min/mg de proteína.

2.7.6 Determinação de proteínas

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

2.8 Análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância - ANOVA (SAS, 2009). O delineamento experimental para a condutividade foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5 (três tempos de embebição e cinco temperaturas). Os dados de germinação e de condutividade elétrica foram submetidos à análise de regressão. Os modelos das regressões foram escolhidos com base na lógica biológica, na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste t a 5% de probabilidade, e no coeficiente de determinação. Para o índice de velocidade de germinação, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os gráficos foram confeccionados com auxílio do software Sigmaplot 11.0. O coeficiente de correlação simples de Pearson (r) também foi calculado para as variáveis analisadas em cada temperatura. A significância dos valores para "r" foi determinada pelo teste t de 1 e 5% de probabilidade. O processamento de dados foi realizado utilizando o software SAS (Delwiche; Slaughter, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Grau de umidade

As sementes de *Dalbergia nigra* foram dispersas com reduzido grau de umidade (8,86%). Trabalhando com sementes de *D. nigra*, Ataíde et al. (2013) encontraram valores similares de grau de umidade para dois lotes de sementes (7,92% para o lote I e 8,98% para o lote II) também na região de Viçosa-MG. Esta baixa umidade em sementes ortodoxas, como no caso do jacarandá-da-bahia (AGUIAR et al. 2010), permite mantê-las viáveis por longo período de tempo. Além disso, mesmo neste estado desidratado as sementes podem tolerar os diversos estresses ambientais e, quando fornecidas as condições ideais à germinação, elas retomarão as atividades metabólicas (Castro et al., 2004).

3.2 Curvas de embebição

De acordo com as curvas de embebição de sementes de *D. nigra*, a temperatura estimulou a velocidade de absorção de água, cujo ganho de peso das sementes foi incrementado pelo aumento da temperatura, principalmente durante a fase I (Figura 1).

O principal fator que determina o passo inicial para a germinação de sementes viáveis e não dormentes é a disponibilidade de água para a embebição (Bewley et al.

2013). Ainda de acordo com estes autores, sob condições ideais de suprimento hídrico, a absorção de água pelas sementes apresenta padrão trifásico. Em geral, a fase I é rápida, sendo determinada pela diferença acentuada entre os potenciais hídricos da semente e o do meio, o que determina o fluxo de água do ambiente para a semente. Sementes secas apresentam potenciais hídricos muito baixos. Assim, a embebição da fase I é considerada um processo físico essencial para reativação do metabolismo pela semente. Outro fator que influencia a velocidade de absorção de água pelas sementes é a temperatura. O aumento da temperatura torna a água mais fluida e com maior energia cinética, facilitando a sua movimentação do meio para as sementes, com consequente aumento da embebição e da velocidade das reações do metabolismo (Bewley et al., 2013).

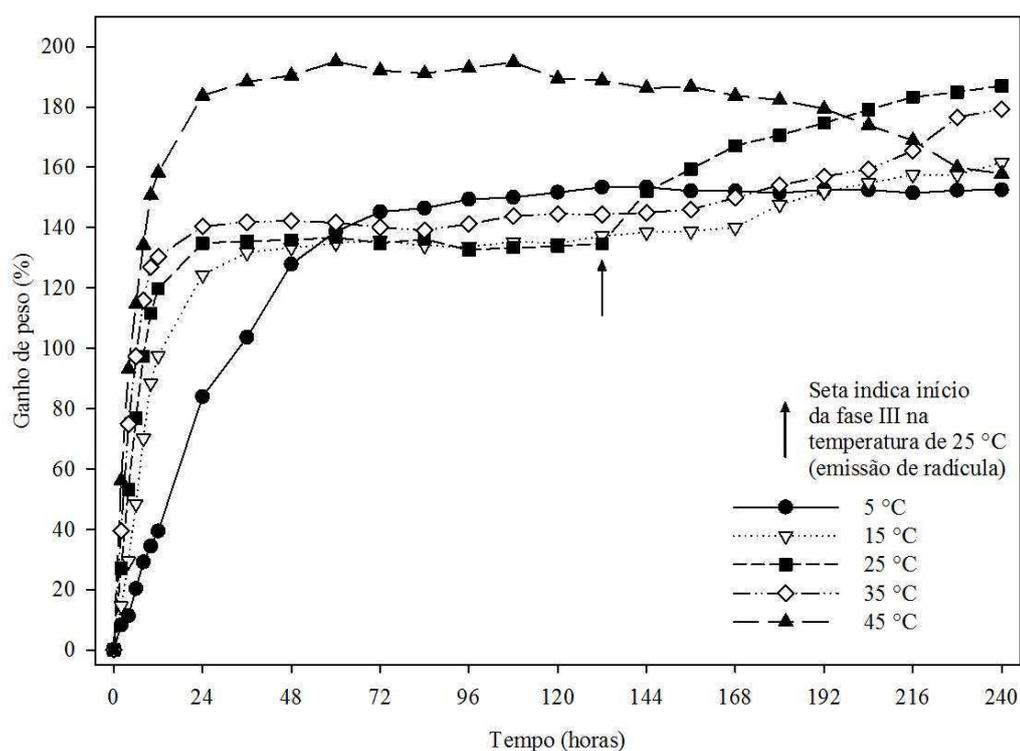


Figura 1. Curvas de embebição de sementes de *Dalbergia nigra* em diferentes temperaturas.

O ganho de peso na temperatura de 5 °C foi de aproximadamente de 140 % nas primeiras 72 horas, caracterizando a fase I, porém, esta temperatura, entre as testadas, foi a que proporcionou menor velocidade de absorção de água. As sementes permaneceram na fase II até fim do período observado.

A embebição de sementes em baixas temperaturas tem efeito prejudicial para a integridade de membrana, pois causa rápida transição entre as duas fases estruturais, do

estado de gel (bicamada seca) para o estado cristalino líquido (bicamada hidratada), resultando em danos irreparáveis às membranas e lixiviação de solutos (Castro et al. 2004). Além disso, a viscosidade é uma propriedade da água diretamente relacionada com a temperatura, cujos estudos realizados por Bello et al. (2004) e Khazaei e Mohammadi (2009) a respeito cinética de absorção de água de sementes demonstraram que a absorção de água aumenta com o aumento da temperatura.

Para a temperatura de 15 °C, observou-se que foram necessárias 36 horas para caracterizar a embebição das sementes na fase I, alcançando cerca de 125% de ganho de peso, permanecendo na fase II durante o restante do período observado. Para as temperaturas de 35 e 45 °C foram necessárias 24 horas para atingir o fim da fase I e nestas temperaturas as sementes tiveram os maiores ganhos de peso, 140 e 180%, respectivamente. Ambas permaneceram na fase II até o fim do período observado. Porém, observou-se o início da deterioração das sementes para a temperatura de 45 °C ao longo do tempo. Altas temperaturas podem permitir a embebição das sementes, porém não garantem a expansão do embrião e o estabelecimento da plântula (Matheus e Lopes, 2009).

Para a temperatura de 25 °C pode-se observar o padrão trifásico de embebição, sendo necessárias 24 horas para a fase I, 108 horas para a fase II e após 132 horas é que as sementes atingiram a fase III. Este resultado está de acordo com Ferraz-Grande e Takaki (2001), que determinaram a faixa térmica entre 25 e 30 °C como ideal para germinação da espécie.

3.3 Germinação

Os efeitos significativos das temperaturas na germinação de sementes de *Dalbergia nigra* podem ser observados nas Figuras 2 (porcentagem de germinação) e 3 (IVG), demonstrados nas curvas de regressão. Na temperatura de 25 °C verifica-se o percentual médio máximo de germinação (92%) durante o período de 10 dias, sendo assim, considerada a temperatura ideal para germinação da espécie. Resultado que confirma o experimento de Ferraz-Grande e Takaki (2001).

Para a temperatura de 5 °C não houve germinação durante o período de observação (Figura 2A). Porém, ao reduzir os tempos de exposição nesta temperatura e transferindo posteriormente as sementes para a temperatura de 25 °C, observa-se que as sementes de *D. nigra* toleram a exposição à temperatura de 5 °C por até 72 horas, não sendo observada germinação em 96 horas. A porcentagem média de germinação foi de 54, 46 e 26% para 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Para a característica IVG,

observa-se o mesmo comportamento visto nas porcentagens de germinação. Assim, quanto maior o tempo de exposição das sementes à temperatura de 5 °C, menor o valor para IVG, sendo estatisticamente diferentes entre os tempos de exposição e a condição ideal de 25 °C (Figura 3A).

Socolowski e Takaki (2004) e Simão e Takaki (2008) não observaram germinação de sementes de *Jacaranda mimosifolia* e *Tibouchina mutabilis*, respectivamente, em temperaturas abaixo de 15 °C, enquanto Matheus e Lopes (2009) e Lemes e Lopes (2012) encontraram resultados semelhantes com sementes de *Erythrina variegata* e *Ceiba speciosa* em temperatura abaixo de 12 °C e de 5 °C, respectivamente.

Em relação à temperatura de 15 °C, as sementes de *D. nigra* atingiram percentual médio de 6% de germinação (Figura 2B). Nesta temperatura as sementes toleram maiores períodos de exposição, atingindo até 69% de germinação em 96 horas. Ao serem transferidas para a temperatura de 25 °C após 24, 48 e 72 horas alcançam 91, 90 e 80% de germinação, respectivamente. Para a característica IVG, observa-se também o mesmo comportamento ocorrido para a germinação, apresentando valores menores de IVG com o aumento do tempo de exposição à temperatura de 15 °C, sendo estatisticamente diferentes entre os tempos de exposição e a condição ideal de 25 °C (Figura 3B).

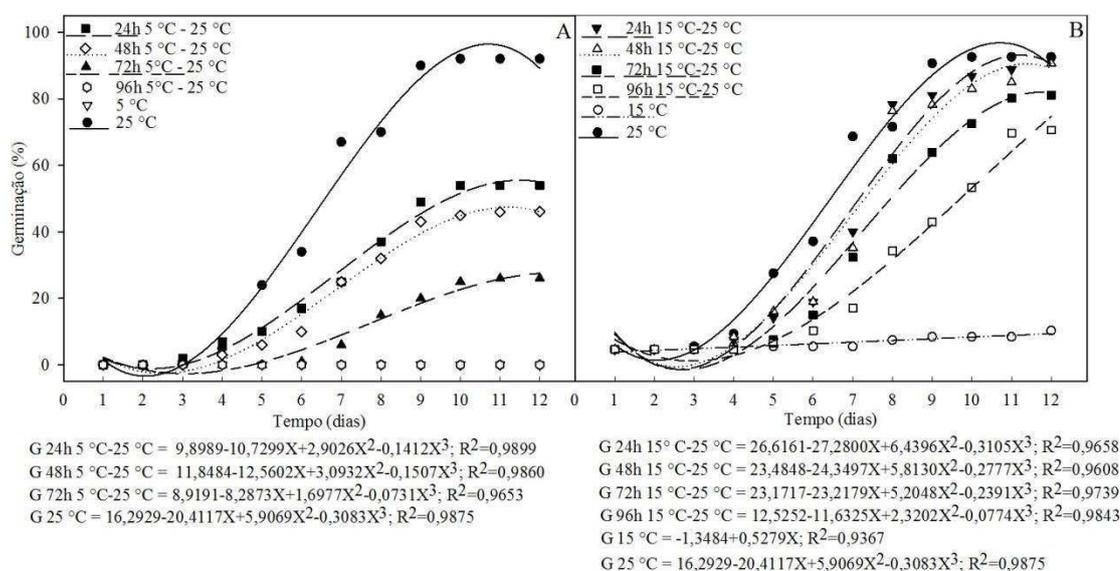
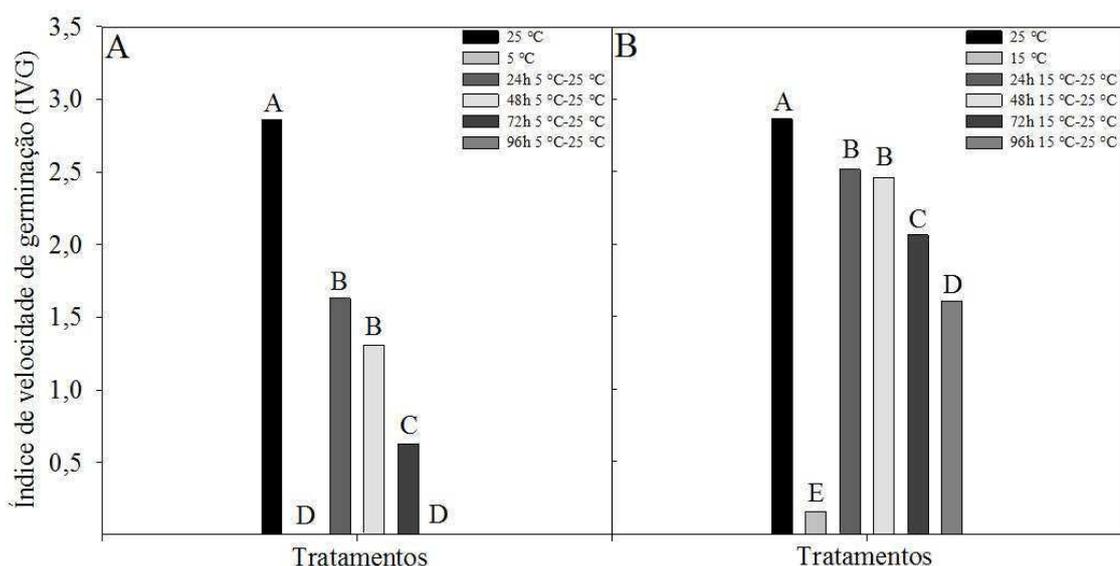


Figura 2. Curvas de germinação de sementes de *Dalbergia nigra* submetidas a diferentes períodos de exposição às temperaturas de 5 °C (A) e 15 °C (B), sendo recondicionadas posteriormente à temperatura de 25 °C após 24, 48, 72 e 96 horas. Ajuste de regressão significativo quando $p < 0,05$.



Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Figura 3. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Dalbergia nigra* submetidas a diferentes períodos de exposição às temperaturas de 5 °C (A) e 15 °C (B), sendo recondicionadas posteriormente à temperatura de 25 °C.

Verificou-se porcentagem média de 38% de germinação para a temperatura de 35 °C (Figura 4A). As porcentagens de germinação foram de 97, 93 e 84% para tempos de 8, 16 e 24 horas, respectivamente. Observou-se para o IVG o mesmo comportamento ocorrido para a germinação, apresentando valores menores de IVG com o aumento do tempo de exposição à temperatura de 35 °C, sendo estatisticamente diferentes entre os tempos de exposição, mas nestas condições de curtos tempos de exposição à temperatura de 35 °C não houve diferença estatística quando comparados com a condição ideal de 25 °C (Figura 5A). Assim, tanto para germinação quanto para IVG sob curtos períodos de tempo, nota-se um incremento de ambos os parâmetros avaliados na temperatura de 35 °C.

Já para a temperatura de 45 °C, não houve germinação de sementes de *D. nigra* quando incubadas por períodos iguais ou superiores a 24 horas de exposição (Figura 4B). Porém, para os tempos de exposição de 8 e 16 horas ainda foram encontradas porcentagem de germinação de 58 e 6% de germinação, respectivamente. Para a característica IVG, observou-se também o mesmo comportamento ocorrido para a germinação, apresentando valores menores de IVG com o aumento do tempo de exposição à temperatura de 45 °C, sendo estatisticamente diferentes entre os tempos de

exposição e a condição ideal de 25 °C (Figura 5B). Mesmo sob exposição a curtos períodos de tempo à temperatura de 45 °C observou-se que já é suficiente para iniciar o processo de deterioração das sementes. Para todas as condições de temperaturas testadas, quanto maior o tempo de exposição a essas temperaturas, menores porcentagens médias de germinação foram encontradas.

Estudando o efeito da temperatura e do tempo de exposição em tratamentos de choque térmico em sementes de *Cajanus cajan*, Rao et al. (2002) encontraram resultados semelhantes aos deste trabalho, em que o aumento da temperatura e do tempo de exposição afetaram negativamente a germinação. Resultados similares também foram encontrados por Corbineau et al., (2002), que verificaram que o aumento do tempo de exposição de sementes de *Helianthus annuus* à temperatura de 45 °C diminui a porcentagem de germinação.

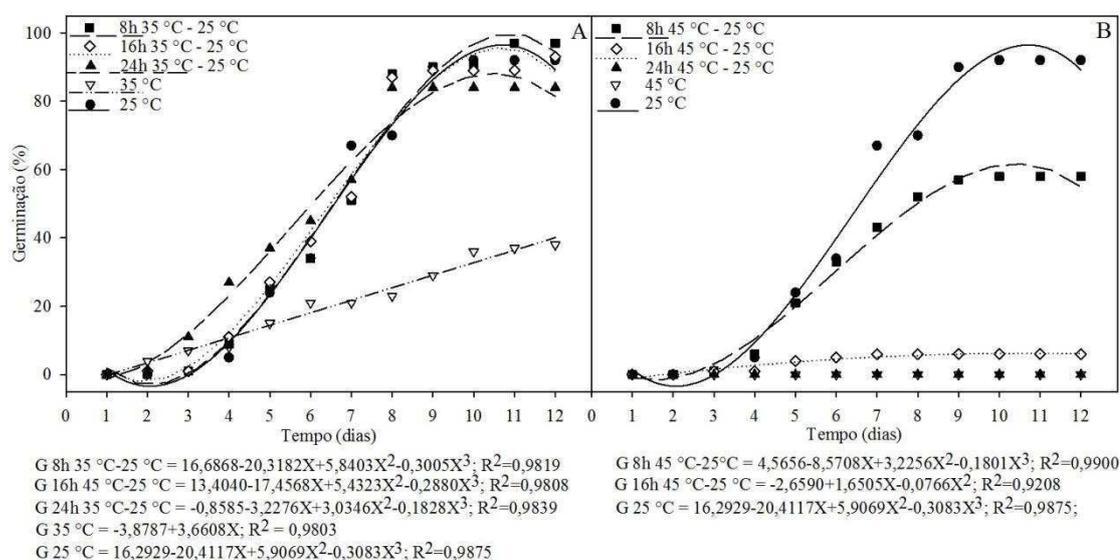
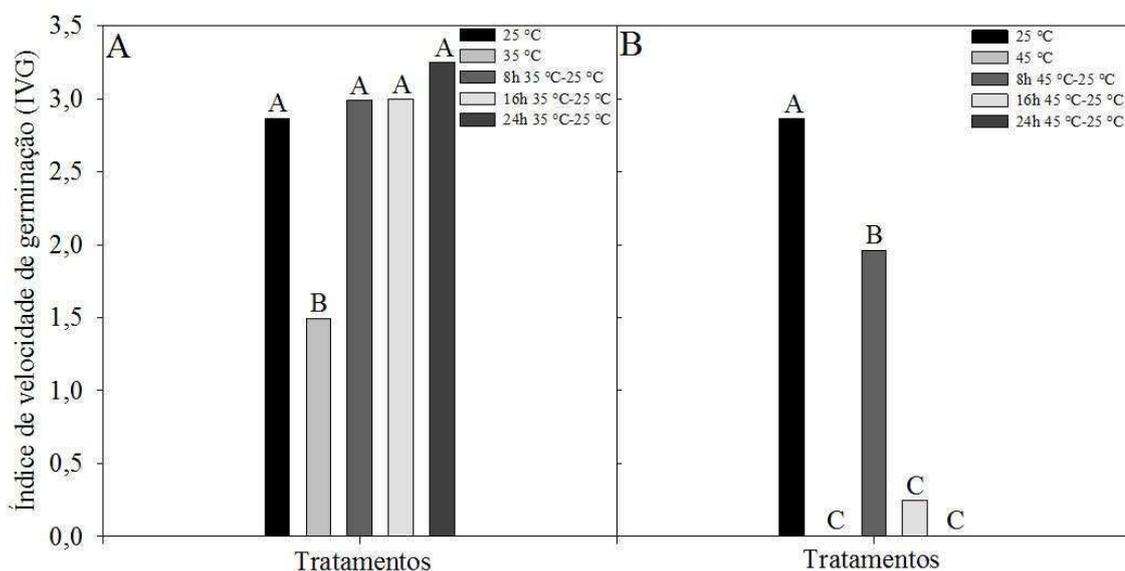


Figura 4. Curvas de germinação de sementes de *Dalbergia nigra* submetidas a diferentes períodos de exposição à temperaturas de 35 °C (A) e 45 °C (B), sendo recondicionadas posteriormente à temperatura de 25 °C após 8, 16 e 24 horas. Ajuste de regressão significativo quando $p < 0,05$.



Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Figura 5. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Dalbergia nigra* submetidas a diferentes períodos de exposição às temperaturas de 35 °C (A) e 45 °C (B), sendo recondicionadas posteriormente à temperatura de 25 °C.

Segundo Marcos Filho (2005), quanto mais breve for o tempo de exposição a essas temperaturas, os efeitos também serão pouco acentuados. Almeida et al., (2005), trabalhando com sementes de *Pinus caribaea*, *P. elliotti* e *P. taeda* observaram que a germinação média das sementes diminuiu com o aumento da intensidade do calor e do tempo de exposição.

O processo de germinação é complexo e envolve diferentes rotas metabólicas e enzimas, que são estimuladas diferentemente por diferentes temperaturas. A atividade da alfa-galactosidase, por exemplo, que participa da mobilização de reserva da parede celular, estudada em sementes de *Platymiscium pubecens* por Borges et al. (2004) foi mais estimulada pela temperatura de 55 °C, tanto no eixo embrionário, quanto nos cotilédones. Por outro lado, em sementes de *Dalbergia nigra*, Carrijo et al. (2011) verificaram que a temperatura de 50 °C foi mais estimulante para a mesma enzima nos cotilédones, enquanto a do eixo embrionário se situou na faixa 50-60 °C. Ao quantificar a atividade da enzima desidrogenase da glucose-6-fosfato, presente na rota da glicólise, em sementes de *Oryza sativa*, Marini et al. (2013) verificaram que era maior nas sementes mantidas em 15, 30 e 35 °C, sem diferenças significativas entre elas, embora as sementes perdessem vigor em temperatura superior a 25 °C. A respiração das

sementes apresentou a mesma tendência. Dessa forma, é possível supor que há perda do controle na regulação entre os diferentes mecanismos nas sementes em deterioração por efeito da temperatura. Independente de algumas rotas ou enzimas estarem atuantes, o aumento da respiração indica desacoplamento da fosforilação oxidativa da cadeia de transporte de elétrons, com conseqüente redução da produção de ATP e morte das sementes, o que poderia estar ocorrendo com as sementes de *D. nigra* no presente estudo.

3.4 Condutividade elétrica

O teste de condutividade elétrica baseia-se na quantificação dos exsudatos de células de sementes embebidas, devido à desorganização das membranas, cujos valores serão menores, quanto maior a qualidade fisiológica das sementes. Houve interação significativa entre a temperatura e o tempo para a condutividade elétrica (CE) (Figura 6). Foram verificados maiores valores de CE para as temperaturas de 5 e 45 °C e em períodos mais curtos da embebição.

Para a temperatura de 5 °C, foi encontrado alto valor de CE até as primeiras 24 horas de embebição, o que é explicado pelo efeito da baixa temperatura na redução da semi-permeabilidade das membranas, resultado da presença de ácidos graxos saturados, o que caracteriza o estado gel. Quando as sementes são embebidas, a entrada de água ocorre antes de haver a transição das membranas para o estado líquido cristalino, ocasionando o extravasamento de solutos celulares. Yin et al. (2009) estudando danos por baixa temperatura em eixos embrionários de sementes de soja concluíram que quanto mais baixa a temperatura de embebição das sementes maior foi a liberação de lixiviados das células nas primeiras horas de embebição.

Sob alta temperatura, a semipermeabilidade é perdida pela incapacidade de recuperação das funções das membranas pela incompleta desorganização da bicamada lipo-protéica (Corbineau et al 2002; Rao et al., 2002). Wang et al. (2012) estudando sementes de soja sob condições de alta temperatura e umidade encontram resultados semelhantes. Com o aumento do tempo de exposição a esta condição houve incremento da condutividade elétrica, enquanto que para sementes sem estresse a condutividade elétrica se manteve constante ao longo do tempo.

Para as temperaturas de 15, 25 e 35 °C, foram observados os menores valores de CE, indicando que nestas temperaturas ocorre maior estabilidade térmica das membranas, sendo estas mais próximas das condições ideais de germinação para a espécie.

Para o fator tempo, o comportamento foi linear negativo, indicando que para os maiores tempos de embebição, independente da temperatura, foram encontrados os menores valores de CE. Estes resultados indicam que ao longo do tempo de embebição ocorre a organização das membranas, capaz de reduzir a perda de constituintes celulares. Flores (2011) também observou valores altos de CE durante as primeiras horas de embebição de sementes de *Melanoxylon brauna* em temperaturas extremas (5 e 45 °C).

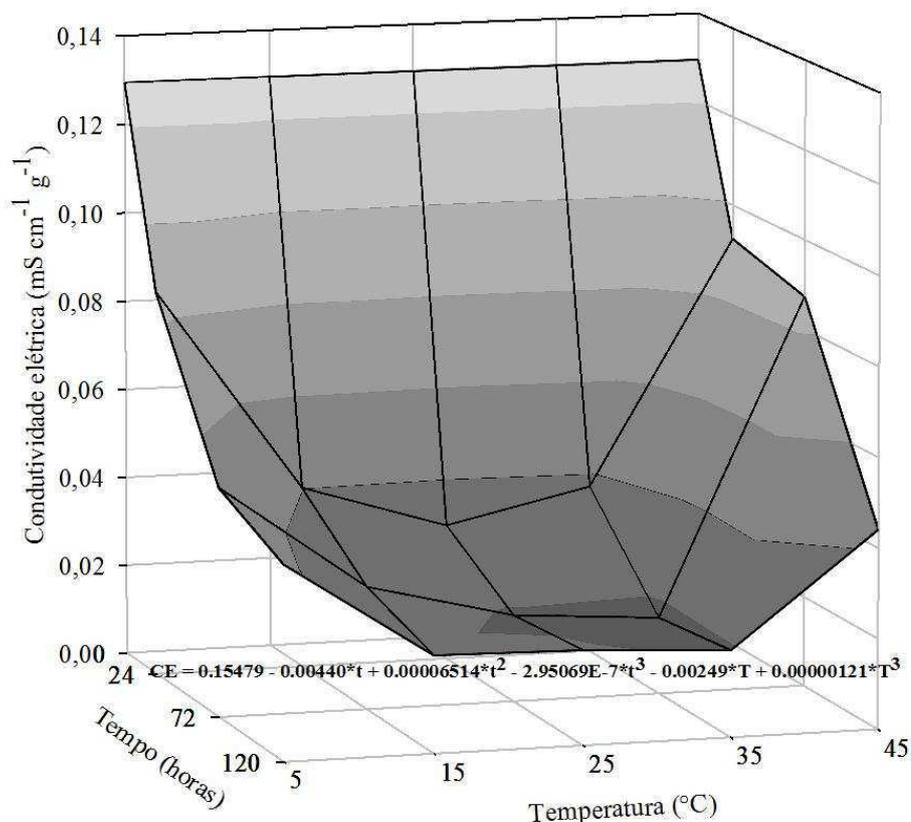


Figura 6. Condutividade elétrica de sementes de *Dalbergia nigra* submetidas a diferentes temperaturas e tempos de exposição. Onde CE: condutividade elétrica ($\text{mS cm}^{-1} \text{g}^{-1}$), t: tempo de embebição (horas) e T: temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Ajuste de regressão significativo quando $p < 0,05$.

3.5 Análise das espécies reativas de oxigênio (EROs)

O balanço entre a produção de EROs e a capacidade de remoção destas pelo sistema de defesa indica a resposta das plantas ao estresse e reflete na adaptação e/ou tolerância aos diferentes tipos de condições ambientais (Mittler, 2002; Apel e Hirt, 2004). O radical O_2^- forma o radical hidroxila (OH^{\cdot}), considerado o mais potente causador de danos oxidativos em células, sendo capaz de danificar várias

macromoléculas celulares (Scandalios, 1993). Além disso, pode levar a morte celular quando não existir sistema de defesa antioxidante específico para sua remoção (Gill e Tuteja, 2010). Ainda de acordo com estes autores, o acúmulo de H_2O_2 nas células pode causar danos ao metabolismo celular, já que este composto tem capacidade de oxidar os grupos tiol (-SH) de enzimas, inativando-as.

Detectou-se a produção de O_2^- e H_2O_2 em eixos embrionários de sementes secas de *D. nigra* (Figura 7). Em sementes secas, a presença de EROs pode ter origem a partir de reações não enzimáticas, como a peroxidação de lipídios e das reações de Amadori e Maillard, já que a atividade de enzimas provavelmente seja reduzida nesta condição (Sun e Leopold, 1995; McDonald, 1999; Murthy e Sun, 2000; Murthy et al., 2003). Pukacka e Ratajczak (2007) também encontraram produção de peróxido de hidrogênio em sementes secas de *Fagus sylvatica*. Porém, as EROs podem ser sinalizadoras de vários processos biológicos, tais como crescimento, ciclo celular, sinalização hormonal, respostas a estresses bióticos e abióticos, morte celular programada (Bailly, 2004; Mittler et al., 2004; Foyer e Noctor, 2005; Fujita et al., 2006) e redução dos níveis de dormência (Oracz et al., 2007). Assim, desempenham papel chave no processo de germinação das sementes (El-Maarouf-Bouteau. Et al., 2008).

Entretanto, com o início da embebição houve diminuição da produção de O_2^- e H_2O_2 para todas as temperaturas avaliadas. Para a temperatura de 5 °C foi verificado redução na produção O_2^- até 24 horas de embebição, quando comparado com o valor da semente seca. Observou-se aumentos de 42 e 104 % na produção de O_2^- nos tempos de 24 até 72 horas de embebição, respectivamente, diminuindo, em média, sete vezes após 120 horas quando comparado com a produção de O_2^- nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 7A).

Com relação à produção de peróxido de hidrogênio, para a temperatura de 5 °C também foi verificado redução na produção deste radical livre até 24 horas de embebição, quando comparado com o valor da semente seca. Observou-se aumento de 25 %, redução de 7 % e novo aumento de 63 % na produção de H_2O_2 nas temperaturas de 24, 72 e 120 horas de embebição, respectivamente, quando comparado com a produção de H_2O_2 nos respectivos tempos a 25 °C (Figura 7D). O'Kane et al. (1996) verificaram que a produção de H_2O_2 em calos de plantas de *Arabidopsis thaliana* foi maior a 4 °C do que a 23 °C. Resultados semelhantes foram encontrados por Sun et al. (2010), que observaram acúmulo de H_2O_2 em tecido foliares sob condições de baixas temperaturas em plântulas de *Nicotiana tabacum*.

A conversão do O_2^- para o H_2O_2 é o caminho natural para remoção de ambas as substâncias, por ser este menos tóxico que o primeiro, além da possibilidade de ser retirado do local de produção. Observou-se que somente após 120 horas de embebição sob temperatura de 5 °C é que a conversão O_2^- para o H_2O_2 foi efetivada (Figuras 7A e 7D).

Para a temperatura de 15 °C, verificou-se redução na produção de O_2^- até 24 horas de embebição, quando comparado com o valor da semente seca. Observou-se aumento de 8 % em 24 horas de embebição, redução de 97 % em 72 horas de embebição e redução de nove vezes na produção de O_2^- até 120 horas de embebição, quando comparado com a produção de O_2^- nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 7B).

Verificou-se redução na produção de H_2O_2 , sob a temperatura de 15 °C até 24 horas de embebição, quando comparado com o valor da semente seca. Observou-se aumentos de 35, 9 e 20% nos tempos de 24, 72 e 120 horas de embebição, respectivamente, quando comparado com a produção de H_2O_2 nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 7E).

Para a temperatura de 35 °C também foi observado redução da produção de O_2^- até 24 horas de embebição, quando comparado com o valor de semente seca. Observou-se aumentos de 19, 90 e 10% nos tempos de 24, 72 e 120 horas de embebição, respectivamente, quando comparado com a produção de O_2^- nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 7E). Comportamento semelhante foi encontrado na produção de H_2O_2 nesta mesma temperatura, já que foi observado redução na produção deste radical livre em 24 horas de embebição, quando comparado com o valor de semente seca. Posteriormente, observou-se aumentos de 10, 7 e 14 % na produção de H_2O_2 nos tempos de 24, 72 e 120 horas de embebição, respectivamente, quando comparado com a produção de H_2O_2 nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 7E).

Enquanto a produção do ânion superóxido decresce continuamente a 15 °C, ela apresenta comportamento inverso na temperatura de 35 °C. Diferentemente de ambas, a produção de superóxido em 25 °C decresce até 72 horas e aumenta logo em seguida. Entretanto, percebe-se que os teores de H_2O_2 são mantidos sem correspondência com os do ânion superóxido, nas três temperaturas (Figura 7E), com valores acentuadamente altos. Assim, é possível supor que os altos valores de superóxido detectados na testemunha foram convertidos paulatinamente em peróxido de hidrogênio, que junto ao peróxido produzido durante o desenvolvimento, tempo zero, tenham mantido os níveis

de peróxido mais elevados no período de 24 a 120 horas, justificando a desigualdade de valores entre os teores destes radicais livres nestas temperaturas. Estes resultados evidenciam que a embebição de sementes de *D. nigra* em temperaturas próximas da temperatura considerada ideal, mesmo com acúmulo de H_2O_2 , não interferem significativamente na porcentagem de germinação, principalmente para 25 °C (Figura 7E).

Na temperatura de 45 °C observou-se redução de dezoito vezes na produção de O_2^- até 8 horas de embebição, quando comparado com o valor de semente seca, diminuindo em 57 e 2 % na produção de O_2^- nos intervalos de 24, 48 horas de embebição, respectivamente, quando comparado com a produção de O_2^- nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 7C). Com relação ao H_2O_2 , observou-se redução de 99 % na produção deste radical até 8 horas de embebição, quando comparado com o valor de semente seca, posteriormente aumentando em 35 % e reduzindo novamente em 2 % nos intervalos de 24, 48 horas de embebição, respectivamente, quando comparado com a produção de H_2O_2 nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 7F). Kranner et al (2010) observaram aumento da produção de O_2^- com o aumento da temperatura durante experimentos realizados com sementes de *Pisum sativum*. Porém, para sementes de *D. nigra* resultados semelhantes foram encontrados apenas para a temperatura de 35 °C. Wang et al. (2012) observaram aumento da produção de EROs, especialmente peróxido de hidrogênio e aumento da peroxidação de lipídios em sementes de soja sob condições de alta temperatura e umidade. De acordo com Bhattacharjee (2008), a alta temperatura induziu aumento significativo do teor de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio em sementes e plântulas de *Amaranthus livindus* quando comparado com o grupo controle. Pesquisas recentes revelam que as EROs podem não ser tão prejudiciais para o ciclo de vida da semente como retratado previamente, e sim ter papel chave na sinalização em resposta aos diferentes estresses possíveis durante a germinação (Gomes e Garcia, 2013).

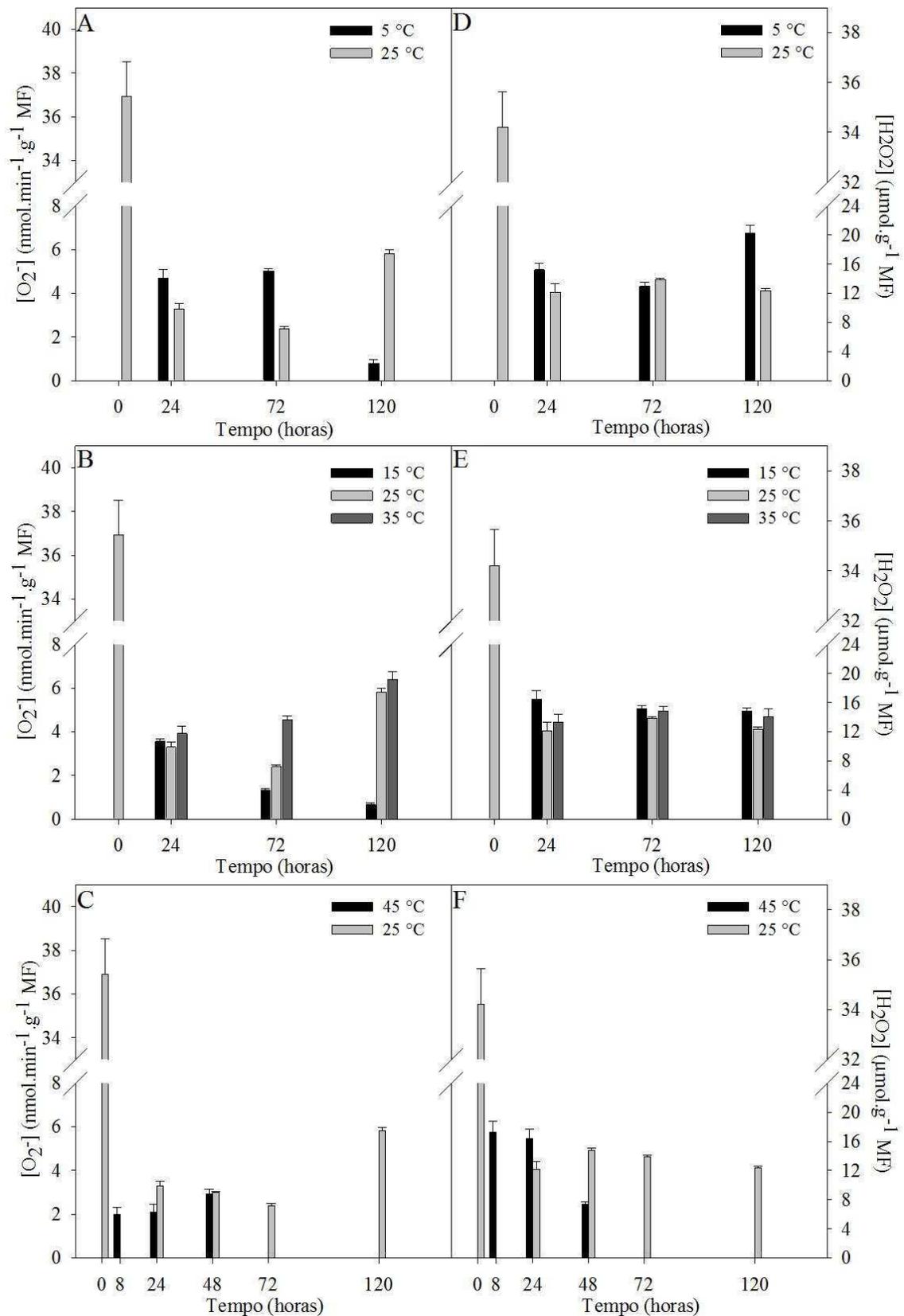


Figura 7. Produção de ânion superóxido (O_2^-) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em eixos embrionários de sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação sob diferentes temperaturas. Dados referentes à média de 3 repetições (\pm erro padrão).

3.6 Análise do sistema antioxidativo enzimático

Houve redução da atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD), responsável pela remoção do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), no eixo embrionário durante o tempo de embebição das sementes de *D. nigra* na temperatura de 5 °C (Figura 8A). Inicialmente a atividade desta enzima foi detectada em sementes secas, sendo 48 % superior nas primeiras 24 horas. Posteriormente observou-se um aumento de 9 % até 72 horas e em 120 horas foi menor 4 %, quando comparada com a atividade da SOD nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C. Este padrão de atividade coincide com a redução da produção do $O_2^{\cdot-}$, que atingiu níveis praticamente nulos. Assim, é possível indicar que a SOD foi eficiente na remoção deste radical livre durante o período avaliado na temperatura de 5 °C. A atuação da enzima dismutase do superóxido (SOD) é fundamental, já que esta faz parte da primeira linha de defesa contra as EROs, realizando a dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Gill e Tuteja, 2010). Vários autores avaliando as respostas de plantas e sementes em condições de baixas temperaturas notaram aumento da atividade da enzima SOD, indicando que esta enzima atua diretamente na remoção do $O_2^{\cdot-}$ (Sunkar & Zhu, 2004; Mei e Song, 2010; Sun et al. 2010; Henselová et al., 2012).

Para as demais temperaturas observou-se aumento na atividade da SOD ao longo do tempo de embebição das sementes, indicando que a SOD minimizou os efeitos tóxicos do radical $O_2^{\cdot-}$, principalmente para 15 °C, na qual este radical livre foi praticamente anulado (Figura 8B). Observou-se diminuição de 4 % nas primeiras 24 horas, aumento de 19 % até 72 horas e outro aumento de 45 % até 120 horas, quando comparado com a atividade da SOD nos respectivos tempos à temperatura de 25 °C. Para a temperatura de 35 °C observou-se uma redução de 4 % nas primeiras 24 horas, e posteriormente aumentos de 92 e 72 % nos tempos de 72 e 120 horas, respectivamente, quando comparado com a atividade da SOD nos respectivos tempos à temperatura de 25 °C. Além disso, os níveis de atividade desta enzima nas temperaturas de 15 e 35 °C foram mais próximos da atividade da mesma na temperatura de 25 °C (Figura 8B). Yao et al., (2012) observaram comportamento semelhante durante a germinação de sementes de *Pisum sativum* em que houve aumento da atividade de SOD durante a germinação, na temperatura de 22 °C. Diferentemente, Prodanovic et al., (2007) encontraram resultados em que a atividade da enzima SOD apresentou comportamento constante do longo do período de germinação de sementes de *Picea omorika*, na temperatura de 25 °C. Semelhante também ao encontrado por Cakmak et al., (2010), em que a atividade da

SOD em sementes recém colhidas de *Medicago sativa* apresentou comportamento constante, na temperatura de 22 °C.

Na temperatura de 45 °C, a atividade da SOD foi elevada, indicando indução no aumento da atividade desta enzima a fim de remover possíveis danos por acúmulo do radical O_2^- (Figura 8C). Observou-se aumento de 53 % na atividade da SOD nas primeiras 8 horas quando comparado com a atividade desta enzima em sementes secas. Posteriormente, observaram-se aumentos de 2 e 3,6 vezes nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente, quando comparado com a atividade da SOD nos respectivos tempos à temperatura de 25 °C. Porém, ainda que neste trabalho não tenha sido observado acúmulo do radical O_2^- ao longo do tempo nesta temperatura, a atividade da SOD no tempo de 48 horas a 45 °C foi quatro vezes superior quando comparada com a atividade após 48 horas na temperatura de 25 °C. A sinalização para tolerância a um possível estresse térmico em sementes de *D. nigra* pode ter sido acionado pelo elevado nível de produção de radical O_2^- encontrado em sementes secas, preparando as sementes para as próximas etapas do ciclo vegetal. Kumar et al. (2012) trabalhando com genótipos de milho e arroz observaram aumento da atividade da SOD até 40 °C, sendo reduzida sob temperatura de 45 °C.

A enzima catalase (CAT), uma das responsáveis pela eliminação do radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) das células é encontrada principalmente nos peroxissomos, local de origem do H_2O_2 como subproduto da β -oxidação dos ácidos graxos, fotorrespiração e catabolismo das purinas (Gill e Tuteja, 2010).

Para a temperatura de 5 °C, observou-se diminuição da atividade da enzima CAT ao longo da embebição quando comparada com a atividade desta enzima na temperatura de 25 °C. Nas primeiras 24 horas a atividade se manteve estável e a partir deste período houve uma diminuição de atividade de três vezes em 72 horas e também de três vezes em 120 horas de embebição (Figura 8D).

Com relação à temperatura de 15 °C observou-se aumento de 2 % na atividade da CAT nas primeiras 24 horas, redução de 43 % até 72 horas e se manteve estável até 120 horas, quando comparado com a atividade da CAT nos respectivos tempos à temperatura de 25 °C (Figura 8E). Já para 35 °C observou-se redução apenas de 4 % nas primeiras 24 horas, e posteriormente aumentos de 92 e 72 % nos tempos de 72 e 120 horas, respectivamente, quando comparado com a atividade da CAT nos respectivos tempos à temperatura de 25 °C (Figura 8E). Yao et al., (2012) observaram comportamento semelhante durante a germinação de sementes de *Pisum sativum*, com aumento da atividade de CAT durante a germinação na temperatura de 22 °C. Cakmak

et al., (1993) observaram aumento da atividade desta enzima no eixo embrionário na temperatura de 24 °C, durante a germinação de sementes de *Triticum aestivum*. Porém, Cakmak et al., (2010), concluíram que a atividade da enzima CAT diminuiu ao longo da germinação de sementes de *Medicago sativa*, na temperatura de 22 °C.

Observou-se redução da atividade da enzima nos eixos embrionários de *D. nigra* para a temperatura de 45 °C quando comparada à temperatura de 25 °C. Nas primeiras 8 horas houve redução de 27% e posteriormente nova redução de duas vezes até 24 horas na atividade da CAT, não sendo mais detectada após este período (Figura 8F). Como também foi observado redução na produção de H₂O₂ nesta temperatura, estes fatos indicam o início da deterioração das sementes na temperatura de 45 °C. Mei e Song (2010) verificaram resultados semelhantes a estes com sementes de *Hordeum vulgare*, em que a atividade da enzima CAT foi elevada em temperaturas próximas da condição ideal de germinação da espécie, com diminuição da atividade em baixas e altas temperaturas. Kumar et al. (2012) trabalhando com genótipos de milho e arroz observaram aumento da atividade da CAT até 40 °C, sendo reduzida sob temperatura de 45 °C.

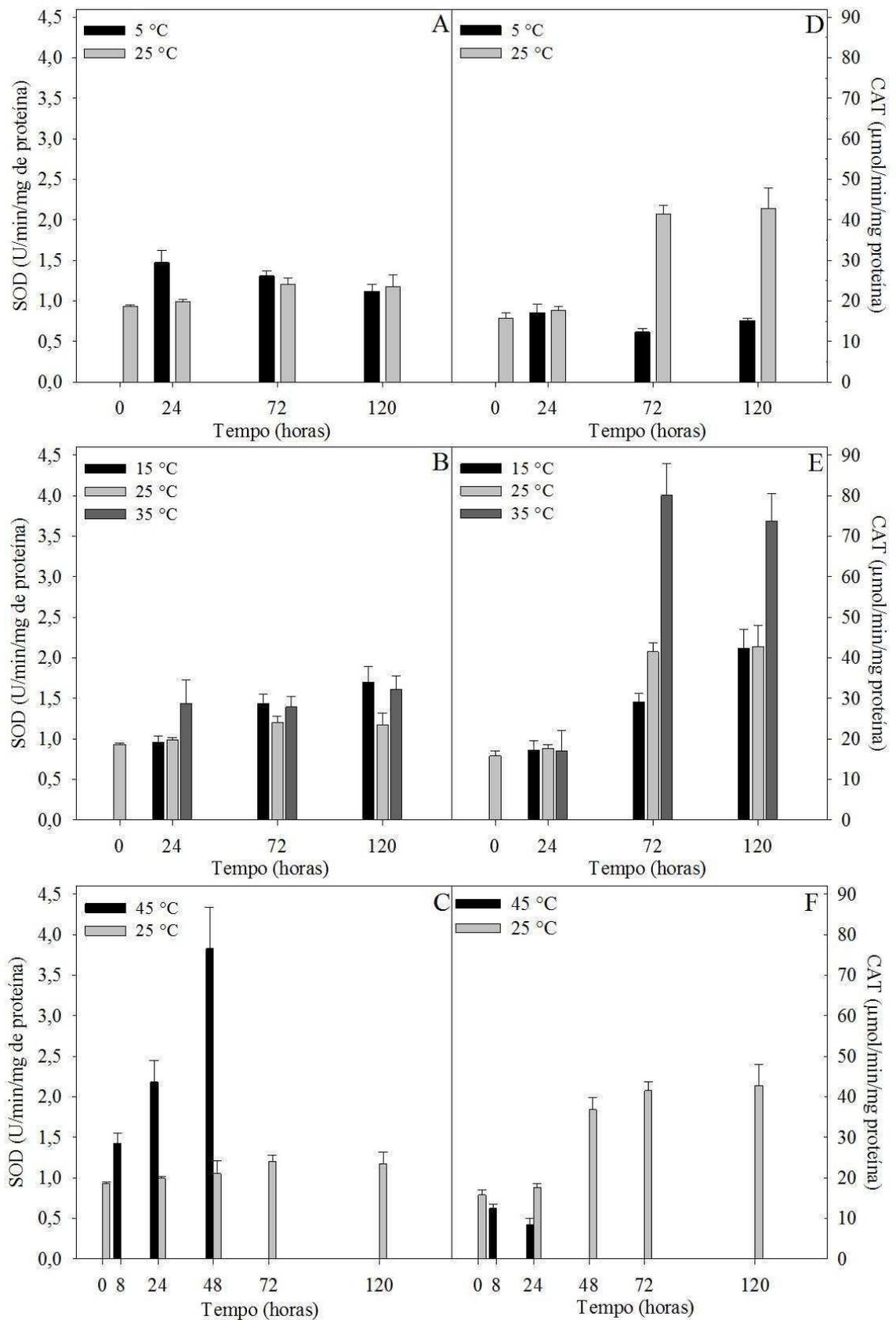


Figura 8. Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) e catalase (CAT) em eixos embrionários de sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação sob diferentes temperaturas. Dados referentes à média de 4 repetições (\pm erro padrão).

A peroxidase do ascorbato (APX) tem papel na remoção de H_2O_2 nas células utilizando o ascorbato como doador de elétrons para a reação (Asada, 1992). Para a temperatura de 5 °C, apenas durante as primeiras 24 horas foi possível detectar a atividade da enzima em eixos embrionários de *D. nigra*, sendo inferior em 88% quando comparado com a atividade na temperatura de 25 °C (Figura 9A). Assim, esta enzima se mostra pouco tolerante a baixas temperaturas. Já para a temperatura de 15 °C houve reduções de 83, 141 e 173 % na atividade da APX nos tempos de 24, 72 e 120 horas, respectivamente, quando comparado com a atividade da APX nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C. Para 35 °C a atividade da APX aumentou 18, 106 e 101 % nos tempos de 24, 72 e 120 horas, respectivamente, quando comparado com a atividade da APX nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 9B). Yao et al., (2012) observaram comportamento semelhante durante a germinação de sementes de *Pisum sativum* em que houve aumento da atividade da mesma enzima durante a germinação, sob temperatura de 22 °C. Na temperatura de 45 °C a atividade da APX pode ser detectada apenas durante as primeiras 8h de embebição (Figura 9C). Logo, esta enzima se mostra pouco tolerante a altas temperaturas também. Sun et al. (2010) trabalhando com o tipo selvagem e duas linhagens de plantas mutantes para o gene ATtAPX, em sementes e plântulas de *Nicotiana tabacum* eles observaram que sementes oriundas do tipo selvagem têm menor porcentagem de germinação sob temperaturas de 4 e 42 °C quando comparadas com germinação de sementes oriundas das plantas mutantes que tiveram superexpressão deste gene, fato que sugere o aumento da tolerância destas plantas sob alta e baixa temperatura. Assim, a partir dos resultados obtidos neste trabalho para a atividade desta enzima pode observar que ela é dependente de temperaturas próximas da ideal de germinação de sementes de *D. nigra*.

Para a atividade da enzima peroxidase (POX) em eixos embrionários de sementes de *D. nigra*, observa-se comportamento semelhante ao encontrado para a enzima catalase, com exceção para a temperatura de 45 °C, em que a atividade da catalase é inibida durante a embebição nesta temperatura (Figura 9). Para a temperatura de 5 °C, ocorreram reduções de 27, 60 e 132 % na atividade da POX nos tempos de 24, 72 e 120 horas, respectivamente, quando comparado com a atividade da POX nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 9D), enquanto para a temperatura de 15 °C houve reduções de 20, 12 e 37 % nos tempos de 24, 72 e 120 horas, respectivamente, quando comparado com a atividade da POX nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 9E). A 35 °C observou-se aumentos de 11 e 78 % na atividade da POX nos tempos de 24 e 72 horas, respectivamente e redução de 6 % no

tempo de 120 horas, quando comparado com a atividade da POX nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 9E). A redução de 82 % na atividade da POX a 45 °C ocorreu nas primeiras 8 horas quando comparado com sementes secas. Posteriormente, se manteve estável até 24 horas e teve aumento de 165 % até 48 horas na atividade da POX, quando comparado com a atividade desta enzima nos respectivos tempos na temperatura de 25 °C (Figura 9F).

A redução da atividade das enzimas do sistema antioxidante revela a baixa viabilidade e o baixo vigor de sementes (Demirkaya et al., 2012; Prodanovic et al., 2012). As enzimas CAT, APX e POX tiveram atividade reduzida na temperatura de 5 °C, sendo que apenas as enzimas CAT e APX tiveram atividade reduzida na temperatura de 45 °C. Com isto, pode-se relacionar a atividade de CAT e APX nos eixos embrionários de *D. nigra* dependentes de temperaturas entre a faixa de 15 a 35 °C. Esta faixa de temperatura coincide com a germinação da espécie, conforme pode ser visto nos resultados obtidos neste trabalho.

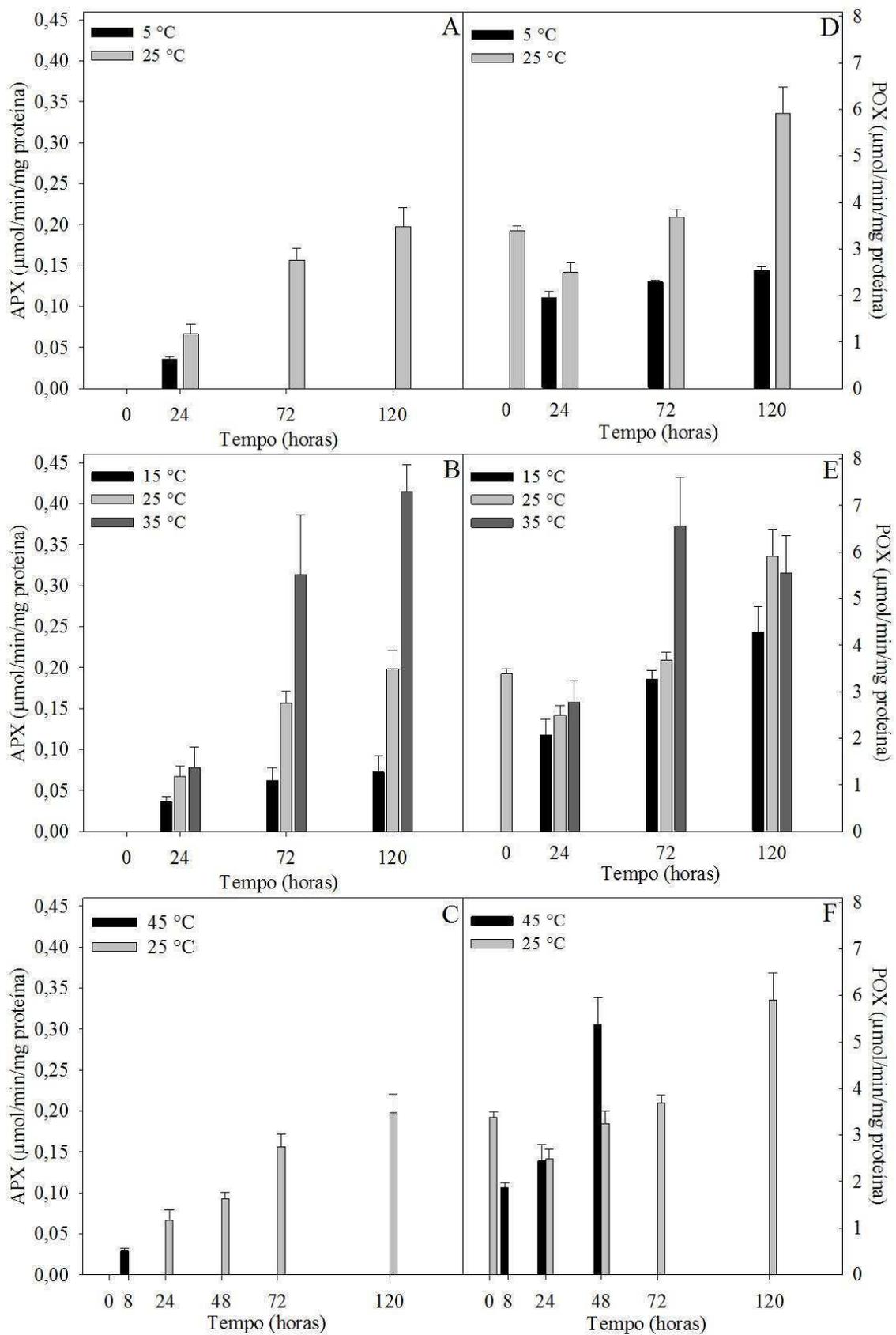


Figura 9. Atividade das enzimas peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase (POX) em eixos embrionários de sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação sob diferentes temperaturas. Dados referentes à média de 4 repetições (\pm erro padrão).

Para avaliar a relação entre as variáveis analisadas foi feita análise de correlação de Pearson (r) para cada temperatura testada, com exceção das temperaturas de 5 e de 45 °C, uma vez que não se observou germinação em ambas. Entretanto, não foi possível estabelecer as relações entre as variáveis devido aos altos valores de cada uma delas no tempo zero e as alterações ocorridas durante a germinação, que foram similares entre elas no comportamento.

4 CONCLUSÕES

Sob temperaturas de 5 e 45 °C a germinação é nula.

Nas temperaturas de 5 e 45 °C a seletividade das membranas celulares é perdida.

As produções de superóxido e peróxido de hidrogênio reduzem com a hidratação das sementes em qualquer temperatura.

Existe similaridade entre a CE e a produção de EROs em todas as temperaturas.

A atividade da CAT não é detectada na fase final de embebição na temperatura de 45 °C.

A atividade da APX somente é detectada na fase inicial de embebição nas temperaturas de 5 e 45 °C.

Observa-se maior atividade da enzima APX nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C, da CAT nas temperaturas de 25 e 35 °C, da POX nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C e da SOD principalmente na temperatura de 45 °C.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, F. F. A.; TAVARES, A. R.; KANASHIRO, S.; LUZ, P. B.; SANTOS JUNIOR, N. A. Germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (Fabaceae-Papilionoideae) no armazenamento. **Ciência e Tecnologia**, v.34, p.1624-1629, 2010.
- ALMEIDA, F. A. C.; RODRIGUES, J. P.; ALMEIDA, S. A.; GOUVEIA, J. P. G.; SANTOS, N. R. Efeito da temperatura sobre a germinação de três espécies de *Pinus* cultivadas no Brasil. **Árvore**, v.29, n.5, p.757-765. 2005.
- AMARAL, L. I. V.; PAULILO, M. T. S. Efeito da luz, temperatura, regulador de crescimento e nitrato de potássio na germinação de *Miconia ciannamomifolia* (DC). **Insula**, v.21, p.59-86, 1992.
- 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.55, p.373-399, 2004.
- 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.
- ARORA, A; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v.82, p.1227-1238. 2002.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v.85, p.235-241. 1992.
- ATAÍDE, G. M.; BORGES, E. E. L.; GONCALVES, J. F. C.; GUIMARAES, V. M.; FLORES, A. V.; BICALHO, E. M. Alterations in seed reserves of *Dalbergia nigra* ((Vell.) Fr All. ex Benth.) during hydration. **Journal of Seed Science**, v.35, p.56-63, 2013.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science and Research**, v.14, p.93-107, 2004.
- BAILLY, C; EL-MAAROUF-BOU-TEAU, H; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, v.331, p.806-814, 2008.
- BEAUCHAMP C, FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.
- BELLO, M.; TOLABA, M. P.; SUAREZ, C. Factors affecting water uptake of rice grain during soaking. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol**, v.37, p.811-816, 2004.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 392p, 2013.

BHATTACHARJEE, S. Calcium-dependent signaling pathway in the heat-induced oxidative injury in *Amaranthus lividus*. **Biologia Plantarum**, 52: 137-140, 2008.

BORGES, E.E.L.; REZENDE, S.T.; BORGES, R.C.G.; PEREZ, S.C.J.G.A. Caracterização de α -galactosidase em embrião e cotilédones de sementes de *Platymenia pubecens* Micheli, var. *pubecens* (tamboril-da-mata). **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.2. p.82-90, 2004.

BORGHETTI, F. Temperaturas extremas e a germinação de sementes. In: **Estresses ambientais: Danos e benefícios em plantas**, NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. (eds.) Recife: UFPE. p.207-218, 2005.

BOVERIS, X. **Methods in enzymology**. v.105, p.429-435,1984.

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

BRANCALION, P. H. S.; NOVEMBRE, A. D. L. C.; RODRIGUES, R. R. Temperatura ótima de germinação de sementes de espécies arbóreas s 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**. Brasília: SDA/ACS, 399p. 2009.

CAKMAK, I; STRBAC, D; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal Experimental of Botany**, v.44. 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, p.1-6, 2010.

CARDOSO, V. J. M.; PEREIRA, F. J. M. Dependência térmica da germinação de sementes de *Drymaria cordata* (L.) Willd. ex Roem. & Schult. (Cariophyllaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.23, p.305-312. 2009.

CARRIJO, L.C.; BORGES, E.E.L.; REZENDE, S.T.; PONTES, C.A.; SILVA, A.G.; LOPES, M.R. Avaliação da concentração de proteínas e da atividade de α -galactosidase nos cotilédones e no eixo embrionário de sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação. **Acta Amazônica**, v.41, n.4, p.465-470, 2011.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 1.039p, 2003.

CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. (orgs). **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre, p.149-162. 2005.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1955.

CITES. CITES: **Appendix I, II and III to the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora**. US Fish and Wildlife Service: Washington. 2008.

COELHO, M. F. B.; SALES, D. M.; DOMBROSKI, J. L. D.; AZEVEDO, R. A. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F. Condições de luz e temperatura na germinação de sementes de algodão do campo [*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger – Bixaceae]. **Revista de Biologia Neotropical**, v.5, p.23-31. 2008.

CORBINEAU, F; GAY-MATHIEU, C; VINEL, D; CÔME, D. Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. **Physiologia Plantarum**, v.116, p.489–496. 2002.

DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G. .; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v.34, p.1023-1028, 1993.

DELWICHE, L. D.; SLAUGHTER, S. J. **The Little SAS Book: A Primer**. Cary: SAS Institute, 268 p, 2003.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A.; ARANTES, L. O.; CHAVES, I. S.; AVELINO, E. V. Technology of *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) seeds. **CERNE**, v.19, n.1, pp.93-101. 2013.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signaling & Behavior**, v.3, p.175–182. 2008.

FAO. Global Forest Resources Assessment 2010 – main report. **FAO Forestry Paper No. 163**. Rome. 2010. In: www.fao.org/docrep/013/i1757e/i1757e00.htm

FERRAZ-GRANDE, F.G.A; TAKAKI, M. Temperature dependent seed germination of *Dalbergia nigra* Allem (Leguminosae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, p.401-404. 2001.

FLORES, A. V. **Germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* (Schott) sob diferentes temperaturas: aspectos morfofisiológicos e enzimáticos**. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG: UFV, 66p. 2011.

FOYER, CH, NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v.17, p.1866–1875, 2005.

FUJITA, M; FUJITA, Y; NOUTOSHI, Y; TAKAHASHI, F; NARUSAKA, Y; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Currents Opinion Plant Biology**, v.9, p.436–442, 2006.

GAY, C.; GEBICKI, J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xyleneol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, v.284, p.217-220, 2000.

- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930. 2010.
- GOMES, M. G.; GARCIA, Q. S. Reactive oxygen and seed germination. **Biologia**, v.68, p.351-357, 2013.
- HAVIR, E. A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.
- HENSELOVÁ, M.; SLOVÁKOVÁ, L.; MARTINKA, M.; ZAHORANOVÁ, A. Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma. **Biologia**, v.67, p.490-497, 2012.
- IBAMA/MMA – Instrução Normativa n° 6, de 23 de setembro de 2008. **Lista Oficial da Flora Brasileira ameaçada de extinção**. 2008.
- IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2013. Version 2013.1. In: <http://www.iucnredlist.org>, acesso em 15 de julho de 2013.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.
- KHAZAEI, J.; MOHAMMADI, N. Effect of temperature on hydration kinetics of sesame seeds (*Sesamum indicum* L.). **Journal of Food Engineering**, v.91, 542–552. 2009.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedling and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiology**, v.34, p.713-721, 1993.
- KRANNER, I, ROACH, T; BECKETT, R.P.; WHITAKER, C; FARIDA, V. M. Extra cellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. **Journal of Plant Physiology**, v.167, p.805-811. 2010.
- KUMAR, S.; GUPTA, D.; NAYYAR, H. Comparative response of maize and rice genotypes to heat stress: status of oxidative stress and antioxidants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, p.75-86. 2012.
- KUO, M.C.; KAO, C.H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, v.46, p.149-152, 2003.
- LEMES, E. Q.; LOPES, J. C. Temperaturas cardinais para germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de Paineira. **Scientia Forestalis**, v.40, n.94, p.179-186, 2012.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection aid evolution for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 495p. 2005.

MARINI, P.; MORAES, C.L.; LARRÉ, C.F.; LIMA, L.C.; MORAES, D.M.; AMARANTE, L. Indicativos da perda de qualidade de sementes de arroz sob diferentes temperaturas através da atividade enzimática e respiratória. **Interciência**, v.38, n.1, p.54-59, 2013.

MARQUES, M. A.; PAULA, R. C.; RODRIGUES, T. J. D. Adequação do teste de condutividade elétrica para determinar a qualidade fisiológica de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (VELL) Fr. All. Ex Benth). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p.271-278, 2002.

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.

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assesment. **Seed Science and Technology**, v.27, 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, p.965-972, 2010.

MELLO, J. I. O.; BARBEDO, C. J. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil *Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae-Caesalpinioideae. **Revista Árvore**, v.31, p.645-655. 2007.

MIRA, S.; ESTRELLES, E.; GONZALES-BENITO, M. E.; CORBINEAU, F. Biochemical changes induced in seeds of Brassicaceae wild species during ageing. **Acta Physiologiae Plantarum**, 33:1803–1809. 2011.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.246, n.22, p.6886-6890,1971.

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

MITTLER, R; VANDERAUWERA, S; GOLLERY, M; VAN BREUSEGEM, F Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, v.9, p.490–498, 2004.

MOHAMMADI, M.; KARR, A.L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.1023-1029, 2001.

MURTHY, U. M. N.; SUN, W. Q. Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. **Journal Experimental of Botany**, v.51, p.1221-1228. 2000.

MURTHY, U. M. N.; KUMAR, P. P; SUN, W.Q. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiate* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. **Journal Experimental of Botany**, v.54, p.1057-1067, 2003.

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

O'KANE, D.; GILL, V.; BOYD, P.; BURDON, R. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. **Planta**, v.198, p.371-377, 1996.

OLIVEIRA, P. G.; GARCIA, Q. S.. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Syngonanthus elegantulus*, *S. elegans* e *S. venustus* (Eriocaulaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.3, p.627-633, 2005.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.. **Catálogo das Árvores Nativas de Minas Gerais - Mapeamento e Inventário da Flora Nativa e dos Reflorestamentos de Minas Gerais**. 1. ed. Lavras: Editora UFLA, v.1, 423p. 2006.

ORACZ, K; EL-MAAROUF BOUTEAU, H; FARRANT, J. M; COOPER, K; BELGHAZI, M; JOB, C; JOB D; CORBINEAU, F; BAILLY, C. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. **The Plant Journal**, v.50, p.452-465. 2007.

OROZCO-ALMANZA, M. S.; LEON-GARCIA, L. P.; GREYER, R.; GARCIA - MOYA, E. Germination of four species of the genus *Mimosa* (Leguminosae) in a semi-arid zone of Central Mexico. **Journal of Arid Environments**, v.55, p.75-92, 2003.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANTANA, R; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.137-143, 1999.

PIMENTA, R. S.; LUZ, P. B.; PIVETTA, K. F. L.; CASTRO, A.; PIZETTA, P. U. C. Efeito da maturação e temperatura na germinação de sementes de *Phoenix canariensis* hort. ex Chabaud – Arecaceae. **Revista Árvore**, v.34, p.31-38, 2010.

PIRES, L. A.; CARDOSO, V. J. M.; JOLY, C. A.; RODRIGUES, R. R. Germinação de *Ternstroemia brasiliensis* Cambess. (Pentaphragaceae) de Floresta de Restinga. **Acta Botanica Brasilica**, v.23, p.57-66, 2009.

PRODANOVIC', O.; PRODANOVIC', R.; BOGDANOVIC', J.; MITROVIC', A.; MILOSAVIC', N.; RADOTIC', K. Antioxidative enzymes during germination of two lines of serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. **Archives of Biological Sciences**, v.59, p.209-216. 2007.

PRODANOVIC', O. PRODANOVIC', R; PRISTOV, J. B.; MITROVIC', A; RADOTIC', K. Effect of cadmium stress on antioxidative enzymes during the germination of Serbian spruce [*Picea omorika* (Panc) Purkyne]. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.11377-11385, 2012.

RAO, K. V. M.; SRIEDEV, V.; SATYANARAYANA, N. V. Heat shock induced lipid changes and solute leakage in germinating seeds of pigeonpea. **Biologia Plantarum**, v.45, p.71-76. 2002.

REGO, S.S.; NOGUEIRA, A.C.; KUNIYOSHI, Y.S.; SANTOS, Á.F. dos. Germinação de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. em diferentes substratos e

- condições de temperaturas, luz e umidade. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.212-220, 2009.
- RIBEIRO, M.; METZGER, L.; MARTENSEN, A.; PONZONI, F.; HIROTA, M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v.142, p.1141-1153, 2009.
- SANTOS, C. M. R.; FERRERIA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Revista Ciência Florestal**, v.14, p.13-20. 2004.
- SAS. **SAS Programming 9.3**. Cary: SAS, 2009. Software.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.
- SIMÃO, E.; TAKAKI, M. Effect of light and temperature on seed germination in *Tibouchina mutabilis* (Vell.) Cogn. (Melastomataceae). **Biota Neotropica**, v.8, p.63-68. 2008.
- SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Germination of *Jacaranda mimosifolia* (D. Don - Bignoniaceae) seeds: effects of light, temperature and water stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.5, p.785-792, 2004.
- STOCKMAN, A. L.; BRANCALION, P. H. S.; NOVENBRE, A. D. L. C.; CHAMMA, H. M. C. P. Sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.-Bignoniaceae): temperatura e substrato para o teste de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, p.139-143. 2007.
- SUN, W.-H.; DUAN, M.; LI, F.; SHU, D. -F.; YANG, S.; WENG, Q. -W. Overexpression of tomato tAPX gene in tobacco improves tolerance to high or low temperature stress. **Biologia Plantarum**, v.54, p.614-620. 2010.
- SUN, W. Q.; LEOPOLD, A.C. The Maillard reaction and oxidative stress during ageing of soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, v.94, p.94-104. 1995.
- SUNKAR, R.; ZHU, J.-K. Novel and stress regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis w inside box sign. **Plant Cell**, v.16, n.8, p.2001-2019. 2004.
- TABARELLI, M.; PINTO, L.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M.; BEDE, L. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic forest. **Conservation Biology**, v.19, p.695-700, 2005.
- WANG, L.; MA, H.; SONG, L.; SHU, Y.; GU, W. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **Journal of Proteomics**, 75: 2109-2127. 2012.
- YAO, Z.; LIU, L.; GAO, F.; RAMPITSCH, C.; REINECKE, D. M.; OZGA, J. A.; AYELE, B. T. Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea. **Journal of Plant Physiology**, v.169, p.1477-1488. 2012.

YIN, G.; SUN, H.; XIN, X.; QIN, G.; LIANG, Z.; JING, x. Mitochondrial Damage in the Soybean Seed Axis During Imbibition at Chilling Temperatures. **Plant Cell Physiology**. 50: 1305–1318, 2009.