

GLAUCIANA DA MATA ATAÍDE

FISIOLOGIA, BIOQUÍMICA E ANATOMIA DE SEMENTES DE
Melanoxylon brauna SCHOTT. (FABACEAE) GERMINADAS SOB
DIFERENTES TEMPERATURAS

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
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A862f
2013

Ataíde, Glauciana da Mata, 1986-
Fisiologia, bioquímica e anatomia de sementes de
Melanoxylon brauna Schott. (Fabaceae) germinadas sob
diferentes temperaturas / Glauciana da Mata Ataíde. – Viçosa,
MG, 2013.
xi, 100 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Germinação. 2. Vitalidade. 3. Sementes. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Florestal.
Programa de Pós-Graduação em Ciencia Florestal. II. Título.

CDO adapt. CDD 634.918122

GLAUCIANA DA MATA ATAÍDE

FISIOLOGIA, BIOQUÍMICA E ANATOMIA DE SEMENTES DE
Melanoxylon brauna SCHOTT. (FABACEAE) GERMINADAS SOB
DIFERENTES TEMPERATURAS

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: 06 de setembro de 2013.

Prof. Edgard Augusto de Toledo Picoli
(Coorientador)

Prof^a. Denise Cunha F. dos Santos Dias

Prof. Renato Mendes Guimarães

Dr^a. Karina Lucas Barbosa Lopes Mattos

Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges
(Orientador)

"Moça, olha só o que eu te escrevi..."

É preciso força, pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê!"

Aos meus anjos aqui na Terra, que, mesmo cuidando de suas próprias vidas, de seus próprios problemas, de seus outros filhos, de parentes e amigos, estiveram ao meu lado até o fim para a concretização deste sonho.

- **Mãe, Pai**, dedico este trabalho com todo o carinho e gratidão a vocês! Muito obrigada por tudo!!!

Dedico também à memória da minha querida prima e irmã **Ritinha**, que recentemente nos deixou, mas que sempre esteve ao meu lado e comemorou comigo todas as conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me guiar e abençoar em todos os momentos desta caminhada e por me presentear com mais esta realização.

Aos meus pais, Ivone e João, por serem meus exemplos, fontes de amor, carinho e companheirismo, por entenderem minhas ausências, e pela força e apoio incondicional para que meus sonhos se realizem.

Aos queridos irmãos Gláucia e Douglas, por estarem sempre presentes me incentivando, além de serem grandes amigos. À toda a família que sempre torceu pelo meu sucesso, em especial à querida vovó Preta, pela força e incentivo durante toda a minha vida. E também à memória dos meus “anjinhos” vovô Gustavo, vovó Conceição e vovô Zé Leão e agora, à mais nova anjinha Ritinha, que esteve sempre comigo.

À minha amada afilhadinha Laura, que faz a minha vida mais feliz!

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Engenharia Florestal pela oportunidade oferecida e por todos os ensinamentos; e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pela formação em Engenharia Florestal, em especial aos mestres e amigos Ângelo, Ana Márcia, Lourenço, Miranda e Reynaldo.

Ao Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges pela excelente orientação, confiança e apoio em todos os momentos, e por ter me recebido de braços abertos para o mestrado e doutorado, pelo grande exemplo de professor e pesquisador, contribuindo de maneira ímpar para minha formação e amadurecimento profissional.

Ao Prof. Edgard Augusto de Toledo Picoli por toda a ajuda na elaboração do trabalho, pelas ótimas sugestões e pela oportunidade de me deixar compartilhar de seus conhecimentos.

Aos Profs. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias e Renato Mendes Guimarães e à Dra. Karina Lemos pelas valiosas críticas e sugestões apresentadas e pela participação na banca.

A todos os demais professores do doutorado, pelos conhecimentos adquiridos durante o curso.

Ao Mauro, para além do auxílio nas análises em laboratório, pela amizade, companheirismo, risos e brincadeiras compartilhadas, fazendo com que os longos dias entre pipetas e reagentes fossem mais agradáveis.

Ao Leacir pela valiosa ajuda durante o desenvolvimento dos trabalhos, sempre me economizando uns “5 minutinhos” e ao Chico, Márcio, Machado, Pedro, Nilmar, Josimar e todos os funcionários da silvicultura pela ótima convivência e apoio logístico durante a realização deste trabalho.

Aos estagiários do LASF pela amizade e apoio durante o período do doutorado: Argemiro, Luana, Cássia, Giovani e Lucas. E ao Antônio pela ajuda essencial na realização dos experimentos, pela companhia no laboratório, e por todas as discussões e ideias acerca da fisiologia e bioquímica de sementes.

À Genaína, Andrea e Thaline pelo grande apoio e valiosíssima ajuda nas várias etapas das análises anatômicas.

Aos secretários da pós Ritinha e Alexandre por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao amigo Renato Vinícius Oliveira Castro por ser meu grande incentivador na vida acadêmica em Viçosa, pelo incentivo e ajuda nos momentos difíceis, e pelo auxílio nas análises estatísticas.

À amiga Ana Paula Vilela Carvalho, minha companheira durante a jornada de doutorado, pela cumplicidade e amizade em Viçosa.

Aos queridos amigos que vieram de Diamantina para a pós-graduação em Viçosa: Regina, Maria Fernanda, Anne, Bruna, Carlos, Júlia, Sabrina, Ana Flávia e Cibele, por tornarem meus dias em Viçosa mais especiais, vocês são show!

Aos amigos conquistados em Viçosa: Flávia, Felipe, Ariri, Carol, Andressa, Elisa, Anna, Alex pela força, amizade e agradável convívio.

Aos amigos de longa data pela amizade e incentivos constantes, e apesar da distância estão sempre presentes em minha vida: Ana Paula, Aninha, Carol, Mili, Thays, Polly, Lina, Luciana, Lívinha, Graciele, Luiz Eduardo e Cíntia. Aos meus amigos escoteiros, por me fazerem acreditar em um mundo melhor, e em pessoas melhores para este mundo: Matheus, Tadeu, Fabi, Carine, Dany, Lívia, Léo, Candinho e Fabrício.

Às amigas do IFSudeste MG Rio Pomba pela amizade e companheirismo nesta reta final: Catarina, Paula e Mariana.

Ao meu namorado Helton, pelo amor e companheirismo ao longo deste curso, e por entender minhas faltas!

A todos que contribuíram direta ou diretamente para esta realização, o meu muito obrigada!!

BIOGRAFIA

GLAUCIANA DA MATA ATAÍDE, filha de João da Mata de Ataíde e Ivone de Fátima Pereira Ataíde, nasceu na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, em 26 de fevereiro de 1986.

Em março de 2004, ingressou na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, graduando-se em Engenharia Florestal, em dezembro de 2008.

Em março de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do prof. Dr. Eduardo Euclides de Lima e Borges, concluindo os requisitos necessários para obter o título de Magister Scientiae em julho de 2011, com defesa da dissertação.

Em agosto de 2011, ingressou no doutorado, no Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, também sob orientação do prof. Dr. Eduardo Euclides de Lima e Borges, concluindo os requisitos para obter o título de Doctor Scientiae em setembro de 2013, com defesa da tese.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO I – Adequação da metodologia do teste de condutividade elétrica para sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> Schott. (Fabaceae)	7
Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Material e Métodos.....	10
Resultados e Discussão	11
Conclusões.....	17
Referências Bibliográficas.....	18
CAPÍTULO II – Alterações fisiológicas e biométricas em sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae) em diferentes temperaturas	22
Resumo	22
Abstract	23
Introdução	24
Material e Métodos.....	25
Resultados e Discussão	27
Conclusões.....	37
Referências Bibliográficas.....	38
CAPÍTULO III – Alterações nas reservas de sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae) durante a germinação em diferentes temperaturas	43
Resumo	43
Abstract	44
Introdução	45
Material e Métodos.....	46
Resultados e Discussão	49
Conclusões.....	64
Referências Bibliográficas.....	65
CAPÍTULO IV – Anatomia e histoquímica de sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae) durante a germinação em diferentes temperaturas	71
Resumo	71
Abstract	72
Introdução	73
Material e Métodos.....	74
Resultados e Discussão	76
Conclusões.....	92
Referências Bibliográficas	93
CONCLUSÕES GERAIS	100

RESUMO

ATAÍDE, Glauciana da Mata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2013. **Fisiologia, bioquímica e anatomia de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae) germinadas em diferentes temperaturas.** Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Coorientador: Edgard Augusto de Toledo Picoli.

As sementes germinam quando as condições ambientais são favoráveis para o crescimento do embrião e não apresentam nenhum tipo de dormência. Dentre os fatores que afetam o processo germinativo, a temperatura assume papel de destaque, na medida em que determina a capacidade e taxa de germinação das sementes, afetando a velocidade de absorção de água e as reações bioquímicas que governam o processo germinativo. Considerando-se que a temperatura é fator imprescindível para o adequado desenvolvimento da germinação, o objetivo neste trabalho foi estudar alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas associadas à germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* em diferentes temperaturas. Para tanto, os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Análise de Sementes Florestais e de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa - UFV. Foram utilizadas neste trabalho sementes de *M. brauna* colhidas em dois anos distintos, 2010 e 2012, as quais constituíram os lotes I e II. Inicialmente, foi feito um estudo com o objetivo de avaliar a influência da quantidade de sementes, volume de água e tempo de embebição no teste de condutividade elétrica em sementes da espécie, visando o estabelecimento de metodologia específica para avaliação do vigor destas sementes. Foram utilizadas sementes pertencentes aos dois lotes, sendo testadas as combinações de 25, 50 e 75 sementes, em volumes de 25, 50 e 75 mL de água destilada, nos tempos 24, 48 e 72 horas de embebição. Para os capítulos 2, 3 e 4, foram utilizadas apenas sementes pertencentes ao lote II, coletadas em 2012, as quais foram colocadas para embeber às temperaturas constantes de 10, 25, 30 e 40 °C. No segundo capítulo, foram medidas a porcentagem, velocidade e tempo médio de germinação das sementes em cada temperatura, e a capacidade de reversão das sementes quando transferidas para a temperatura de 25 °C após exposição às temperaturas de 10 e 40 °C. Foram avaliadas também as alterações biométricas nas temperaturas constantes de 10, 25, 30 e 40 °C, por meio das análises do teor de água, massa fresca, comprimento, largura e espessura das sementes, e comprimento e massa fresca dos eixos embrionários. No terceiro capítulo foi estudada a mobilização de substâncias de reserva nos cotilédones de sementes de *M. brauna* durante a germinação nas diferentes temperaturas, sendo quantificadas as concentrações de lipídios, açúcares solúveis, amido e proteínas solúveis e as atividades

das enzimas α -amilase, β -amilase e glicose-6-fosfato desidrogenase. No quarto capítulo foram abordadas as alterações histoquímicas e estruturais em cotilédones e eixos embrionários de sementes de *M. brauna* durante a germinação nas temperaturas 10, 25, 30 e 40 °C. Pelos resultados pode-se observar que a metodologia mais adequada foi a condução do teste de condutividade elétrica no tempo de 48 horas de embebição, com 50 sementes e 50 mL de água. Em relação à germinação, as maiores médias foram observadas nas sementes de *M. brauna* nas temperaturas de 25 e 30 °C, com valores de 93 e 98%, respectivamente, enquanto nas temperaturas de 10 e 40 °C a germinação foi de 5%. A embebição das sementes a 10 e 40 °C com posterior retorno à 25 °C resultou em acréscimos na germinação em relação às temperaturas extremas, em todos os tempos estudados. As alterações nas reservas de carboidratos solúveis nos cotilédones foram as que apresentaram maiores evidências de decréscimo durante o período germinativo de sementes de *Melanoxylon brauna*, principalmente nas temperaturas de 25 e 30 °C, onde a atividade das enzimas α -amilase, β -amilase e glicose-6-fosfato desidrogenase aumenta com a embebição das sementes, gerando substrato para a respiração e formação de estruturas de carbono para o crescimento. As proteínas decrescem significativamente no início do período pós germinativo, à temperatura de 30 °C. Às temperaturas 10 e 40 °C, acima e abaixo da faixa ótima de germinação para a espécie, a atividade das enzimas α -amilase, β -amilase e glicose-6-fosfato desidrogenase é reduzida, prejudicando o desenvolvimento adequado do processo germinativo. Anatomicamente, foi possível visualizar que as reservas lipídicas mantiveram-se constantes no período estudado, sendo responsáveis pela manutenção da plântula após o início do crescimento. Em consequência, foi observada formação de grão de amido nas sementes após protrusão da raiz primária na temperatura de 30 °C, resultados coerentes com as informações levantadas quanto à atividade enzimática e de germinação das sementes nesta temperatura. A análise estrutural comprova a presença de células vacuoladas, alongadas, justapostas e com intensa atividade celular após início da embebição das sementes.

ABSTRACT

ATAÍDE, Glauciana da Mata, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2013. **Physiology, biochemistry and anatomy of *Melanoxylon brauna* Schott. seeds (Fabaceae) germinated at different temperatures.** Adviser: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Coadviser: Edgard Augusto de Toledo Picoli.

Seeds germinate when environmental conditions are favorable for growth and they do not have any dormancy. Among the factors affecting the germination process, the temperature takes a prominent position, in that it determines the capacity and rate of seed germination, affecting the speed of absorbing water and biochemical reactions that govern the development of germination. Considering that temperature is essential for the development of germination, the aim of this work was to study physiological, biochemical and anatomical changes associated with germination of *Melanoxylon brauna* seeds at different temperatures. Therefore, experiments were conducted in the Laboratories of Analysis of Forest Seeds and Plant Anatomy, at Federal University of Viçosa - UFV. Were used in this study seeds of *M. brauna* collected in two different years, 2010 and 2012, which constituted the lots I and II. Initially, in Chapter 1, a study was done to evaluate the influence of the amount of seeds, water volume and time of soaking in electrical conductivity for seeds of the species, for the establishment of specific methodology for assessing the vigor through this test. Seed samples of two lots were tested in combinations with 25, 50 and 75 seeds in volumes of 25, 50 and 75 mL of distilled water, at times 24, 48 and 72 hours of imbibition. To Chapters 2, 3 and 4 were used only seed lot II, collected in 2012, which were put to soak at the constant temperatures of 10, 25, 30 and 40 ° C. In the second chapter, were evaluated the percentage, speed and time of germination of seeds at each temperature, and the ability to rollback the seeds when transferred to 25 ° C after exposure to temperatures of 10 and 40 ° C. Were also evaluated biometric changes in seeds at constant temperatures of 10, 25, 30 and 40 ° C by means of the analysis of water content, fresh weight, length, width and thickness of the seed, and length and fresh weight of embryonic axes. In the third chapter were studied the mobilization of reserve substances in cotyledons of seeds of *M. brauna* during germination at different temperatures, and quantified the concentrations of lipids, soluble sugars, starch and soluble proteins, and the activities of the enzymes α -amylase, β -amylase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. The fourth chapter studied the structural and histochemical changes in cotyledons and embryonic axes of *M. brauna* seeds during germination at temperatures 10, 25, 30 and 40 ° C. Results indicated that the electrical conductivity test should be conduct at time of 48

hours of soaking, with 50 seeds and 50 mL of water. For germination, the seeds of *M. brauna* had higher average at temperatures of 25 and 30 ° C, with values of 93 and 98%, respectively, while the temperatures of 10 and 40 ° C germination was 5%. The soaking of seeds at 10 and 40 ° C with subsequent return to 25 ° C resulted in increases in germination at all times studied. Changes in reserves of soluble carbohydrates showed the strongest evidence of decline during the period of germination of *Melanoxylon brauna*, especially at 25 and 30 ° C, where the activity of the enzymes α -amylase, β -amylase and glucose-6-phosphate dehydrogenase increases with seed imbibition, generating substrate for the respiration and formation of carbon structures for growth. The proteins decrease significantly in the early period after germination, at a temperature of 30 ° C. At temperatures 10 and 40 ° C, above and below the optimum range for germination of the species, the activity of the enzymes α -amylase, β -amylase and glucose-6-phosphate dehydrogenase is reduced, impairing proper development of the germination process. Anatomically, it was possible to visualize the lipid reserves remained constant during the study period, being responsible for the maintenance of seedlings after the start of growth. As a result, were observed the formation of starch granules in the seeds after radicle protrusion at 30 ° C, results consistent with the information collected for enzymatic activity and seed germination at this temperature. The structural analysis confirms the presence of vacuolated cells, elongated, juxtaposed with intense cellular activity after onset of imbibition.

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, tem se intensificado o interesse na propagação de espécies florestais nativas, em razão da necessidade de recuperação de áreas degradadas e recomposição da paisagem, decorrentes do desmatamento e do avanço da agricultura.

Dentre as espécies de importância ecológica e econômica está *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae), popularmente conhecida como braúna, e que ocorre naturalmente na floresta pluvial da encosta atlântica das regiões Nordeste e Sudeste, especialmente nos Estados da Bahia, São Paulo e Minas Gerais (Lorenzi, 2009). É uma espécie muito conhecida pela qualidade e durabilidade de sua madeira, que apresenta característica acastanhada, quase negra nos espécimes mais velhos, sendo considerada uma madeira de lei de grande valor econômico (Carvalho, 2003). Devido a estes aspectos, sua madeira tem sido alvo de devastação e a espécie está incluída na “Lista oficial da flora brasileira ameaçada de extinção”, na categoria vulnerável, estabelecida pela Instrução Normativa 06/2008 (MMA, 2008). Assim, tem sido necessário aprofundar investigações científicas sobre a(s) estratégia (s) de propagação da espécie, em particular com ênfase na sua germinação, a qual constitui a via mais utilizada na propagação de *M. brauna*.

A utilização de sementes de boa qualidade fisiológica é ponto fundamental na produção florestal, para atender aos diversos fins. Neste contexto, alguns testes foram desenvolvidos para avaliação da qualidade das sementes, visando fornecer informações rápidas e precisas sobre o vigor de um determinado lote. Dentre estes, destaca-se o teste de condutividade elétrica, que tem como princípio a avaliação da permeabilidade das membranas celulares, por meio da quantidade de lixiviados das sementes durante a condução do teste (Vieira e Kryzanowski, 1999). Este tem sido usado com sucesso na comparação da viabilidade e vigor de sementes florestais, por ser um método rápido, preciso e de fácil determinação (Santos e Paula, 2005; Ataíde et al., 2012).

A germinação das sementes é um estágio fundamental no ciclo de vida das plantas (Mei e Song, 2010) e consiste em um complexo e ordenado conjunto de eventos fisiológicos e bioquímicos que resulta na ruptura do tegumento pela raiz primária, a qual se desenvolve até o ponto em que forma uma nova planta com plenas condições de nutrir-se por si só (Kramer e Kozlowski, 1972). A germinação é influenciada tanto por fatores externos (luz, temperatura, disponibilidade de água e de oxigênio), como por fatores internos às sementes (inibidores e promotores da germinação), os quais podem atuar isoladamente ou em interação com os demais (Borges e Rena, 1993).

Dentre estes fatores, a temperatura assume papel de destaque no processo, na medida em que determina a capacidade e taxa de germinação das sementes (Baskin e Baskin, 1998), auxilia na superação de dormência primária e / ou secundária (Brandel, 2004) e afeta a velocidade de absorção de água pelas sementes e as reações bioquímicas que determinam todo o processo (Carvalho e Nakagawa, 2000).

Para cada espécie, a germinação ocorre dentro de limites definidos de temperatura: temperaturas mínima, ótima e máxima, que caracterizam sua distribuição geográfica (Floriano, 2004). 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 destas, não ocorre germinação (Laboriau, 1983; Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989). Dessa forma, a exposição das sementes a temperaturas extremas durante a germinação é um fator de estresse que diminui a eficiência metabólica do processo, reduzindo ou interrompendo seu desenvolvimento.

Em altas temperaturas, ocorre a desorganização da bicamada lipo-protéica das membranas celulares, com conseqüente perda da semipermeabilidade das membranas (Badea e Basu, 2009). Segundo Blum e Sinmena (1994), em sementes submetidas a altas temperaturas a eficiência de utilização das reservas para o processo germinativo é diminuída, com menor consumo de carboidratos no processo respiratório, o que prejudica o desenvolvimento da plântula. Em nível molecular, altas temperaturas afetam negativamente o metabolismo e funcionamento celular (Berry e Björkman, 1980; Levitt, 1980). De acordo com Alka e Khanna-Chopra (1995), a inabilidade de crescimento do embrião à alta temperatura pode ser decorrente da inibição da síntese de proteínas, além da redução na atividade das enzimas como ATPase, α -amilase, glutamina sintase e fumarase. Ao mesmo tempo, tais temperaturas induzem a síntese e acúmulo de proteínas novas, incluindo proteínas de choque térmico (Vierling, 1991; Feder e Hofmann, 1999; Law e Brandner, 2001).

Sob temperaturas baixas, por outro lado, o metabolismo é reduzido e ocorre menor absorção de água pelas sementes (Amaral e Paulilo, 1992) devido ao aumento da viscosidade da água em baixas temperaturas, resultando em diminuição das reações metabólicas e do fluxo de oxigênio para o embrião (Chakraborty e Kar, 2008). Em baixas temperaturas há redução na respiração das sementes e no crescimento da radícula, provavelmente pela inibição da mitose celular (Simon et al., 1976).

Outro campo de destaque no estudo da germinação das sementes é a compreensão da anatomia e da histoquímica do processo germinativo. A análise da anatomia e da histoquímica assume papel chave na compreensão dos mecanismos associados à germinação das sementes, permitindo a visualização das alterações celulares e de tecidos relacionadas à este processo, assim como à mobilização das reservas para o desenvolvimento da plântula após a germinação.

As mudanças estruturais e anatômicas relacionadas à germinação e ao metabolismo das reservas armazenadas em sementes têm sido descritas por muitos autores, destacando-se as análises em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Corte et al., 2008), *Acrocomia aculeata* (Bicalho, 2011) e *Sorghum bicolor* (Oliveira et al., 2011). Estas alterações podem ser relacionadas também aos estresses submetidos às sementes durante o processo germinativo, fornecendo subsídios para o monitoramento do desempenho das mesmas sob condições de estresse, como aqueles sob temperaturas acima ou abaixo da faixa ótima de germinação.

Face à relevância destes estudos e à escassez de informações com espécies florestais, propõe-se neste trabalho analisar as alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas que ocorrem durante a germinação de sementes de *M. brauna* em diferentes temperaturas. Estas informações, além de relevantes para a pesquisa, são essenciais para o melhor entendimento dos processos ecológicos de estabelecimento de plantas, sucessão e regeneração dentro das comunidades, constituindo ferramenta básica na conservação da espécie, seja para cultivos comerciais, ou para reflorestamento e preservação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKA, S.; KHANNA-CHOPRA, R. Influence of temperature on germination and seedling growth and its relationship with amylase activity and respiration in wheat varieties differing in temperature tolerance. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.33, p.775-779, 1995.

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.

ATAÍDE, G. M.; FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L.; RESENDE, R. T. Adequação da metodologia do teste de condutividade elétrica para sementes de *Pterogyne nitens* Tull. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 4, p. 635-640, 2012.

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.

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

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press. 666p. 1998.

BERRY, J.; BJORKMAN, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology** v. 198a, n. 31, p. 491-543, 1980.

BICALHO, E. M. **Germinação e mobilização de reservas de sementes de macaúba** (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia). 2011. 71 p.

BLUM, A.; SINMENA, B. Wheat seed endosperm utilization under heat stress and its relation to thermotolerance in the autotrophic plant. **Field Crops Research**, v. 37, p. 185-191, 1994.

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.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações, silviculturas, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília: Embrapa-SPI, 638 p, 2003.

CHAKRABORTY, R.; KAR, R.K. Differential water uptake kinetics in axes and cotyledons during seed germination of *Vigna radiata* under chilling temperature and cycloheximide treatment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 4, p. 277-284, 2008.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; VENTRELLA, M. C.; LEITE, I. T. A.; BRAGA, A. J. T. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. **Revista Árvore**, v. 32, n. 4, p. 641-650, 2008.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. R. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 61, p. 243-282, 1999.

FLORIANO, E. P. **Germinação e dormência de sementes florestais**. In: HOPPE, J.M. Produção de sementes e mudas florestais. Santa Maria: Série Cadernos Didáticos UFSM, 2004.

KRAMER, J. P.; KOSWLOSKI, T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1972. 745 p.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da O.E.A., 1983. 173p.

LAW, R. F.; BRANDNER, S. J. C. High temperature stress increases the expression of wheat leaf ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 386, n. 2, p. 261-267, 2001.

LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stress**. Vol.1. Chilling, freezing and high temperature stresses. New York: Acad. Press, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2009.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon Press, McMillan, 236 p. 1989.

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**, v. 11, n. 12, p. 965-972, 2010.

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.

MMA – Instrução Normativa nº 6 de 23 de setembro de 2008. Ministério do Meio Ambiente. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção** – acesso em 1/05/2013. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/arquivos/83_19092008034949.pdf>

OLIVEIRA, A. B.; ALENCAR, N. L. M.; GALLÃO, M. I.; GOMES FILHO, E. Avaliação citoquímica durante a germinação de sementes de sorgo envelhecidas

artificialmente e osmocondicionadas, sob salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 223-231, 2011.

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, p.209-216, 2007.

SANTOS, S.R.G.; PAULA, R.C. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Bail) Smith & Downs – Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.2, p.136-145, 2005

SIMON, E. W.; MINCHIN, A.; MCMENAMIN, M. M.; SMITH, J. M. The low temperature limit for seed germination. **New Phytologist**, v. 77. p. 301-311, 1976.

VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.4, p.1- 26.

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.579-620, 1991.

CAPÍTULO I

Adequação da metodologia do teste de condutividade elétrica para sementes de Melanoxylon brauna Schott. (Fabaceae)

Resumo

O teste de condutividade elétrica tem sido utilizado para avaliar o vigor das sementes de uma dada espécie e apresenta como vantagens sua fácil condução, inferência sobre o possível uso e manejo das mesmas em curto espaço de tempo. Neste contexto, o objetivo neste trabalho foi avaliar diferentes metodologias para o teste de condutividade elétrica, com variações na quantidade de sementes utilizadas, volume de água e tempo de embebição, para determinação da viabilidade e vigor de sementes de *Melanoxylon brauna*. Foram utilizadas sementes pertencentes a dois lotes, coletadas nos anos 2010 e 2012, os quais foram denominados lote I e lote II, respectivamente. Para o teste de condutividade elétrica (CE) foram testadas as combinações de 25, 50 e 75 sementes, em volumes de 25, 50 e 75 mL de água destilada, nos tempos 24, 48 e 72 horas de embebição, sendo as sementes pesadas em balança de precisão, incubadas em câmara B.O.D. em temperatura constante de 25 °C e a CE determinada com condutímetro micronal modelo B220. Pelos resultados observou-se melhor desempenho das sementes no lote II em relação ao lote I, tanto nos teste de germinação, quanto no vigor medido no IVG e nas médias de condutividade, em todas as combinações testadas. Houve tendência de decréscimo nos valores de CE na medida em que se aumentou a quantidade de água utilizada no teste e o tempo de embebição das sementes, para os dois lotes avaliados. Para diferenciar lotes de sementes de *Melanoxylon brauna* quanto à sua qualidade fisiológica, o teste de condutividade elétrica deve ser conduzido no tempo de 48 horas de embebição, com 50 sementes e 50 mL de água.

Palavras-chave: vigor, braúna, germinação, sementes florestais.

CHAPTER I

Adequation of methodology of electrical conductivity test for *Melanoxylon brauna* Schott. seeds (Fabaceae)

Abstract

The electrical conductivity test has been used to assess the vigor of the species, and has advantages such as its easy driving, allowing inferences about the possible use and administration of them in a short time. In this context, the aim of this study was to evaluate the influence of the quantity of seeds, water volume and time of soaking in the conductivity test for *Melanoxylon brauna* seeds, aiming to establish a specific methodology for assessing seed vigor of the species. Seed samples from two batches collected in the years 2010 and 2012, were designated Lot I and Lot II, respectively. For the electrical conductivity (EC) were tested in combinations of 25, 50 and 75 seeds in volumes of 25, 50 and 75 mL of distilled water, at times 24, 48 and 72 hours of soaking. The seeds was being weighed in precision balance, incubated in growth chamber constant temperature of 25 ° C and EC was determined in conductivity Micronal model B220. The results indicated the superiority of batch II compared to the batch I, both in test germination as in vigor, measured by the IVG and the conductivity, in all the combinations tested. The EC values tended to decrease the extent that it increases the amount of water used in the test, and increased when increasing the time of soaking the seeds, for the two batches evaluated. To differentiate seed lots of *Melanoxylon brauna* for their vigor, the electrical conductivity test should be conducted in time 48 hours of soaking, with 50 seeds and 50 mL of water.

Keywords: vigor, brauna, germination, forest seeds

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a recuperação dos ecossistemas florestais degradados e manutenção da biodiversidade têm sido foco constante de políticas governamentais e interesse da sociedade em geral. Dentre as espécies do bioma Mata Atlântica com potencial para pesquisas, destaca-se *Melanoxylon brauna*, conhecida popularmente como braúna ou braúna preta, espécie arbórea utilizada na construção civil, paisagismo (Lorenzi, 2009) e de alto valor comercial. Atualmente, está incluída na “Lista das espécies da flora brasileira ameaçada de extinção”, na categoria vulnerável (MMA, 2008).

A propagação da espécie é feita via seminal, sendo indispensável a utilização de sementes de boa qualidade. A qualidade fisiológica de um lote de sementes é requisito essencial para avaliação do seu potencial de uso e conservação, e pode ser medida pela capacidade de germinação e pelo vigor das sementes. Segundo Rajjou et al. (2012), o vigor de sementes pode ser definido como todas as características intrínsecas de um determinado lote que determinam seu potencial para que este tenha uma emergência rápida e uniforme em campo, sob uma ampla faixa de condições ambientais.

Dentre os testes utilizados para a avaliação do vigor das sementes, o teste de condutividade elétrica analisa a quantidade de exsudatos lixiviados das sementes durante a embebição. Este teste baseia-se no princípio de que em sementes mais deterioradas a velocidade de restabelecimento da integridade das membranas celulares durante a embebição é menor e, em consequência, liberam mais solutos para o meio aquoso (Vieira e Kryzanowski, 1999), incluindo açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, proteínas, enzimas e íons orgânicos (Marcos Filho, 2005). Assim, sementes mais vigorosas mantem sua estrutura de semipermeabilidade das membranas celulares mais conservada que sementes menos vigorosas, e menos eletrólitos são liberados no meio.

A metodologia apropriada para o teste de condutividade elétrica pode ser diferenciada para as espécies vegetais. Na condução do teste, os resultados e a comparação de vigor das sementes podem ser afetados pela quantidade de água, quantidade de sementes utilizada, tempo de embebição até a medição dos eletrólitos lixiviados, temperatura de embebição e qualidade do lote (Vieira e Kryzanowski, 1999), sendo necessário o estudo dos fatores envolvidos, especialmente em sementes florestais, onde são escassas as informações.

Marques e Paula (2002a,b) concluíram que esse teste foi eficiente na diferenciação de lotes de sementes de *Dalbergia nigra*, indicando a utilização de 50

sementes embebidas em 75 mL de água deionizada por 30 ou 36 horas. Para *Sebastiania commersoniana*, o teste de condutividade elétrica mostrou-se promissor para a diferenciação de lotes de sementes, podendo ser conduzido a 25 °C, com o uso de 75 sementes embebidas em 75 mL de água por 24 horas. Na condução do teste com *Pterogyne nitens*, Ataíde et al. (2012) recomendam a utilização de 50 sementes embebidas em 50 mL de água destilada durante o período de 24 horas, enquanto para sementes de *Albizia hassleri* o teste conduzido a 25 °C por períodos de 2 a 120 h de embebição não foi eficiente para discriminar diferentes matrizes quanto à qualidade das sementes (Gonzales et al., 2009).

Segundo Vieira e Kryzanowski (1999), o teste de condutividade elétrica apresenta como vantagens sua fácil condução, além da aplicação prática para determinar o vigor das sementes, permitindo inferir sobre o possível uso e manejo das mesmas em curto espaço de tempo.

Neste contexto, o objetivo no presente trabalho foi avaliar diferentes metodologias para o teste de condutividade elétrica, com variações na quantidade de sementes utilizadas, volume de água e tempo de embebição, para determinação da viabilidade e vigor de sementes de *Melanoxylon brauna*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Sementes Florestais da Universidade Federal de Viçosa, no período de outubro de 2012 a janeiro de 2013, com sementes de *Melanoxylon brauna* colhidas em árvores matrizes no município de Leopoldina, MG, em setembro dos anos de 2010 e 2012, as quais constituíram os lotes I e II, respectivamente. Os frutos foram secos ao sol e foi realizado o beneficiamento manual das sementes, durante o qual foram eliminadas as sementes imaturas, deterioradas ou danificadas por pragas e insetos. As sementes selecionadas foram acondicionadas em tambores de fibra e armazenadas em câmara fria a 5 °C e 60% U.R. até a realização dos experimentos.

Sementes pertencentes aos dois lotes foram colocadas para germinar sobre duas folhas de papel toalha (tipo germitest), em placas de Petri, por 10 dias, em câmara tipo Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) com temperatura constante de 25 °C e luz constante, sendo a germinação determinada pela contagem diária das sementes que emitiram raiz. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo a fórmula proposta por Maguire (1962).

Para a condução do teste de condutividade elétrica (CE) foram testadas as seguintes combinações: 25, 50 e 75 sementes, imersas em volumes de 25, 50 e 75 mL de água destilada, por tempos de 24, 48 e 72 horas de embebição. Para cada combinação, as sementes foram inicialmente pesadas em balança com precisão de 0,01 g e em seguida colocadas em copos descartáveis com água destilada no volume selecionado, sendo então incubadas em câmara tipo B.O.D., em temperatura constante de 25 °C. Após cada período de embebição, a condutividade elétrica foi medida usando-se condutivímetro MICRONAL modelo B 330, com constante $K = 1,0$, cujos resultados foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Foram estabelecidas cinco repetições por tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo as condutividades dos lotes I e II comparadas em esquema fatorial $3 \times 3 \times 3$ (quantidades de sementes, volumes de água destilada e tempos de embebição). Para verificar a normalidade dos dados, foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Lilliefors e, para a homogeneidade da variância, empregaram-se os testes de Cochran e de Bartley. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA), sendo os desdobramentos das médias de germinação, IVG e CE entre os dois lotes feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores das interações entre as médias de condutividade dentro dos diferentes fatores (períodos de embebição, quantidade de água e quantidade de sementes) por lote foram analisados por meio de análises de regressão polinomial. Os resultados do teste de CE foram correlacionados aos da porcentagem de germinação e IVG através de correlação simples, a 5%, pelo teste F. As análises foram feitas com auxílio do software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem média de germinação das sementes de *M. brauna* pertencentes ao Lote I foi estatisticamente inferior em relação à observada nas sementes do Lote II, correspondendo a valores de 54 e 92%, respectivamente (Figura 1a). Para o IVG, foi observado comportamento semelhante, com maior vigor nas sementes do Lote II (Figura 1b). As diferenças observadas na germinação e IVG entre os lotes indicam menor viabilidade e vigor das sementes do Lote I, coletadas no ano de 2010, em comparação às sementes coletadas em 2012 (Lote II). De acordo com Bewley et al. (2013), a deterioração é influenciada por fatores ambientais (temperatura e umidade

relativa do local de armazenamento), genéticos (espécie ou lote de sementes, qualidade inicial da semente) e presença de fungos e bactérias.

Durante o armazenamento, ocorrem alterações fisiológicas e bioquímicas nas sementes associadas à deterioração dos tecidos e perda da capacidade germinativa, tais como a desestruturação do sistema de membranas observada em sementes de *Phaseolous vulgaris* (Lee et al., 2012) e o aumento nos níveis de peroxidação lipídica e diminuição das atividades de enzimas do complexo antioxidante em *Medicago Sativa* e *Melanoxylon brauna* (Cakmak et al., 2010; Corte et al., 2010), resultando na perda da qualidade das sementes.

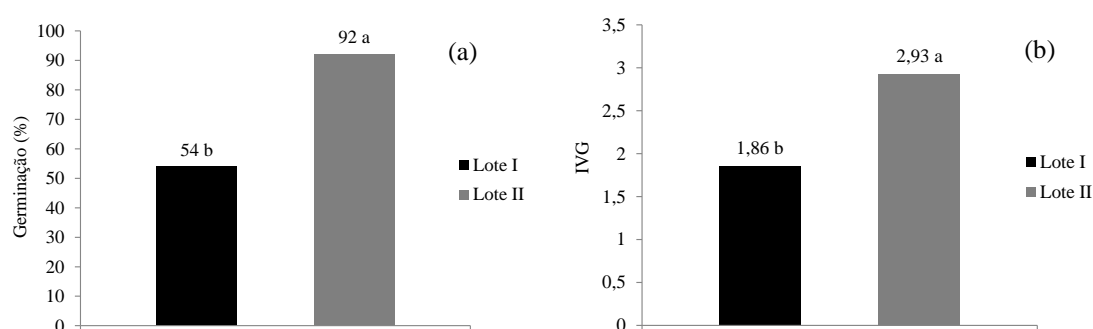


Figura 1. Germinação (a) e índice de velocidade de germinação (IVG) (b) de sementes de *Melanoxylon brauna* dos lotes I e II, coletadas nos anos 2010 e 2012, respectivamente.

Dentro de cada combinação entre quantidade de sementes, volume de água e tempo de embebição, observa-se valores superiores de condutividade elétrica para as sementes do lote I quando comparados aos valores do lote II (Tabela 1). Assim, constatou-se que o teste de condutividade elétrica manteve a mesma ordenação de vigor das sementes em relação ao teste de germinação e ao IVG, sendo o lote II mais vigoroso que o lote I.

Para o lote I, houve redução contínua e significativa da condutividade elétrica com o aumento do volume de água em todas as combinações. No lote II, tal comportamento não foi observado nas embebições de 50 sementes por 48 horas e 25 sementes por 72 horas, onde nos volumes de água 50 e 75 mL as médias de condutividade elétrica foram estatisticamente iguais. Na análise entre as médias das quantidades de sementes utilizadas, verificou-se que, de maneira geral, o aumento de 25 para 50 ou 75 sementes não acarretou acréscimos na lixiviação de exsudatos, exceto na embebição das sementes do lote I por 48 horas em 50 e 75 mL de água destilada. Nestas

condições, com a utilização de 50 mL de água, o aumento de 25 para 50 ou 75 sementes representa aumento significativo de 13,26 $\mu\text{s. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ para 16,77 e 16,28 $\mu\text{s. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente. Em volume de 75 mL de água, o que acarreta diferença na condutividade elétrica é o aumento de 50 para 75 sementes, ao passar de valores de 7,87 $\mu\text{s. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ para 10,62 $\mu\text{s. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Tabela 1. Valores de condutividade elétrica ($\mu\text{s. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) de sementes de *Melanoxylon brauna* dos lotes 2010 e 2012 em função das alterações nas quantidades de sementes, quantidades de água e tempo de embebição na condução do teste.

Quantidade de água (mL)	Lote I			Lote II		
	Quantidade de sementes					
	25	50	75	25	50	75
Tempo de embebição: 24 horas						
25	15,428 Ca	17,833 Cb	15,265 Ca	11,088 Ca	9,974 Ca	11,304 Ca
50	8,978 Bb	9,168 Bb	7,630 Ba	5,356 Ba	6,043 Ba	5,568 Ba
75	8,239 Aa	6,329 Ab	5,112 Aa	3,629 Aa	3,900 Aa	3,476 Aa
Tempo de embebição: 48 horas						
25	22,505 Ca	32,720 Cc	27,161 Cb	10,786 Ca	13,404 Ca	13,138 Ca
50	13,260 Ba	16,768 Bb	16,275 Bb	8,413 Ba	7,327 Ba	7,741 Ba
75	7,410 Aa	7,872 Aa	10,619 Ab	5,308 Ab	5,007 Bab	4,431 Aa
Tempo de embebição: 72 horas						
25	32,147 Cb	38,915 Cc	28,577 Ca	12,884 Ca	16,816 Cb	15,747 Cb
50	16,232 Bb	21,392 Bc	10,955 Ba	7,204 Ba	8,118 Ba	7,880 Ba
75	10,682 Ab	11,353 Ab	7,009 Aa	6,282 Ba	4,687 Aa	4,498 Aa

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula nas colunas, dentro de cada tempo de embebição e quantidade de sementes, e minúscula nas linhas, dentro de cada lote e quantidade de água, não diferem entre si, a 5%, pelo teste de Tukey.

Com o aumento do tempo de embebição foram observados acréscimos nos valores de condutividade elétrica das sementes dos Lotes I e II (Figura 2a). No entanto, a taxa de liberação dos exsudatos acontece de forma desigual entre os lotes de qualidades diferentes, de forma que a tendência dos modelos polinomiais ajustados apresenta comportamento distinto. O Lote I, de vigor inferior, apresentou maiores médias de condutividade elétrica em todos os tempos de embebição analisados, sendo a média de condutividade de 19,82 $\mu\text{s. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ após 72 horas de embebição, valor este superior à média observada para o Lote II (9,35 $\mu\text{s. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$).

Esta diferença na lixiviação medida entre os lotes pode ser explicada pela deterioração das membranas celulares das sementes. Sementes mais deterioradas

apresentam maior permeabilidade das membranas devido à sua desestruturação e menor capacidade de reorganização, o que facilita a saída de solutos durante o teste de condutividade elétrica.

Segundo Menezes et al. (2007), inicialmente ocorre uma intensa liberação dos lixiviados, tanto pelas sementes intactas e vigorosas, como pelas danificadas, tornando-se difícil a identificação de possíveis diferenças de qualidade entre os lotes nas primeiras horas de embebição. De acordo com os autores, a quantidade de lixiviados liberados pelas sementes vigorosas vai-se estabilizando com o decorrer deste processo, em razão, principalmente, da reorganização das membranas, favorecendo a ordenação dos lotes em níveis de qualidade.

Assim, é provável que seja necessário o tempo de 48 horas para que as membranas do lote de maior vigor retomem a forma líquida-cristalina, ou seja, organizada, adquirindo a semipermeabilidade e se diferenciando do lote de vigor inferior. A partir daí, a saída de solutos das células para o meio aquoso ocorrerá em menor intensidade que nas primeiras horas, o que justifica a condutividade medida, a qual tende à estabilização deste ponto em diante. Porém, a grande quantidade de exsudato liberado pelas sementes do Lote II já pode ter comprometido a qualidade das sementes, pela saída de componentes fundamentais do metabolismo.

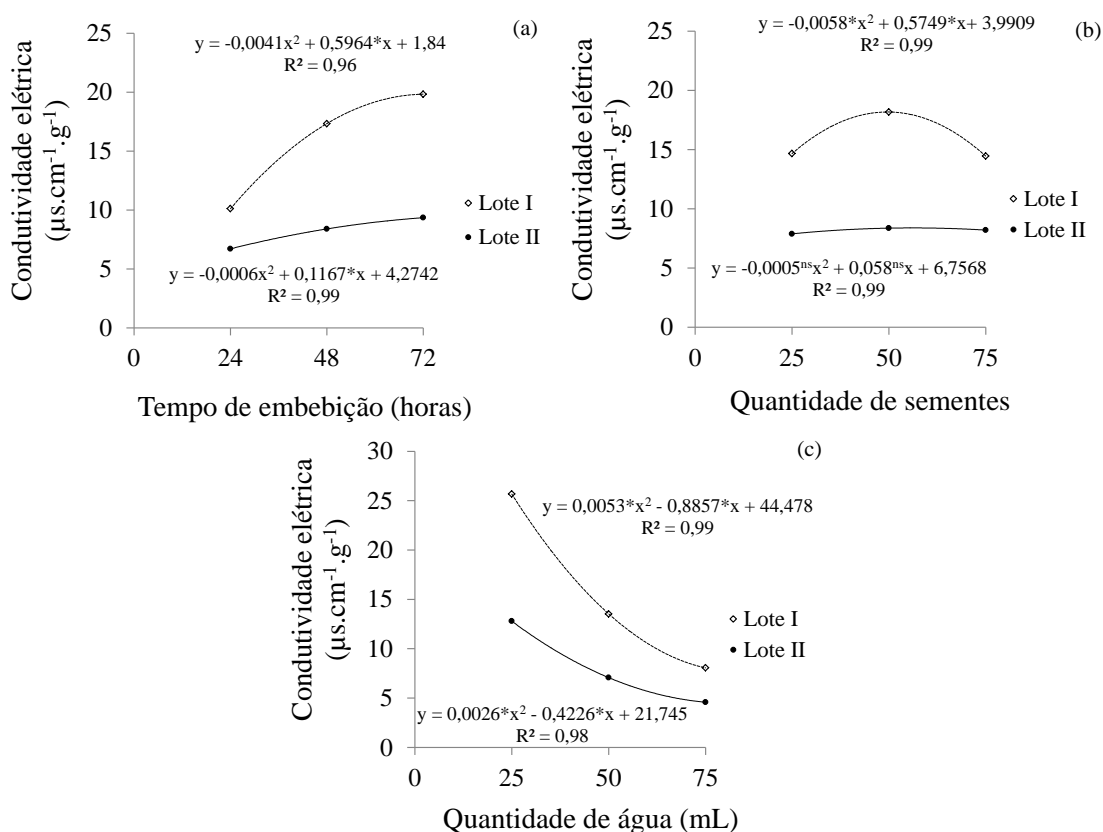


Figura 2. Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$) de sementes de *Melanoxylon brauna* dos lotes I e II, coletadas nos anos 2010 e 2012, respectivamente, em função do tempo de embebição (A), da quantidade de sementes (B) e do volume de água (C). * - significativo, a 5%, pelo teste t ($p < 0,05$).

Períodos de embebição iguais ou superiores a 36 horas permitiram melhor separação dos lotes de sementes de *Dalbergia nigra* (Marques et al., 2002a), enquanto a embebição por 24 horas possibilitou aumento no distanciamento das curvas de condutividade elétrica dos lotes de *Helianthus annuus* (Oliveira et al., 2012). Por outro lado, diversos estudos obtiveram distinção entre lotes de sementes logo nas primeiras horas de embebição, como nos ensaios conduzidos para as espécies *Senna siamea*, *Ricinus communis* e *Jatropha curcas*, que determinaram o período de imersão a ser utilizado no teste de condutividade elétrica como de seis horas (Dutra et al., 2007; Souza et al., 2009; Araújo et al., 2011). Para as espécies *Solanum sessiliflorum* e *Brassica napus*, duas e oito horas foram selecionadas como o tempo adequado para a condução do teste, respectivamente (Pereira e Martins Filho, 2012; Milani et al., 2012), indicando ser o período de imersão mais sensível às características das sementes das espécies que às variações do vigor entre os lotes.

Em relação ao número de sementes utilizado, foi observado aumento na condutividade elétrica com a utilização de 50 sementes no lote I, enquanto no lote II esta se manteve estável quando se alteraram as quantidades de sementes (Figura 2b). Maior massa de sementes, fixados os demais fatores de variação, implica em maior quantidade de lixiviados liberados na solução de embebição, se considerados apenas os valores de compostos liberados na leitura da condutividade. No entanto, a similaridade nas médias de condutividade elétrica em 25, 50 e 75 sementes pode ser explicada pela divisão pela massa das sementes ($\mu\text{s. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), indicando equivalência na liberação de solutos por grama de massa fresca.

Para espécies florestais, que apresentam grande variabilidade genética em termos de maturação e tamanho de sementes (Bonner, 1998), tem sido constatado que a utilização de maior número de sementes implica em melhor diferenciação dos lotes, como para *Sebastiania commersoniana* (Santos e Paula, 2005) e para *Guazuma ulmifolia* (Gonçalves et al., 2008), onde o emprego de 75 sementes permitiu regularidade dos resultados. Para *Pterogyne nitens*, a quantidade de 50 sementes foi adequada para a condução do teste de condutividade elétrica (Ataíde et al., 2012).

Em ambos os lotes, à medida em que houve aumento no volume de água foi observada diminuição gradativa nos valores de condutividade elétrica, os quais corresponderam a médias próximas a 8 e 5 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ em 75 mL, para os Lotes I e II, respectivamente (Figura 2c). Para uma mesma massa de sementes, a estrutura líquida-cristalina das membranas hidratadas permite a passagem de uma quantidade definida de exsudatos na presença de água, devido às suas características de semipermeabilidade. Volumes superiores de água implicam em menor concentração destes solutos liberados pelas sementes, resultando, conseqüentemente, em médias inferiores na condutividade medida.

Esta hipótese também foi verificada em sementes de *Dictyloma vandellianum*, onde foram avaliados volumes de 50, 75 e 100 mL de água, sendo constatado que em 100 mL as médias de condutividade elétrica diminuíram em relação à condutividade medida em 50 e 75 mL (Flavio e Paula, 2010). Para *Solanum melongena*, quando compararam-se 50 e 75 mL na condução do teste de condutividade elétrica, observou-se mesmo comportamento, com menores valores de condutividade elétrica quando foram utilizados 75 mL de água (Alves et al., 2012).

Com a utilização de 75 mL de água, a estratificação dos lotes quanto ao vigor torna-se menos eficiente (Figura 2c), devido principalmente à diluição dos lixiviados. Comportamento semelhante foi verificado por Pereira e Martins Filho (2012), onde volumes inferiores permitiram melhor separação de lotes de sementes de *Solanum sessiliflorum* de qualidades distintas. Menores volumes de água também foram apropriados para os testes de condutividade elétrica conduzidos por Marques et al. (2002b), Lopes e Franke (2010) e Milani et al. (2012), com as espécies *Dalbergia nigra*, *Lolium multiflorum* e *Brassica napus*, respectivamente, indicando relação direta entre a diferenciação em classes de vigor e a quantidade de água utilizada.

Entretanto, a medição pode ser dificultada ao optar-se pela utilização de volumes como 25 mL, dependendo do tamanho e da quantidade de sementes a serem utilizadas, sendo recomendado o volume de água de 50 mL para sementes de *M. brauna*, volume que também proporcionou clara separação na condutividade elétrica entre os lotes.

Pela análise dos coeficientes de correlação simples entre as variáveis do teste de condutividade elétrica e dos testes de germinação e IVG, foram observadas correlações negativas nas diferentes combinações, variando de -0,59 a -0,88 (Tabela 2). Destacou-se, pela possibilidade de estratificação dos lotes em classes de vigor, associada aos altos graus de correlação significativa com a germinação ($r = -0,86$) e o IVG ($r = -0,84$), e

aos fatores já discutidos para a Figura 3, a combinação de 48 horas de embebição, 50 sementes e 50 mL de água na condução do teste de condutividade elétrica.

Tabela 2. Coeficientes de correlação simples (r) entre os valores médios de germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) e condutividade elétrica variando o tempo de embebição, a quantidade de água e de sementes.

Tempo de embebição (horas)	Quantidade de sementes	Quantidade de água (mL)	Coeficientes de correlação	
			G	IVG
24	25	25	-0,70*	-0,66*
		50	-0,76*	-0,71*
		75	-0,84*	-0,81*
	50	25	-0,79*	-0,78*
		50	-0,76*	-0,72*
		75	-0,80*	-0,79*
	75	25	-0,63	-0,59
		50	-0,80*	-0,78*
		75	-0,85*	-0,83*
48	25	25	-0,87*	-0,84*
		50	-0,83*	-0,81*
		75	-0,87*	-0,84*
	50	25	-0,87*	-0,85*
		50	-0,86*	-0,84*
		75	-0,80*	-0,79*
	75	25	-0,83*	-0,80*
		50	-0,83*	-0,81*
		75	-0,83*	-0,80*
72	25	25	-0,82*	-0,78*
		50	-0,86*	-0,85*
		75	-0,79*	-0,83*
	50	25	-0,82*	-0,79*
		50	-0,83*	-0,80*
		75	-0,83*	-0,81*
	75	25	-0,82*	-0,79*
		50	-0,88*	-0,86*
		75	-0,87*	-0,85*

CONCLUSÕES

O teste de condutividade elétrica conduzido com 50 sementes em 50 mL por 48 horas é eficiente para diferenciar lotes de sementes de *Melanoxylon brauna* quanto à sua qualidade fisiológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C. Z.; GODOY, A. R.; CANDIDO, A. C. S.; OLIVEIRA, N. C. Teste de condutividade elétrica na avaliação do potencial fisiológico de sementes de berinjela. **Ciência Rural**, v. 42, n. 6, p. 975-980, 2012.

ARAUJO, R. F.; ZONTA, J. B.; ARAUJO, E. F.; DONZELES, S. M. L.; COSTA, G. M. Teste de condutividade elétrica para sementes de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). **IDESIA**, v. 29, n. 2, p.79-86, 2011.

ATAÍDE, G. M.; FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L.; RESENDE, R. T. Adequação da metodologia do teste de condutividade elétrica para sementes de *Pterogyne nitens* Tull. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 4, p. 635-640, 2012.

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

BONNER, F.T. Testing tree seeds for vigor: a review. **Seed Technology**, v.20, n.1, p.5-17, 1998.

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

CHWEDORZEWSKA, K.J.; BEDNAREK, P.T.; PUCHALSKI, J.; KRAJEWSKI, P. AFLP-profiling of long-term stored and regenerated rye genebank samples. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.7, n.2, p.457,463, 2002a.

CHWEDORZEWSKA, K.J.; BEDNAREK, P.T.; PUCHALSKI, J. Studies on changes in specific rye genome regions due to seed aging and regeneration. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.7, n.2, p.569-576, 2002b.

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; LEITE, H.G.; PEREIRA, B.L.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.

DELOUCHE, J.C.; MATTHES, R.K.; DOUGHERTY, G.M.; BOYD, A.H. Storage of seed in sub-tropical and tropical regions. **Seed Science and Technology**, v.1, p.663-692, 1973.

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

- FLAVIO, J.J.P.; PAULA, R.C. Testes de envelhecimento acelerado e de condutividade elétrica em sementes de *Dictyoloma vandellianum* A. Juss. **Scientia Forestalis**, v.38, n.87, p.391-399, 2010.
- GONÇALVES, E.P.; PAULA, R.C.; DESMATLÊ, M.E.S.P. Testes de vigor em sementes de *Guazuma ulmifolia* Lam. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.2, p.265-276, 2008.
- GONZALES, J.L.S.; PAULA, R.C.; VALERI, S.V. Teste de condutividade elétrica em sementes de *Albizia hassleri* (Chodat) Burkart. Fabaceae-Mimosoideae. **Árvore**, v.33, n.4, p.625-634, 2009.
- LEE, J.; WELTI, R.; ROTH, M.; SCHAPAUGH, W.T.; LI, J.; TRICK, H.N. Enhanced seed viability and lipid compositional changes during natural ageing by suppressing phospholipase Da in soybean seed. **Plant Biotechnology Journal**, v.10, p. 164–173, 2012.
- LOPES, R.R.; FRANKE, L.B. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de azevém (*Lolium multiflorum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.123-130, 2010
- LORENZI, H.E. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed., v.1. São Paulo: Instituto Plantarum. 2009.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination: aid in selection and evaluating or seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.
- 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, 2002a.
- MARQUES, M.A.; PAULA, R.C.; RODRIGUES, T.J.D. Efeito do número de sementes e do volume de água na condutividade elétrica de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr.All. ex Benth. **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, n.1, p.254-262, 2002b
- MENEZES, N.L.; GARCIA, D.C.; BAHRY, C.A.; MATTIONI, N.M. Teste de condutividade elétrica em sementes de aveia preta. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.2, p.138-142, 2007.
- MILANI, M.; MENEZES, N.L.; LOPES, S.J. Teste de condutividade elétrica para avaliação do potencial fisiológico de sementes de canola. **Revista Ceres**, v.59, n.3, p. 374-379, 2012.

MMA – Instrução Normativa nº 6 de 23 de setembro de 2008. Ministério do Meio Ambiente. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção** – acesso em 1/05/2013. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>

NAKAYAMA, Y.; SAIO, K.; KITO, M. Decomposition of phospholipids in soybeans during storage. **Cereal Chemistry**, v.58, n.4, p.260-264, 1981.

NOWAKOWSKA, J.; RAKOWSKI, K. Accelerated and natural ageing processes change the properties of plasma membrane in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) seeds during storage. **Dendrobiology**, v.47, supplement, p.79-82, 2002.

OLIVEIRA, F.N.; PAIVA, E.P.; DUTRA, A.S. Qualidade fisiológica de sementes de girassol avaliadas por condutividade elétrica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, n.3, p.279-287, 2012.

PEREIRA, M.D.; MARTINS FILHO, S. Adequação da metodologia do teste de condutividade elétrica para sementes de cubiu (*Solanum sessiliflorum* DUNAL). **Revista Agrarian**, v.5, n.16, p.93-98, 2012.

REVILLA, P.; BUTRÓN, A.; RODRIGUÉZ, V.M.; MALVAR, R.A.; ORDÁS, A. Identification of genes related to germination in aged maize seed by screening natural variability. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.14, p.4151-4157, 2009.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v.331, p.796-805, 2008.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed Germination and Vigor. **Annual Review of Plant Biology**, v.63, p.507-533, 2012.

SANTOS, S.R.G.; PAULA, R.C. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Bail) Smith & Downs – Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.2, p.136-145, 2005

SOUZA, L.A.; CARVALHO, M.L.M.; KATAOKA, V.Y.; OLIVEIRA, J.A. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.60-67, 2009.

STATSOFT, Inc. **Statistic** (data analysis software system), Version 8. www.statsoft.com.

VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.4, p.1- 26.

VIJAY, D.; DADLANI, M.; KUMAR, P.A.; PANGULURI, S.K. Molecular marker analysis of differentially aged seeds of soybean and safflower. **Plant Molecular Biology Reproductive**, v.27, p.282-291, 2009.

CAPÍTULO II

Alterações fisiológicas e biométricas de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae) durante a germinação em diferentes temperaturas

Resumo

No presente trabalho teve-se como objetivo estudar as alterações biométricas e a germinação das sementes de *Melanoxylon brauna* em diferentes temperaturas. As sementes foram colocadas para germinar nas temperaturas constantes de 10, 25, 30 e 40 °C, sob luz contínua, sendo analisadas a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG). Em seguida, sementes após exposição às temperaturas de 10 e 40 °C, em intervalos de 24 horas, foram retiradas e transferidas para a temperatura de 25 °C, sendo avaliadas também a porcentagem de germinação, IVG e TMG. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram emissão de raiz primária. As alterações biométricas nas temperaturas constantes de 10, 25, 30 e 40 °C foram avaliadas por meio das análises do teor de água, massa fresca, comprimento, largura e espessura das sementes, e comprimento e massa fresca dos eixos embrionários. Nas sementes de *M. brauna*, as maiores médias de germinação foram verificadas nas temperaturas de 25 e 30 °C, com valores de 93 e 98%, respectivamente, enquanto nas temperaturas de 10 e 40 °C a germinação foi de 5%. O IVG foi significativamente maior a 30 °C. A embebição das sementes a 10 e 40 °C com posterior retorno a 25 °C resultou em acréscimos na germinação em todos os tempos estudados, em comparação às temperaturas constantes. Durante a germinação, as taxas de absorção de água pelas sementes e a massa fresca aumentaram à medida que se aumentou a temperatura. As médias de comprimento e largura das sementes aumentaram contínua e progressivamente durante a embebição em todas as temperaturas analisadas, enquanto as alterações na espessura permitiram melhor separação das temperaturas após 48 horas de embebição.

Palavras-chave: embebição, braúna, vigor, germinação.

CHAPTER II

Physiological and biometrical changes during germination of *Melanoxylon brauna* (Fabaceae Caesalpinoidea) Schott. seeds at different temperatures

Abstract

The present work aimed to study the biometrics changes and the germination of *Melanoxylon brauna* seeds at different temperatures. The seeds were germinated at constant temperatures of 10, 25, 30 and 40 ° C under continuous light, and analyzed the germination percentage, germination speed index (GSI) and mean germination time (MGT). Then, seeds were exposure to temperatures of 10 and 40 ° C at intervals of 24 hours, were removed and transferred to 25 ° C, and also evaluated the germination percentage, IVG and TMG. Were considered germinated seeds showing emission radicle. Changes biometric constant temperatures of 10, 25, 30 and 40 ° C were evaluated through analysis of water content, fresh weight, length, width and thickness of the seed, and length and fresh weight of embryonic axes. It was found that the seeds of *M. brauna* had higher average germination at 25 and 30 ° C, with values of 93 and 98%, respectively, while the temperatures of 10 and 40 ° C germination was 5%. The GSI was significantly higher at 30 ° C. The soaking of seeds at 10 and 40 ° C with subsequent return to 25 ° C resulted in increases in germination at all times studied, compared to constant temperatures. During germination, the rate of water absorption by seeds, and fresh weight increased as the temperature is increased. The average length and seed width continuously and progressively increased during soaking at all temperatures studied, while changes in the thickness of temperatures permitted a better separation after 48 hours of imbibition.

Keywords: imbibition, brauna, vigor, germination.

INTRODUÇÃO

Melanoxylon brauna, popularmente conhecida como braúna, braúna preta ou garaúna, é uma espécie arbórea pertencente à família botânica Fabaceae Caesalpinoideae, de ocorrência natural na Floresta Atlântica dos Estados Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Bahia e Espírito Santo (Lorenzi, 2008). Possui a madeira muito pesada e compacta, sendo própria para obras externas e hidráulicas, moirões, postes e construção civil (Carvalho, 2003). A árvore apresenta também características ornamentais que destacam sua utilização em projetos paisagísticos e para arborização de praças (Santos e Ramalho, 1996).

No entanto, face à exploração extrativista de sua madeira, a espécie atualmente encontra-se na “Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção”, na categoria vulnerável, segundo documento do Ministério do Meio Ambiente (2008), restando poucos fragmentos florestais com a espécie, em geral pequenos e isolados, como os destacados nos trabalhos de Carvalho et al. (2007), Crepaldi e Peixoto (2010) e Versieux et al. (2011). Neste contexto, estudos da germinação das sementes são o ponto de partida para o desenvolvimento de novas estratégias para a conservação da espécie, haja vista ser esta sua principal forma de propagação.

A germinação compreende um complexo e ordenado conjunto de eventos bioquímicos e fisiológicos, que se iniciam com a absorção de água pelas sementes, a qual irá desencadear a ativação do metabolismo, culminando com o surgimento do eixo embrionário (Bewley et al., 2013). Para que ocorra o rompimento do tegumento ou dos tecidos circundantes pelo embrião, diversos fatores intrínsecos e extrínsecos às sementes influenciam no processo, atuando isoladamente ou em interação com os demais (Borges e Rena, 1993).

A temperatura assume papel primordial no decorrer da germinação, controlando sua intensidade e velocidade (Santos Neto et al., 2008; Kumar et al., 2011; Ozari et al., 2013), regulando as taxas de embebição, liberação de eletrólitos (Murphy e Noland, 1982; Kader e Jutzi, 2002) e mobilização de reservas (Ataíde et al., 2013), afetando o crescimento e vigor das plântulas (Mota et al., 2012; Alves et al., 2013; Pacheco Junior et al., 2013) e regulando a transcrição de genes associados à germinação (Cheng et al., 2010; Chiu et al., 2012).

Durante este processo, modificações biométricas no tamanho e peso das sementes ocorrem simultaneamente, dirigidas pela absorção de água pelos tecidos, de forma a permitir o fornecimento de componentes metabólicos para o desenvolvimento

do eixo embrionário (Ingle et al., 1964). Em *Pseudotsuga mentziesii*, foram observados aumentos de 35 e 6 vezes, respectivamente, na massa fresca e seca das plântulas durante seis estádios de germinação (Ching, 1966). Bishnoi et al. (1993) relacionaram o alongamento do eixo embrionário em sementes de *Pisum sativum* ao incrementos significativos no comprimento e massa fresca da radícula aos quatro e oito dias após início da embebição a 25 °C.

Considerando a influência das condições ambientais sobre as sementes durante a germinação e a importância da espécie nos aspectos ecológico e econômico, no presente trabalho teve-se como objetivo estudar as alterações na germinação e em aspectos biométricas das sementes de *Melanoxylon brauna* em diferentes temperaturas.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Análises de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no período de outubro/2012 a fevereiro/2013. As sementes de *Melanoxylon brauna* utilizadas para as análises foram coletadas em matrizes selecionadas na região de Leopoldina, Minas Gerais em setembro/2012. Em seguida, foram secas ao sol e beneficiadas manualmente. Durante o beneficiamento foram retiradas as impurezas e eliminadas as sementes deterioradas ou danificadas por pragas e insetos. As sementes selecionadas foram acondicionadas em tambores de fibra e armazenadas em câmara fria a 5 °C e 60% UR até a realização dos experimentos.

As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri sobre duas folhas de papel toalha umedecidas com água destilada nas temperaturas constantes de 10, 25, 30 e 40 °C, sob luz contínua, proporcionada por quatro Lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia de 40W cada, durante 10 dias. A análise da germinação nas diferentes temperaturas foi realizada por meio do cálculo da porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG).

Em seguida, um novo teste foi conduzido, visando avaliar a capacidade de recuperação das sementes após exposição às temperaturas estressantes. Para tanto, amostras independentes foram colocadas para germinar nas temperaturas de 10 e 40 °C, nas mesmas condições descritas acima. Em intervalos de 24 horas, durante quatro dias, foram transferidas para a temperatura de 25 °C, sendo avaliadas a porcentagem de germinação, IVG e TMG.

Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram emissão de raiz primária, sendo os resultados expressados em porcentagem média. O IVG foi calculado de acordo com a fórmula apresentada por Maguire (1962) e o TMG segundo Labouriau (1983). Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes para cada tratamento de temperatura.

Durante o processo germinativo nas temperaturas constantes de 10, 25, 30 e 40 °C, amostras de sementes foram retiradas para as seguintes análises:

Teor de água e massa fresca das sementes: O teor de água das sementes foi determinado pelo método da estufa 105 ± 3 °C, por 24 horas, utilizando-se três repetições de 20 sementes, conforme Brasil (2009). A massa fresca foi conduzida conjuntamente com o teor de água, sendo as sementes pesadas antes e após a secagem e os resultados expressos em g;

Dados biométricos (comprimento, largura e espessura): As variáveis comprimento, largura e espessura foram realizadas com auxílio de paquímetro digital com precisão de 0,01 mm em oito repetições de dez sementes por tratamento. A largura e a espessura foram medidas na região intermediária das sementes, enquanto o comprimento foi obtido através da medição do seu ápice à base. Foram utilizadas cinco repetições de vinte sementes por tratamento.

Comprimento e massa dos eixos embrionários: Para o cálculo do comprimento médio dos eixos embrionários, estes foram medidos individualmente utilizando-se de um ampliador fotográfico com escala de 3,3 vezes e régua milimetrada. A massa média dos eixos embrionários foi computada pela pesagem das amostras em balança com precisão de 0,0001 g. Foram utilizadas oito repetições de dez eixos embrionários cada.

As medições de teor de água e massa fresca das sementes foram realizadas em intervalos de 12 horas durante a germinação, enquanto as demais variáveis foram mensuradas a cada 24 horas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância após terem sido realizados os testes de Lilliefors e de Cochran e Bartlett, para verificar a normalidade e homogeneidade dos erros. No entanto, não houve necessidade de transformação. As médias de germinação, IVG e TMG foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A significância dos parâmetros das equações de regressão foi avaliada por meio do teste t, a 5%. O programa estatístico utilizado foi o Statistica 8.0 (Statsoft, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As maiores médias de germinação de sementes de *M. brauna* foram verificadas nas temperaturas de 25 e 30 °C, com valores de 93 e 98%, respectivamente (Figura 1a). Embora sem diferença estatística na porcentagem final de germinação entre as duas temperaturas, a velocidade média de germinação foi significativamente maior à 30 °C, associado ao menor tempo para as sementes completarem o processo germinativo, conforme apresentado nas Figuras 1b e 1c. Nas temperaturas de 10 e 40 °C, a germinação foi de 5%, com médias de IVG e TMG estatisticamente iguais, apesar da temperatura de 40 °C reduzir o tempo médio de germinação em 1,45 dias, em relação aquelas germinadas a 10 °C.

Os dados obtidos estão de acordo com os apresentados por Flores (2011), que afirma ser a faixa de 25 a 30 °C a ótima para a germinação de *M. brauna*. Assim, possivelmente, as temperaturas 10 e 40 °C comprometeram o desenvolvimento do processo germinativo. A temperatura, como fator ambiental imprescindível ao processo germinativo, influencia tanto na embebição das sementes como nas reações bioquímicas que governam o metabolismo, para permitir a protrusão da raiz primária.

A temperatura ideal de germinação é aquela que possibilita número máximo de sementes germinadas em menor período de tempo (Carvalho e Nakagawa, 2000) e, em sementes florestais, pode variar conforme as distribuições geográfica e ecológica das espécies, tais como o bioma, o grupo sucessional e a adaptação fisiológica às condições ambientais dos locais de ocorrência (Brancalion et al., 2010). Quanto maior a faixa de temperatura de germinação, mais ampla é a distribuição geográfica da espécie em estudo (Labouriau 1983).

Borges e Rena (1993) citam que as temperaturas que mais estimulam o processo germinativo das espécies arbóreas tropicais e subtropicais situam-se na faixa de 20 a 30 °C, valores confirmados por Virgens et al. (2012), Alves et al. (2013), Costa et al. 2013 e Guedes et al. (2013), para as espécies *Myracrodruon urundeuva*, *Clitoria fairclildiana*, e *Bauhinia forficata* e *Apeiba tibourbou*, respectivamente. Considerando espécies pertencentes especificamente ao bioma Mata Atlântica, caracterizado por fatores climáticos tropicais de elevadas temperaturas (médias de 25 °C) e de alta precipitação, bem distribuídas durante o ano (Leitão Filho, 1987), tem-se observado requerimento térmico para a germinação entre 25 e 30 °C, citando-se como exemplos os trabalhos desenvolvidos com *Dalbergia nigra* (Ferraz-Grande e Takaki, 2001),

Cecropia glaziovii (Godoi e Takaki, 2005), *Caesalpinia ferrea* (Lima et al., 2006) e *Astronium concinnum* (Souza et al., 2012).

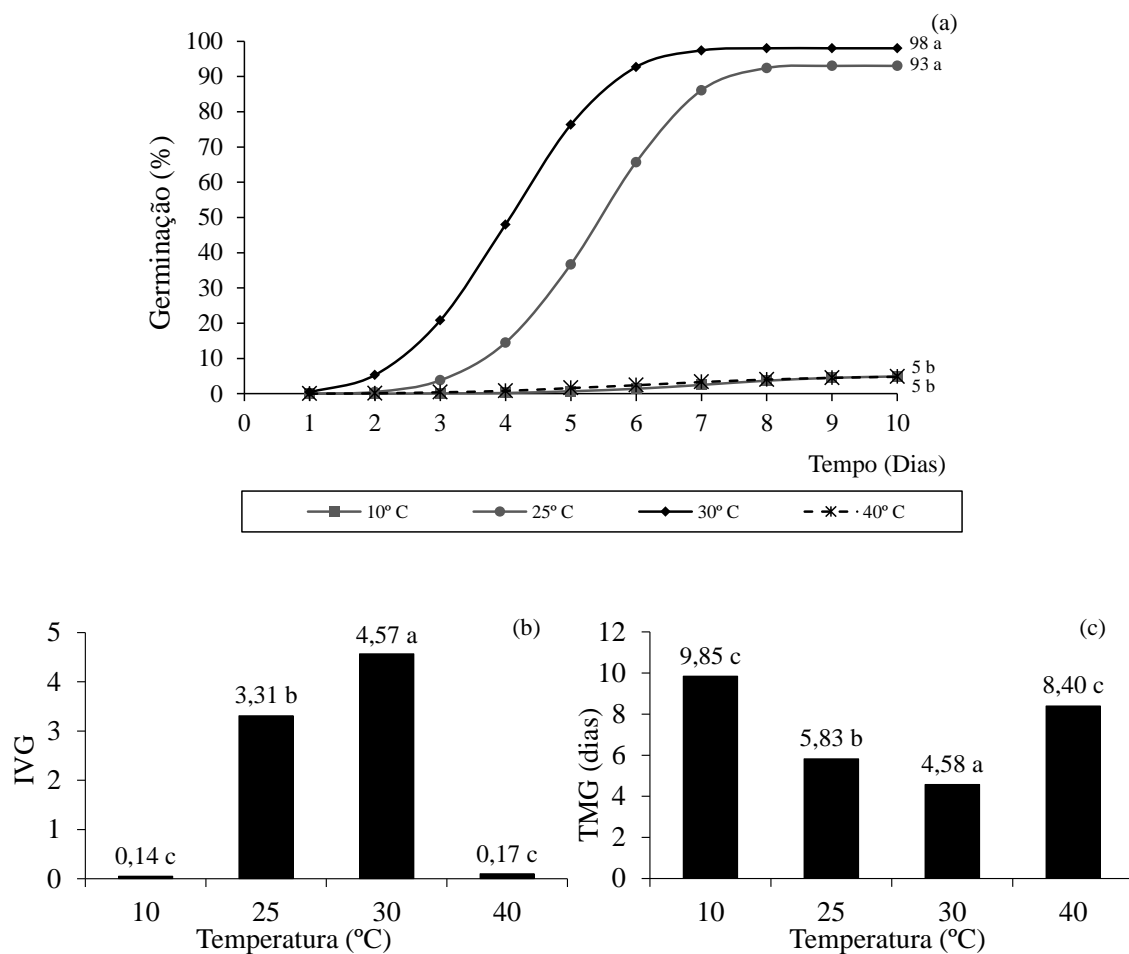


Figura 1. Germinação (a), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (b) e tempo médio de germinação (TMG) (c) de sementes de *Melanoxylon brauna* nas temperaturas de 10, 25, 30 e 40 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5%, pelo teste de Tukey.

A embebição das sementes a 10 °C com posterior retorno a 25 °C resultou em acréscimos na germinação em todos os tempos estudados, em comparação à temperatura constante de 10 °C, sendo estes acréscimos estatisticamente significativos em todos os casos (Figura 2a). Ao transferir as sementes para a temperatura de 25 °C, obtiveram-se aumentos de 85, 77, 76 e 66 pontos percentuais na germinação após a exposição das sementes por 24, 48, 72 e 96 horas à temperatura de 10 °C, respectivamente. À medida em que se aumentou o período de exposição das sementes à baixa temperatura foi observada redução gradativa na velocidade de germinação (Figura 2b), com aumento no tempo médio para o processo germinativo, porém este não estatisticamente diferente entre os tratamentos (Figura 2c).

A viabilidade e vigor das sementes começaram a decrescer em função dos danos fisiológicos internos causados pela exposição à temperatura subótima, apesar das sementes manterem médias de IVG superiores àquela observada na temperatura constante de 10 °C e ainda permanecerem com germinação acima de 70% quando mantidas a 25 °C por algum período de tempo. Dessa forma, para sementes de *M. brauna*, a temperatura de 10 °C por períodos de até 96 horas não acarretou morte celular e inativação térmica da germinação, a qual ainda se restabeleceu em condições ideais de temperatura.

As injúrias por baixas temperaturas durante a germinação estão relacionadas a alterações fisiológicas e bioquímicas com danos ao sistema de membranas, que causam perda de substâncias orgânicas pelos eixos embrionários quando submetidos a tais condições de estresse (Guan et al., 2009). Segundo Iba (2002), em resposta à baixa temperatura ocorre um desarranjo na bicamada lipídica da membrana celular, a qual sofre transição da fase líquida à fase gel mais rapidamente, reduzindo sua liquidez e aumentando a permeabilidade.

Em sementes de *Dalbergia nigra*, o aumento do tempo de permanência à temperatura de 5 °C resultou em decréscimos contínuos na porcentagem de germinação e incremento na permeabilidade das membranas celulares, medida pela liberação de eletrólitos (Marcatti et al., 2009). A temperatura de 13 °C também reduziu a germinação e o vigor de sementes de *Oryza sativa*, além de provocar aumento na expressão da enzima álcool desidrogenase e redução na esterase (Mertz et al., 2009), enquanto em sementes de *Gossypium hirsutum* sob estresse à temperatura de 4 °C as análises fisiológicas e bioquímicas mostraram aumento significativo na atividade de endopeptidase e na taxa de geração de oxigênio (Gai et al., 2008).

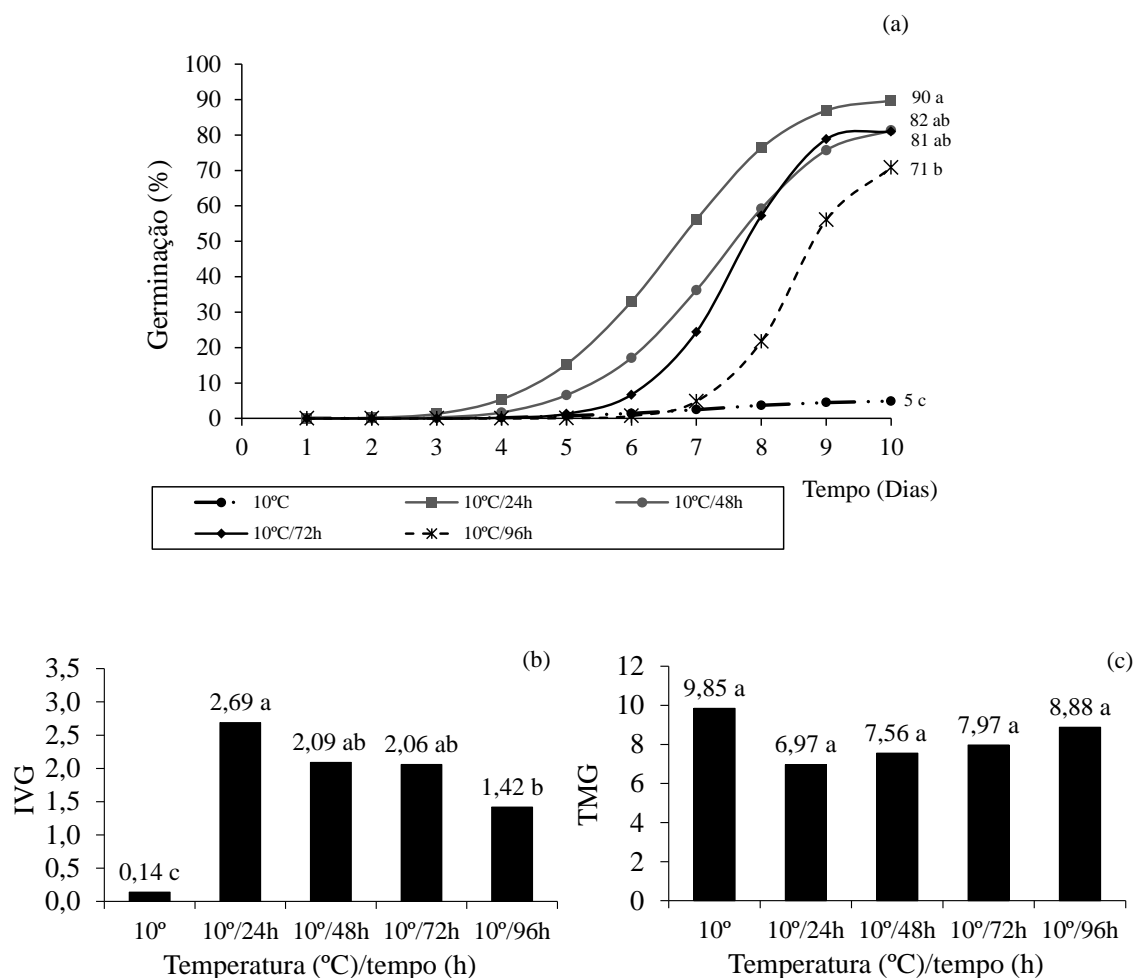


Figura 2. Germinação (a), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (b) e tempo médio de germinação (TMG) (c) de sementes de *Melanoxyylon brauna* colocadas para germinar na temperatura constante de 10 °C e por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas a 10°C com posterior transferência para 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5%, pelo teste de Tukey.

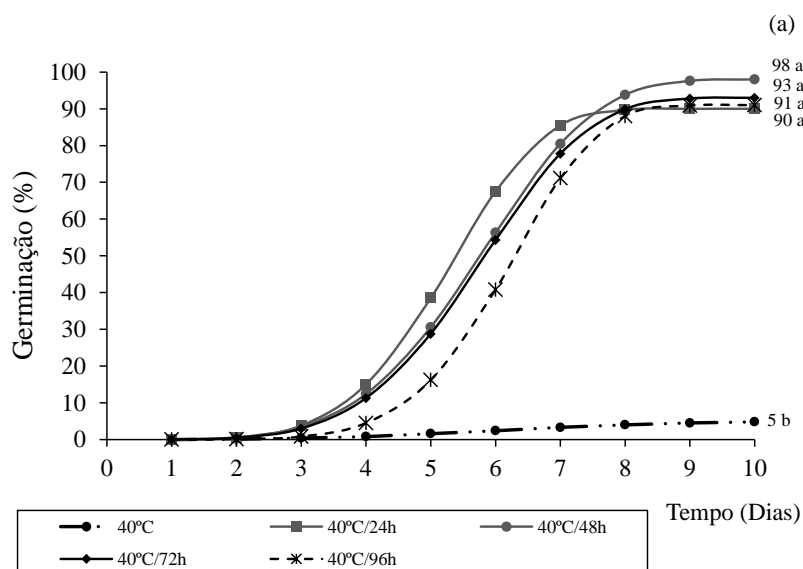
As sementes colocadas para embeber na temperatura de 40 °C e transferidas para 25 °C apresentaram germinação média de 90% quando o tempo na temperatura alta foi de 24 horas, 98% quando este período passou para 48 horas e 93 e 91% após 72 e 96 horas, respectivamente (Figura 3b). Neste caso, a exposição das sementes à alta temperatura por pequenos períodos não causou alterações significativas na viabilidade ou no vigor das sementes, apesar de ter reduzido a velocidade de germinação e aumentado o tempo médio para que as sementes germinassem (Figuras 3b e 3c).

Similarmente ao constatado para a temperatura de 10 °C, a capacidade de recuperação do metabolismo em direção à germinação quando a temperatura retorna a níveis adequados (25 °C), permite inferir que a temperatura de 40 °C, apesar de

proporcionar pequena germinação das sementes (5%), não causa terminação do processo germinativo ou danos e alterações danosas irreversíveis a níveis celulares.

Um dos possíveis mecanismos para explicar a adaptação das sementes ao estresse térmico é a indução da expressão de genes das proteínas de choque térmico, ou, heat shock proteins (HSP). Segundo Meyer e Silva (1999), estes genes, até então quiescentes, são induzidos pelo calor, fazendo com que as células que sintetizaram HSP fiquem protegidas contra novas exposições, o que se reflete em menores lesões no organismo ou em partes dele. Em sementes de espécies dos gêneros *Pinus* e *Picea* foi observada maior síntese de proteínas HSP após exposição por 48 horas à temperatura de 42 °C, indicando papel importante destas na tolerância térmica das células (Gifford e Taleisnik, 1993). O isolamento do gene da HSP NnHSP17.5 de *Nelumbo nucifera* e posterior expressão em sementes de *Arabidopsis* resultou em aumento no vigor, germinação e atividade de enzimas do complexo antioxidante das sementes, além de maior termotolerância das mudas em condições de estresse térmico, conforme Zhou et al. (2012).

No entanto, os mecanismos pelos quais as HSPs estão envolvidas na proteção de células não são completamente compreendidos, existindo forte evidência de que atuam como acompanhantes celulares, apresentando um ATP independente, que se liga a proteínas desnaturadas, impedindo a agregação térmica e auxiliando no bom dobramento destas durante o estresse celular (Lee e Vierling, 2000; Sun et al., 2002; Nakamoto e Vigh, 2007).



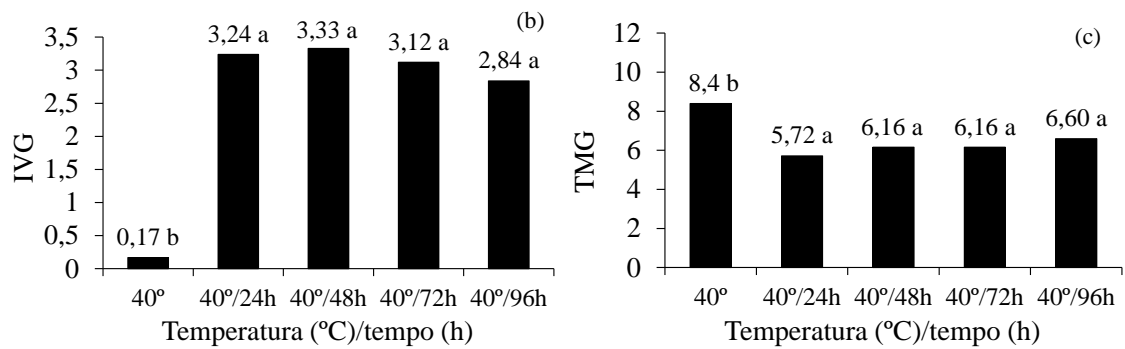


Figura 3. Germinação (a), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (b) e tempo médio de germinação (TMG) (c) de sementes de *Melanoxylon brauna* colocadas para germinar na temperatura constante de 40 °C e por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas a 40 °C com posterior transferência para 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5%, pelo teste de Tukey.

O teor de água inicial das sementes foi de 10,24%. Durante o período de embebição, as taxas de absorção de água pelas sementes aumentaram à medida que se aumentou a temperatura, conforme observa-se nas curvas ajustadas na Figura 4a. Após 96 horas, os teores médios de água às temperaturas de 10, 25, 30 e 40 °C foram de, aproximadamente, 50, 60, 67 e 71%, respectivamente.

Na temperatura de 40° C observou-se estabilização na absorção de água em 48 horas. A 30 °C, esta ocorreu após 60 horas e em 25 °C após 72 horas de embebição. No período avaliado não foi observada estabilização na absorção de água nas sementes embebidas a 10 °C. Em baixas temperaturas, ocorre aumento da viscosidade da água (Murphy e Noland, 1982). Assim, esta é absorvida mais lentamente pelas sementes, havendo a necessidade de um período maior para que se alcance um nível adequado de hidratação dos tecidos (Murphy e Noland, 1982; Vertucci e Leopold, 1983). Menores taxas de absorção de água com a diminuição da temperatura também foram observadas por Ozturk et al. (2008), Flores et al. (2011), Ataíde (2011) e Unver e Tilki (2011).

Houve progressivo aumento na massa fresca das sementes de *M. brauna* ao longo do tempo de embebição, com maiores incrementos à medida que se aumenta a temperatura (Figura 4b). A massa fresca, que nas sementes secas era de cerca de 0,12 g. semente⁻¹, apresentou acréscimo de 87% na temperatura de 10 °C após 96 horas de embebição e mais que duplicou nas demais temperaturas, com aumentos de 157, 165 e 185 pontos percentuais nas temperaturas de 25, 30 e 40° C, respectivamente.

A absorção de água pela célula é a fase inicial da distensão da parede celular, a qual sofre deformações e determina seus limites e taxa de expansão, resultando no crescimento, como consequência de transformações físicas e químicas de aumento da turgescência. Assim, o mesmo padrão observado para o teor de água foi também para a massa fresca das sementes de *M. brauna*, indicando que quanto maior a temperatura de embebição maior o crescimento das sementes durante o processo germinativo.

No entanto, nem sempre o maior acúmulo de massa vai refletir em maiores taxas de germinação e material de reserva para o processo germinativo. No presente estudo, o intervalo entre 25 e 30 °C foi definido como o ótimo para a germinação de sementes de *M. brauna* e na temperatura de 40 °C houve o maior crescimento das sementes. Apesar da embebição ser um processo físico, governado pelo potencial mátrico e, biologicamente, pela afinidade da semente em embeber em função da presença de substâncias osmoticamente ativas (Pazdera e Hosnedl, 2002), a temperatura de 40 °C proporcionou condições adequadas para favorecer ao rápido desenvolvimento das fases I e II do processo de germinação, resultando em aumento na massa e volume celular, porém provavelmente não permitiu o enfraquecimento do tecido e consequente protrusão da raiz.

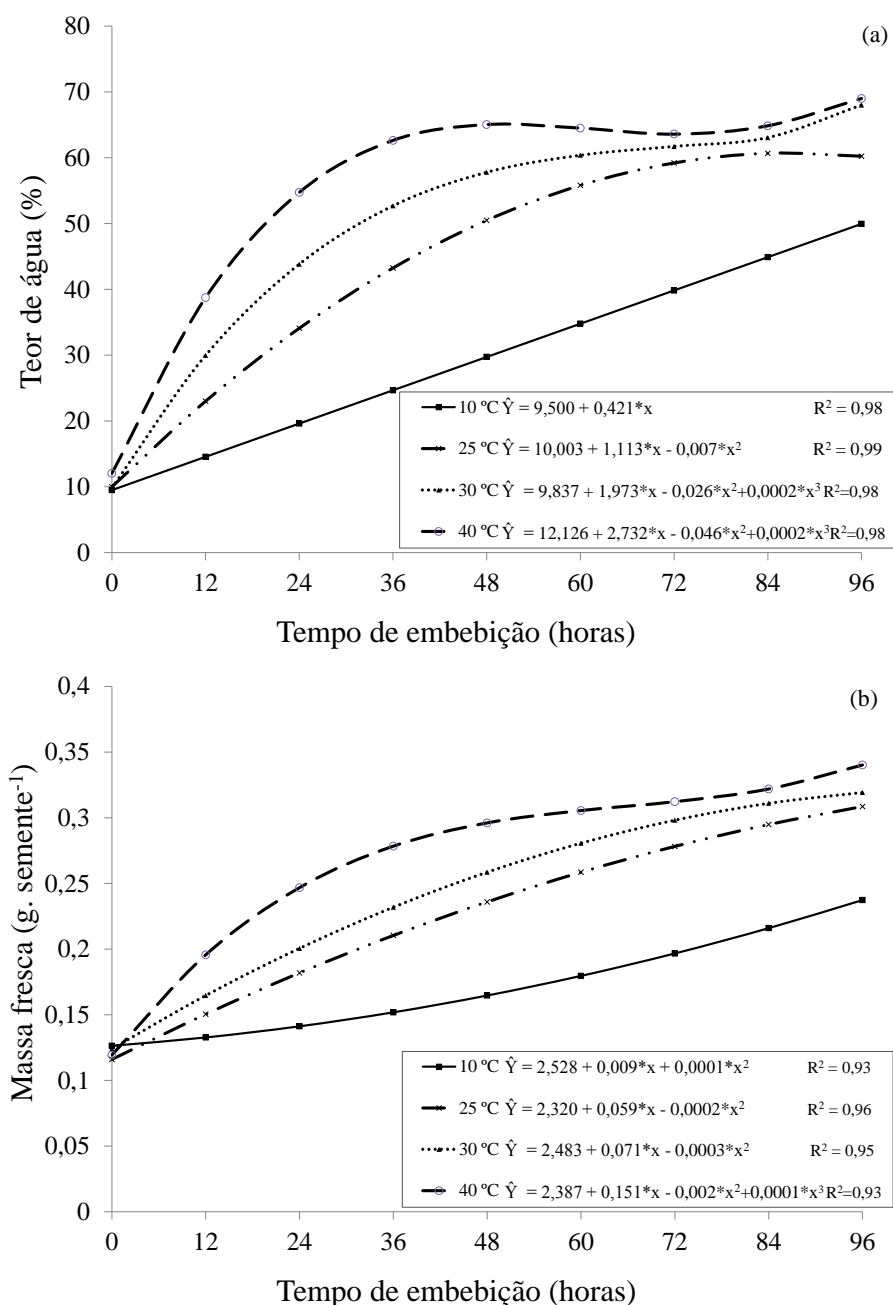


Figura 4. Alterações no teor de água e massa fresca das sementes de *Melanoxylon* brauna durante a germinação nas temperaturas de 10, 25, 30 e 40 °C. * - significativo, a 5%, pelo teste t ($p < 0,05$).

O comprimento médio das sementes aumentou contínua e progressivamente durante a embebição em todas as temperaturas analisadas (Figura 5a). Após 96 horas de embebição foram observados acréscimos de cerca de 4 mm nas sementes nas temperaturas de 25, 30 e 40° C em comparação ao tamanho inicial das sementes secas (12,2 mm), enquanto na temperatura de 10° C o crescimento foi de cerca de 3 mm no mesmo tempo de embebição.

Para a largura das sementes foi observado comportamento semelhante ao verificado para o comprimento, com maiores acréscimos nas temperaturas 25, 30 e 40 °C em relação ao aumento verificado para a temperatura de 10 °C durante as 96 horas de embebição (Figura 5b). Tais valores correspondem a acréscimos de 0,76, 0,96 e 0,86 mm em relação à largura medida nas sementes no início do processo germinativo, que foi de 6,99 mm.

As alterações na espessura possibilitaram melhor separação das temperaturas após 48 horas de embebição, de forma que quanto maior a temperatura maior o crescimento na espessura das sementes ao longo da germinação (Figura 5c). A 10 °C observa-se estabilização no crescimento das sementes em espessura após 24h de embebição, enquanto a 40 °C os valores a 96 h representam acréscimos de 96% em relação ao tamanho inicial. Por tais constatações constata-se ser a espessura das sementes de *M. brauna* a variável biométrica mais influenciada pela temperatura, de forma que a expansão das células em altura atua como importante indicativo da absorção e suprimento de água pelas sementes durante a germinação.

Segundo Schopfer (2006), após o período inicial de embebição das sementes, correspondente à fase I da curva de absorção de água, todas as alterações causadas na forma e tamanho das sementes durante a germinação são devido à expansão celular, de forma que o afrouxamento da parede celular permite o influxo de água que impulsiona esta expansão, por meio da pressão de turgor celular. Assim, o modelo de crescimento das sementes durante a germinação depende principalmente das mudanças na extensibilidade da parede celular (Bewley et al., 2013), as quais são acompanhadas pelo aumento da vacuolização das células no final da fase II (Bethke et al., 2007).

Neste contexto, as temperaturas mais altas no presente trabalho (30 e 40 °C) atuam favorecendo a entrada de água nas sementes, e conseqüentemente aumentando a pressão celular e expandindo as células vegetais, que crescem em tamanho.

A caracterização biométrica de frutos e sementes é uma ferramenta importante e pode fornecer subsídios para trabalhos de melhoramento genético de populações, para a melhoria das condições de armazenamento das sementes, produção de mudas e padronizações de testes em laboratório (Fernandes et al., 2012). Durante a germinação, o estudo dos aspectos morfológicos contribui para a propagação das espécies, à medida em que auxilia na interpretação e padronização dos testes de germinação, bem como permite a identificação das espécies em campo, sendo importante para estudos taxonômicos, ecológicos e agrônômicos (Silva et al., 2012).

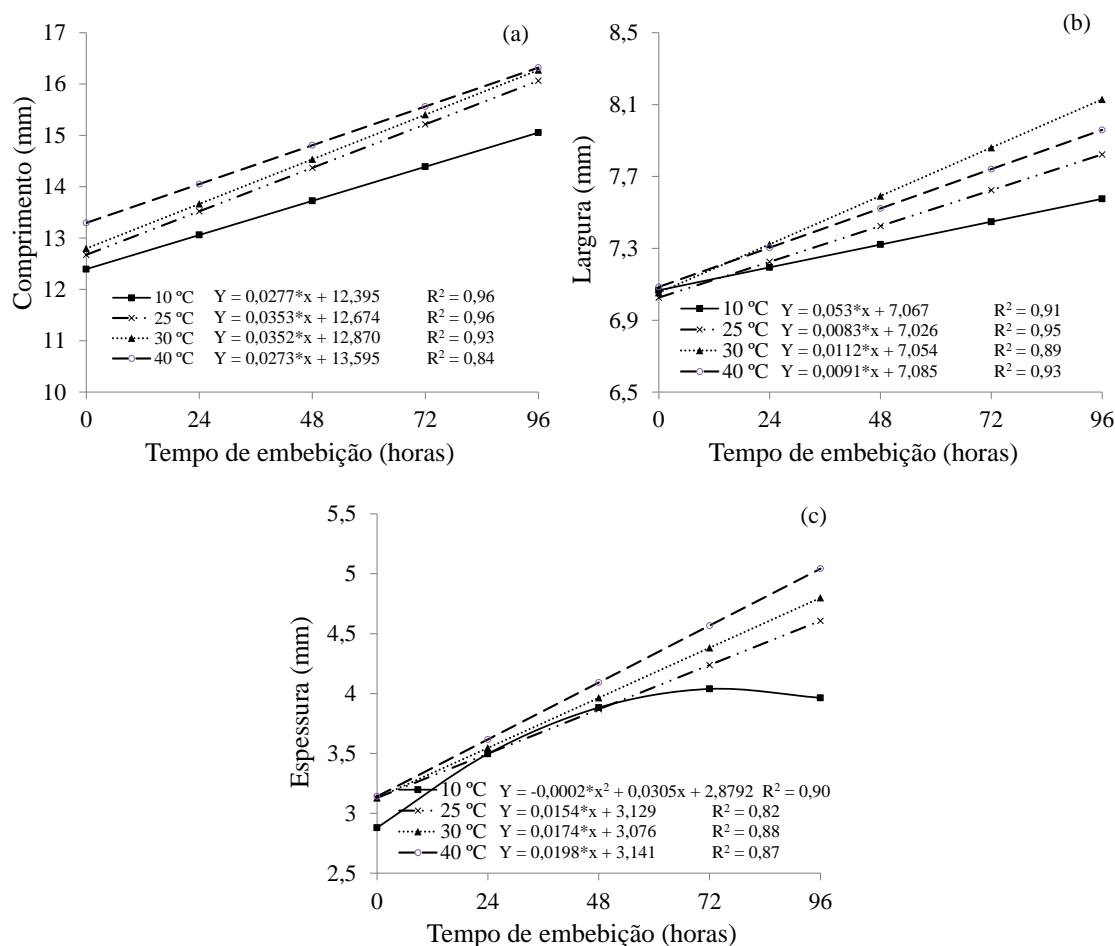


Figura 5. Alterações no comprimento, largura e espessura de sementes de *Melanoxylon brauna* durante germinação nas temperaturas de 10, 25, 30 e 40 °C.

O comprimento dos eixos embrionários aumentou continuamente durante a embebição nas temperaturas de 30 e 40 °C e se manteve estável na temperatura de 10 °C (Figura 6a). Observa-se que as médias de comprimento são similares até as primeiras 24 h de embebição nas diferentes temperaturas, começando a se diferenciarem deste ponto em diante. Após 96 h de embebição, maiores médias de comprimento foram observadas nas temperaturas de 25 e 30 °C, haja vista que nestas já se observa protrusão da radícula em algumas sementes, o que foi suficiente para elevar as médias observadas. À temperatura de 40 °C, o crescimento do embrião é destacado a partir de 48 h, em taxas progressivas, porém em 96 h de embebição assume valores inferiores às temperaturas de 25 e 30 °C, devido ao não rompimento dos tecidos envoltórios pelo eixo embrionário.

As médias de massa fresca dos eixos embrionários de sementes de *M. brauna* encontram-se na Figura 6b. As sementes mantidas nas temperaturas 25, 30 e 40 °C tiveram a massa fresca dobrada após 96 horas de embebição, enquanto a 10 °C este acréscimo foi de cerca de 50%. Semelhante ao observado para o comprimento dos eixos

embrionários, as maiores médias para massa fresca ao final do período analisado foram verificadas nas temperaturas 30 e 25 °C, com valores de 12,1 e 10,5 mg, respectivamente. Houve na massa fresca aumento durante a embebição na temperatura de 10 °C, enquanto o comprimento dos eixos embrionários nesta temperatura não acompanhou tal tendência. Neste caso, pode-se inferir que as alterações de massa fresca nos eixos embrionários em temperaturas mais baixas podem ser devido à expansão celular em volume e não em largura, sem deposição de novas células no comprimento, de forma que a temperatura influencia significativamente na formação dos tecidos durante o período germinativo.

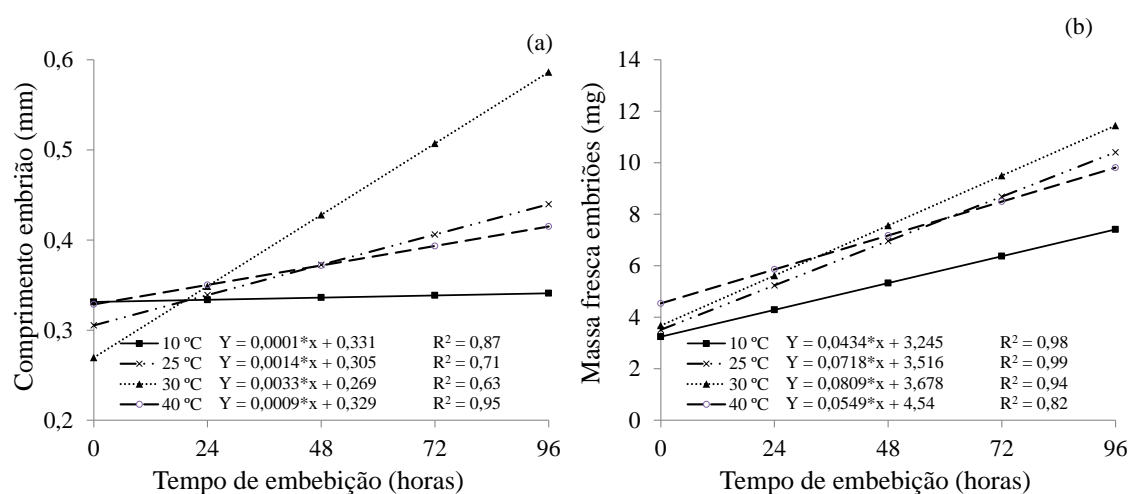


Figura 6. Alterações na massa fresca e comprimento dos eixos embrionários de sementes de *Melanoxylon brauna* durante germinação nas temperaturas de 10, 25, 30 e 40 °C.

CONCLUSÕES

A germinação de sementes de *M. brauna* é significativamente reduzida às temperaturas de 10 e 40 °C. Porém, a embebição das sementes nestas temperaturas por curtos períodos de tempo com posterior retorno a 25 °C não prejudica a germinação subsequente.

Durante a germinação, as taxas de absorção de água, massa fresca, comprimento, largura e espessura das sementes aumentam na medida em que se aumenta a temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.M.; ALVES, E.U.; BRUNO, R.L.A.; SILVA, K.R.G.; BARROZO, L.M.; SANTOS-MOURA, S.S.; CARDOSO, E.A. Germinação e vigor de sementes de *Clitoria fairchildiana* Howard (Fabaceae) em função da coloração do tegumento e temperaturas. **Bioscience Journal**, v.29, n.1, p.216-223, 2013.

ATAÍDE, G.M.; BORGES, E.E.L.; GONÇALVES, J.F.C.; GUIMARÃES, 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, n.1, p.56-63, 2013.

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

BISHNOI, N.R.; DUA, A.; GUPTA, V.K.; SAWHNEY, S.K. Effect of chromium on seed germination, seedling growth and yield of peas. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.47, p.47-57, 1993.

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.

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. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, 2009. 399p.

CARVALHO, F.A.; NASCIMENTO, M.T.; BRAGA, J.M.A. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo de um remanescente de Mata Atlântica submontana no município de Rio Bonito, RJ, Brasil (Mata Rio Vermelho). **Árvore**, v.31, n.4, p.717-730, 2007.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações, silviculturas, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília: Embrapa-SPI, p. 638p, 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.

CHING, T.M. Compositional changes of Douglas Fir seeds during germination. **Plant Physiology**, v.41, p.1313-1319, 1966.

COSTA, E.S.; SANTOS NETO, A.L.; COSTA, R.N.; SILVA, J.V.; SOUZA, A.A.; SANTOS, V.R. Dormência de sementes e efeito da temperatura na germinação de sementes de mororó. **Revista de Ciências Agrárias**, v.56, n.1, p.19-24, 2013.

CREPALDI, M.O.S.; PEIXOTO, A.L. Use and knowledge of plants by “Quilombolas” as subsidies for conservation efforts in an area of Atlantic Forest in Espírito Santo State, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v.19, p.37-60, 2010.

FERNANDES, M.R.; BARBOZA, M.P.; SOUZA-LEAL, T.; MORAES, C.P. Morfobiometria carpo seminal e germinação de *Lafoensia pacari* A. St. Hil. (Lythraceae) exposta a diferentes concentrações de GA₃. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, suplemento 1, p.2571-2584, 2012.

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, 2011.

FLORES, A.V.; ATAÍDE, G.M.; GONCALVES, L.E.S.; ANDRADE, R.H.S.; BORGES, E.E.L. Germinação de sementes de *Anadenanthera peregrina* sob diferentes temperaturas. Simpósio de Integração Acadêmica - SIA/UFV, 2011, Viçosa, MG. In: **Anais do Simpósio de Integração Acadêmica - UFV**, 2011.

GAI, Y.P.; LI, X.Z.; JI, X.L.; WU, C.A.; YANG, G.D.; ZHENG, C.C. Chilling stress accelerates degradation of seed storage protein and photosynthetic protein during cotton seed germination. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.194, p.278-288, 2008.

GIFFORD, D.J.; TALEISNIK, E. Heat-shock response of *Pinus* and *Picea* seedlings. **Tree Physiology**, v.14, p.103-110, 1993.

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.

GUAN, Y.; HU, J.; WANG, X.; SHAO, C. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. **Journal of Zhejiang University**, v.10, n.6, p.427-433, 2009.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; VIANA, J. S.; GONÇALVES, E. P.; LIMA, C. R.; SANTOS, S. R. N. Germinação e vigor de sementes de *Apeiba tibourbou* submetidas ao estresse hídrico e diferentes temperaturas. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 1, p. 45-53, 2013.

IBA, K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.225-245, 2002.

INGLE, J.; BEEVERS, L.; HAGEMAN, R. H. Metabolic changes associated with the germination of corn i. changes in weight and metabolites and their redistribution in the embryo axis, scutellum, and endosperm. **Plant Physiology**, v.39, p. 735-40, 1964.

KADER, M.A.; JUTZI, S.C. Temperature, osmotic pressure and seed treatments influence imbibition rates in sorghum seeds. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.188, p. 286-290, 2002.

KUMAR, B.; VERMA, S.K.; SINGH, V.H.P. Effect of temperature on seed germination parameters in Kalmegh (*Andrographis paniculata* Wall. ex Nees.). **Industrial Crops and Products**, v.34, p.1241-1244, 2011.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington. 1983.

LEE, G.J.; VIERLING, E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. **Plant Physiology**, v.122, p.189-197, 2000.

LIMA, J.D.; ALMEIDA, C.C.; DANTAS, V.A.V.; SILVA, B.M.S.; MORAES, W.S. Efeito da temperatura e do substrato na germinação de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **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, 2009. 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.

MARCATTI, G.E.; BORGES, E.E.L.; PEREIRA, B.L.C.; BONATTI, F.K.Q.; BERGUER, A.P.A.; SILVA, M.S. Danos germinativos e alterações de embebição em sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr.All. Ex Benth. sob efeito de baixa temperatura.. In: **SIC/SIMPÓS/SEU/SEn-2009**, 2009, Viçosa - MG. XIX Simpósio de Iniciação Científica, IX Simpósio da Pós - Graduação, VII Simpósio de Extensão Universitária e III Simpósio de Ensino. Viçosa - MG: UFV, 2009.

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

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; SOARES, R.C.; BALDIGA, R.F.; PESKE, F.B.; MORAES, D.M. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.254-262, 2009

MEYER, T.N.; SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.45, n.2, p.181-188, 1999.

MOTA, L.H.S.; HEINZ, R.; GARBIATE, M.V.; SCALON, S.P.Q.; CREMON, T.; VIEGAS NETO, A.L. Efeito da temperatura e tratamentos pré-germinativos na

germinação e vigor de plântulas de *Jatropha curcas* L. **Biotemas**, v.25, n.3, p.29-37, 2012.

MURPHY, J.B.; NOLAND, T.H. Temperature effects on seed imbibition and leakage mediated by viscosity and membranes. **Plant Physiology**, v.69, p.428-431, 1982.

NAKAMOTO, H.; VIGH, L. The small heat shock proteins and their clients. **Cell and Molecular Life Sciences**, v.64, p.294-306, 2007.

ORZARI, I.; MONQUERO, P.A.; REIS, F.C.; SABBAG, R.S.; HIRATA, A.C.S. Germinação de espécies da família Convolvulaceae sob diferentes condições de luz, temperatura e profundidade de sementeira. **Planta Daninha**, v.31, n.1, p.53-61, 2013.

ÖZTURK, M.; BASLAR, S.; DOGAN, Y.; SAKCALI, M.S. **Alleviation of salinity stress in the seeds of some brassica species**. In: KHAN, M.A.; WEBER, D.J. (Eds.) *Ecophysiology of high salinity tolerant plants*. Springer Science, 145-456. 2008.

PACHECO JUNIOR, F.; SILVA, J.B.; NEGREIROS, J.R.S.; SILVA, M.R.G.; FARIA, S.B. Germinação e vigor de sementes de pimenta-longa (*Piper hispidinervum*) em função da temperatura e da luz. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, n.2, p.325-333, 2013.

PAZDERA, J.; HOSNEDL, V. Effects of Hydration treatments on seed parameters of difference lettuce (*Lactuca sativa* L.) seed lots. **HortScience**, v. 1, p. 12-16, 2002.

SANTOS, E.; RAMALHO, R.S. Caracterização dendrológica e potencialidades paisagísticas de *Ouratea polygyna* Engl. (Ochnaceae) e *Melanoxylon brauna* (Caesalpinoideae) na arborização urbana. **Revista Árvore**, v.20, n.4, p.535-543, 1996.

SANTOS NETO, A.L.; MEDEIROS FILHO, S.; TEÓFILO, E.M.; GUIMARÃES, R.M.; BLANK, A.F.; MANN, R.S. Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de sambacaitá (*Hyptis pectinata* (L.) Poit). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.14, n.4, p.19-26, 2008.

SILVA, K.B.; ALVES, E.U.; MATOS, V.P.; BRUNO, R.L.A. Caracterização morfológica de frutos, sementes e fases da germinação de *Pachira aquatica* Aubl. (Bombacaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.3, p.891-898, 2012.

SOUZA, F.B.C.; MENGARDA, L.H.G.; SPADETO, C.; LOPES, J.C. Substratos e temperaturas na germinação de sementes de gonçalo-alves (*Astronium concinnum* Schott). **Revista Tropic: Ciências Agrárias e Biológicas**, v.6, n.3, p.76-86 2012.

STATSOFT INC. **Statistica data analysis system version 8.0**. Tulsa: Statsoft Inc., 2008.

SUN, L.; LIU, Y.; KONG, X.; ZHANG, D.; PAN, J.; ZHOU, Y.; WANG, L.; LI, D. ZmHSP16.9, a cytosolic class I small heat shock protein in maize (*Zea mays*), confers heat tolerance in transgenic tobacco. **Plant Cell Reports**, v.31, p.1473-1484, 2012.

UNVER, M.C.; TILKI, F. Salinity, germination promoting chemicals, temperature and light effects on seed germination of *Anethum graveolens*. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v.18, n.6, 1005-1011, 2012.

VERSIEUX, L.M.; MEDEIROS, M.C.M.P.; SPÓSITO, T.C.S.; STEHMANN, J.R. Characterization of the tree component in a semideciduous forest in the Espinhaço Range: a subsidy to conservation. **Revista Caatinga**, v.24, n.2, p.85-94, 2011.

VERTUCCI, C.W.; LEOPOLD, A.C. Dynamics of imbibition by soybean embryos. **Plant Physiology**, v.72, p.190-193, 1983.

VIRGENS, I.O.; CASTRO, R.D.; FERNANDEZ, L.G.; PELACAMI, C.R. Comportamento fisiológico de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae) submetidas a fatores abióticos. **Ciência Florestal**, v.22, n.4, p.681-692, 2012.

ZHOU, Y.; CHEN, H.; CHU, P.; LI, Y.; TAN, B.; DING, Y.; TSANG, E.W.T.; JIANG, L.; WU, K.; HUANG, S. NnHSP17.5, a cytosolic class II small heat shock protein gene from *Nelumbo nucifera*, contributes to seed germination vigor and seedling thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Cell Reports**, v.31, p.379-389, 2012.

CAPÍTULO III

Alterações nas reservas de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae) durante a germinação em diferentes temperaturas

Resumo

Durante a germinação, as sementes utilizam os compostos de reserva armazenados para fornecerem os nutrientes necessários até que as plântulas se tornem autotróficas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar as alterações nas reservas de carboidratos, amido, lipídios e proteínas em sementes de *Melanoxylon brauna* durante o período germinativo em diferentes temperaturas e estudar as atividades das enzimas α -amilase, β -amilase e glicose-6-fosfato-desidrogenase nas mesmas condições. Para tanto, sementes da espécie foram colocadas para germinar sob temperaturas de 10, 25, 30 e 40 °C, sendo retiradas amostras de sementes a cada 24 horas durante o período de 96 horas, para a quantificação das reservas lipídicas, de açúcares solúveis, amido e proteínas solúveis. Nos mesmos tratamentos foram analisadas as atividades das enzimas α -amilase, β -amilase e glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH). Nos teores de lipídios foi observada pequena redução durante a germinação nas temperaturas analisadas, enquanto os teores de açúcares solúveis decresceram a partir de 48 horas de embebição, sendo prontamente utilizados, especialmente nas temperaturas de 25 e 30 °C. Para as proteínas solúveis, verificou-se declínio desde o início do período germinativo às temperaturas de 25 e 30 °C, sendo este mais intenso no período pós-germinativo à temperatura de 30 °C. Às temperaturas 10 e 40 °C, acima e abaixo da faixa ótima de germinação para espécie, a atividade das enzimas α , β -amilase e glicose-6-fosfato-desidrogenase é reduzida, prejudicando o desenvolvimento adequado do processo germinativo.

Palavras chave: lipídios, carboidratos, amido, proteínas, amilase, glicose-6-fosfato-desidrogenase

CHAPTER III

Alterations in seed reserves of *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae Caesalpinoidea) during germination at different temperatures

Abstract

During germination, the seeds use the compounds of stored reserves to provide the necessary nutrients to the seedling, before they become autotrophic. In this context, the aim of this study was to investigate the changes in the reserves of carbohydrates, starch, lipids and proteins in *Melanoxylon brauna* seeds during germination at different temperatures, and study the activities of the enzymes α -amylase, β -amylase and glucose-6-phosphate dehydrogenase under the same conditions. To this end, seeds of the species were germinated at temperatures of 10, 25, 30 and 40 ° C, with samples taken every 24 hours during the 96 hours, for the quantification of reserves of lipids, soluble sugars, starch and soluble proteins. In the same treatments were analyzed the activities of the enzymes α amylase, β amylase and glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PDH). Lipid content showed slight reduction during germination at temperatures analyzed, while soluble sugars showed a decrease from the 48 hours of soaking, being readily used, especially at 25 and 30 ° C. Soluble proteins showed a gradual tendency to decrease, but large decrease was observed in the early post-germination, at the temperature of 30 ° C. At temperatures 10 and 40 ° C, above and below the optimum range for germination of species, the activity of the enzymes α , β amylase and glucose 6 phosphate dehydrogenase is reduced, impairing proper development of the germination process.

Keywords: lipids, carbohydrates, starch, protein, amylase, glucose 6 phosphate dehydrogenase

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a aceleração do desmatamento contribuiu significativamente para a fragmentação do bioma Mata Atlântica, que foi reduzido a 11% de sua cobertura original, segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2008a). Em Minas Gerais, tal fragmentação resultou na extinção e/ou diminuição na abundância de espécies animais e vegetais, muitas delas de elevado valor ecológico e econômico, e endêmicas da região.

Dentre estas, *Melanoxylon brauna*, espécie arbórea pertencente à família botânica Fabaceae Caesalpinoideae, encontra-se na “Lista das espécies da flora brasileira ameaçada de extinção”, na categoria vulnerável (MMA, 2008b). Esta espécie é encontrada na Floresta Atlântica dos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia (Almeida et al., 1998). Sua madeira é pesada e de grande durabilidade, mesmo em ambientes adversos, sendo utilizada em obras externas e na construção civil (Lorenzi, 2009). No intuito de fornecer subsídios para propor estratégias de conservação e melhor utilização/propagação da espécie, são necessários estudos sobre a fisiologia e bioquímica de suas sementes.

As principais substâncias de reserva armazenadas nas sementes são carboidratos, lipídios e proteínas (Buckeridge et al., 2004a; Marcos Filho, 2005), as quais são acumuladas ao longo do processo de formação da semente. Durante a germinação, estas precisam ser convertidas em compostos solúveis e transportadas para as regiões de crescimento das sementes, para fornecerem os nutrientes necessários até que as plântulas se tornem autotróficas (Bewley et al., 2013).

Lipídios, carboidratos, amido e proteínas são mobilizados por enzimas hidrolíticas distintas, muitas das quais são transcritas e sintetizadas de novo (Bewley et al., 2013). Os lipídios e proteínas de reserva têm como produto final do catabolismo a sacarose e aminoácidos, respectivamente, que são translocados aos tecidos em crescimento (Borges e Rena, 1993), enquanto carboidratos e amido são convertidos em açúcares menores, como maltose e glicose (Tan et al., 2013).

Em sementes de *Jathropha curcas*, foi observada redução nos teores de carboidratos, tanto no endosperma quanto no embrião durante o processo germinativo, sendo estes mínimos durante a protrusão e logo após esta, indicando máximo uso destas reservas na germinação (Lopes et al., 2013). Reis et al. (2012) constataram mobilização contínua no conteúdo de açúcares solúveis e proteínas ao longo da germinação de

sementes de *Erythrina velutina*, a qual foi menor em sementes submetidas à restrição hídrica simulada por polietileno glicol. Durante a germinação de sementes de *Aniba rosaeodora*, o decréscimo no teor de amido foi relacionado ao aumento na atividade da α -amilase, indicando ser esta enzima a responsável pela quebra inicial do amido na espécie (Lima et al., 2008).

Considerando que pouco se conhece a respeito do processo de mobilização de reservas em sementes de espécies florestais nativas durante a germinação, e que este processo é influenciado por fatores ambientais, o objetivo neste trabalho foi investigar as alterações nas reservas de carboidratos, amido, lipídios e proteínas em sementes de *Melanoxylon brauna* durante o período germinativo em diferentes temperaturas, e estudar as atividades das enzimas α -amilase, β -amilase e glicose-6-fosfato-desidrogenase nas mesmas condições.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no período de outubro/2012 a fevereiro/2013. As sementes de *Melanoxylon brauna* utilizadas para as análises foram coletadas na região de Leopoldina, Minas Gerais em setembro/2012. Durante o beneficiamento foram eliminadas as sementes imaturas, deterioradas ou danificadas. As sementes selecionadas foram acondicionadas em tambores de fibra e armazenadas em câmara fria a 5 °C e 60% UR até a realização dos experimentos.

O teor de água inicial das sementes foi determinado pelo método da estufa 105 ± 3 °C, utilizando-se três repetições de 20 sementes para cada tratamento, com resultados expressos em porcentagem (base úmida), de acordo com metodologia descrita por Brasil (2009).

Sementes de *M. brauna* foram colocadas para germinar em placas de Petri sobre duas folhas de papel germitest umedecidas com água destilada, sob luz contínua proporcionada por quatro lâmpadas fluorescentes 40 W tipo luz do dia, nas temperaturas constantes de 10, 25, 30 e 40°C, durante 10 dias. As sementes foram consideradas germinadas quando apresentaram protrusão da raiz primária, sendo computada a porcentagem média. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado de acordo com a fórmula apresentada por Maguire (1962). Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes para cada temperatura.

O ganho de água pelas sementes durante a germinação foi estabelecido a partir da curva de embebição das sementes. Cinco repetições de 20 sementes foram pesadas e colocadas para embeber em água destilada sobre duas folhas de papel germitest, nas mesmas condições de luz e temperatura descritas anteriormente, sendo pesadas a cada duas horas durante as primeiras 12 horas e, em seguida, 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 com papel absorvente e, posteriormente, recolocadas no substrato umedecido.

Para avaliar as alterações nas reservas dos cotilédones das sementes nas diferentes temperaturas, amostras de sementes foram retiradas a cada 24 horas durante o período germinativo, até o tempo de 96 horas, quando se observa o início da protrusão radicular à temperatura de 30 °C. Em seguida, foram secas em estufa a 60 °C por 24 horas e armazenadas em vidros hermeticamente fechados, que foram mantidos a -20 °C até o momento de se iniciarem a extração e a quantificação das reservas. Foram feitas as seguintes determinações:

Lipídios: A determinação do teor de lipídios foi obtida a partir da extração dos óleos contidos nos cotilédones das sementes, realizada em aparelho Soxhlet, seguida de estimativa do teor de óleos pela diferença de massa entre material de sementes triturado e o material após a extração, segundo procedimentos descritos por Silva (1990). Amostras de cotilédones foram trituradas e três repetições de 1,0 g colocadas em cartuchos de papel-filtro, pesadas e transferidas para o aparelho, sendo mantidas em refluxo, com éter de petróleo, durante 24 horas. Após, foram secas a 45 °C por 18 horas e pesadas novamente, sendo o resultado expresso em percentagem de lipídios extraídos.

Açúcares solúveis e amido: Para a extração dos açúcares solúveis, três amostras 300 mg de material desengordurado foram mantidas em álcool 80% em banho-maria a 75 °C durante 30 minutos e centrifugadas a 16000 g durante 10 minutos para a coleta do sobrenadante, sendo este processo repetido por mais três vezes (Buckeridge e Dietrich, 1990). Após as extrações, as amostras foram ressuspensas com 1,0 mL de água destilada, sendo a quantificação realizada pelo método colorimétrico (Dubois et al., 1956).

O precipitado resultante da extração dos açúcares solúveis foi seco em estufa a 45 °C durante 24 horas e submetido à digestão com 1,0 mL de ácido perclórico 35% durante 15 minutos (Passos, 1996), sendo em seguida utilizado como extrato para quantificação do amido presente pelo método colorimétrico, conforme metodologia descrita por Dubois et al. (1956).

Proteínas solúveis: A extração de proteínas solúveis foi realizada utilizando-se tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 como solução de extração. A quantificação foi efetuada em eixos embrionários e cotilédones de sementes, de acordo com Bradford (1976), utilizando-se curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA). Foram utilizadas três repetições em triplicatas.

Enzimas α e β -amilase: As atividades das enzimas α e β -amilase foram determinadas pelo método de Bernfeld (1955), utilizando amido como substrato. A extração enzimática foi realizada em cinco repetições de 1,0 g de cotilédones, macerados em 10,0 mL de água destilada e centrifugados a 15.000 g durante 30 minutos, a 4 °C. No ensaio da α -amilase, alíquotas de 1,0 mL do sobrenadante foram adicionadas a 0,6 mL de um meio de reação contendo CaCl_2 3 mM para inativação da β -amilase, sendo a reação incubada a 70 °C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas a 1,0 mL de solução tampão citrato 100 mM, pH 5,0 e 500 μL de solução de amido a 1 %, à temperatura de 30 °C. Após 5 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 2,0 ml do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico 1% (DNS) e aquecida em banho-maria fervente por 10 minutos. O ensaio para quantificação da enzima β -amilase iniciou-se pela adição de 1,0 mL de extrato enzimático a um meio de reação contendo 0,6 mL de EDTA 0,1 M, 1,0 mL de tampão citrato 100 mM, pH 3,4 e 0,5 mL da solução de amido 1%. A reação foi incubada a 30 °C durante 5 minutos. Em seguida foi adicionado 2,0 ml de ácido 3,5-dinitrossalicílico 1% (DNS) com posterior aquecimento em água fervente por 10 minutos para desenvolvimento da coloração. Após completar o volume da reação para 10,0 ml, os açúcares redutores formados pela ação das amilases foram quantificados através da leitura da absorbância em 540 nm, utilizando solução padrão de glicose 2 mg/mL.

Enzima Glicose-6-Fosfato-desidrogenase (G-6-P-dH): O extrato enzimático bruto para a determinação da atividade da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase foi obtido pela maceração de 0,1 g de eixos embrionários e cotilédones em gelo, seguido da adição de 2,0 mL do seguinte meio de homogeneização: 2,0 mL de tampão do meio de extração Tris-Hcl 50 mM, pH 7,5. Em seguida o extrato foi centrifugado a 15.000 g por 15 minutos, a 4 °C, retirando-se o sobrenadante. A atividade da enzima foi determinada pela adição de 200 μL do extrato enzimático bruto a um meio de reação constituído de tampão tris-HCl 62,5 mM pH 7,5, MgCl_2 6,25 mM, NADP 10 mM e G-6-P. O acréscimo na absorbância a 340 nm, à temperatura de 30 °C, foi medido durante 30 minutos de reação, sendo a atividade da G-6-P-dH 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 $6,22 \text{ mmol cm}^{-1}$ e o resultado foi expresso em $\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteína. Foram realizadas três repetições com triplicatas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Foram realizadas análises de variância, sendo as médias de germinação, IVG e TMG comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as análises das reservas orgânicas dos lipídios, carboidratos solúveis, amido e proteínas solúveis foram avaliados modelos de regressão linear e não-linear, selecionados de acordo com o maior coeficiente de correlação e menor erro padrão da média. As significâncias das regressões foram testadas pelo teste t ao nível de 5%. O programa estatístico utilizado foi o Statistica 8.0 (Statsoft, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As maiores porcentagens de germinação em sementes de *M. brauna* foram observadas nas temperaturas de 25 e 30 °C, com valores de 93 e 98%, respectivamente, as quais não diferiram estatisticamente entre si e foram estatisticamente superiores à germinação nas temperaturas 10 e 40 °C, onde foi observada porcentagem média de 5% (Figura 1a). A temperatura de 30 °C, no entanto, proporcionou maior velocidade de germinação quando comparada à temperatura de 25 °C, com médias estatisticamente distintas (Figura 1b).

Assim, o aumento de 5 °C na temperatura contribuiu significativamente para acelerar a germinação. Dentro de certos limites, quanto maior a temperatura, mais rápida a velocidade do processo com que ocorrem as reações químicas do metabolismo germinativo, sendo este mais eficiente (Carvalho e Nakagawa, 2000). Bewley et al. (2013) afirmam que a velocidade de germinação é mais sensível às variações na temperatura do que a porcentagem total, diminuindo acentuadamente em valores próximos ao ótimo, enquanto o total de germinação tende a mostrar uma ampla faixa máxima, geralmente relacionada às condições variáveis de temperatura e luminosidade de adaptação da espécie na fase de crescimento das mudas.

A faixa de temperatura entre 20 e 30 °C tem sido indicada para a germinação de inúmeras espécies florestais tropicais e subtropicais (Borges e Rena, 1993), dentre as quais *Dinizia excelsa* (Varela et al., 2006), *Peltogyne paniculata* (Ramos et al., 2007), *Adenantha pavonina* (Kissmann et al., 2008), *Senna alata* (Braga et al., 2010), *Tabebuia ochracea* (Oliveira et al., 2012), *Myracrodon urundeuva* (Virgens et al., 2012) e *Apeiba tibourbou* (Guedes et al., 2013).

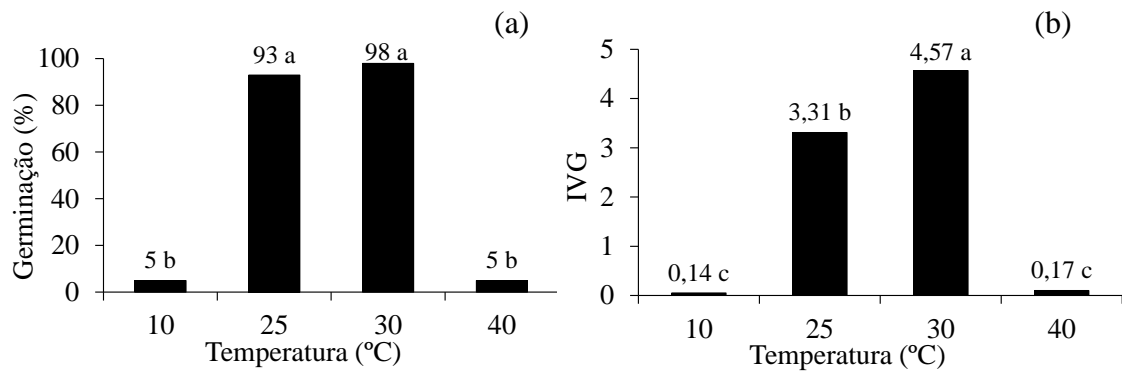


Figura 1. Germinação (a) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (b) de sementes de *Melanoxyton brauna* nas temperaturas de 10, 25, 30 e 40 °C. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si, a 5%, pelo teste de Tukey.

Nas sementes de *M. brauna*, as taxas de absorção de água são diferentes nas temperaturas analisadas, com aumento no ganho de peso à medida que se aumenta a temperatura, conforme apresentado na Figura 2. Na temperatura de 10 °C, foi observada embebição lenta e contínua no período avaliado, de modo que após 240 horas o ganho de peso foi de, aproximadamente, 120%, não sendo detectada protrusão da raiz neste período. A curva de embebição das sementes em 25 °C se ajustou ao modelo trifásico proposto por Bewley e Black (1994), com rápida absorção de água nas primeiras 60 horas de embebição (Fase I), seguida de absorção mais lenta até 120 horas (Fase II), momento que se detectou a emissão de raiz primária nesta temperatura (Fase III). Para a temperatura de 30 °C, a tendência da curva de absorção de água foi semelhante à observada para 25 °C, porém as sementes necessitam de 36 horas para atingir a fase II e 84 horas para horas para que o processo de germinação se completasse e ocorresse a protrusão da raiz. O ganho de peso a 40 °C foi superior às demais temperaturas durante a embebição das sementes, sendo verificado aumento de 140% após 60 horas de embebição e 160% ao final das 240 horas analisadas, contudo sem protrusão radicular.

Para que uma semente germine, é necessário que o meio forneça água suficiente para a ativação das reações químicas relacionadas ao metabolismo e, com isto, seja desencadeado o processo de retomada do desenvolvimento do embrião (Beckert e Silva, 2002). A fase inicial de embebição das sementes é um processo físico, governado pelas diferenças de potencial hídrico entre a semente e o meio (Bewley et al., 2013), sendo este processo significativamente influenciado pela temperatura. Quanto maior a temperatura, menor o coeficiente de viscosidade da água (η), representando uma

absorção mais rápida pelos tecidos (Vertucci e Leopold, 1983), conforme observado no gradiente de absorção de água pelas sementes às temperaturas de 10, 25, 30 e 40 °C.

A fase II é caracterizada pela sequência de eventos metabólicos preparatórios para a protrusão radicular, quando ocorrem a síntese de novo de enzimas, a síntese de proteínas e a digestão de reservas necessárias para o crescimento do embrião (Marcos Filho, 2005). No presente trabalho, as temperaturas acima ou abaixo da faixa ótima de germinação das sementes de *M. brauna* não possibilitaram condições adequadas para o desenvolvimento do metabolismo celular, sem protrusão da raiz primária e conclusão do processo germinativo.

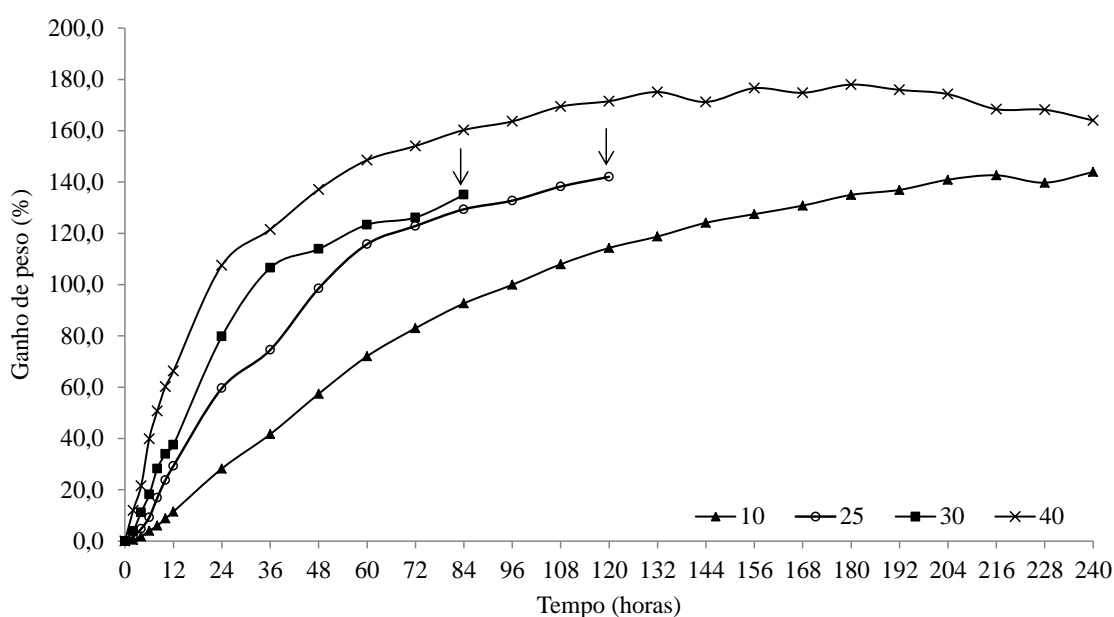


Figura 2. Curva de embebição de sementes de *Melanoxylon brauna* nas temperaturas de 10, 25, 30 e 40 °C. As setas indicam a protrusão da raiz primária em pelo menos 50% das sementes.

O teor inicial de lipídios dos cotilédones das sementes de *M. brauna* era de 39,3%, com decréscimo ao longo do período de embebição nas diferentes temperaturas, conforme apresentado na Figura 3. Tais decréscimos corresponderam a reduções de 13,54, 16,08 e 14,05% durante as 96 horas de germinação nas temperaturas de 10, 25 e 40 °C, respectivamente (Figuras 2a, b e d). A 30 °C, a diminuição no conteúdo de lipídios observada entre o tempo inicial e 72 horas de embebição foi de 13,68%, com novo acúmulo nessa reserva em 96 horas de embebição (Figura 2c). Estes resultados indicam que, mesmo nas temperaturas 10 e 40 °C, fora da faixa ótima de germinação da

espécie, as reservas lipídicas estão sendo consumidas e transportadas para serem utilizadas pelo eixo embrionário, ainda que em pequenas taxas.

Durante a germinação, os lipídios são hidrolisados e convertidos a sacarose pela β -oxidação e ciclo do glioxalato, para fornecerem energia e esqueletos de carbono para a plântula em formação (Buckeridge et al., 2004b; Graham, 2008; Theoudoulou e Eastmond, 2012). Pritchard et al., 2002 demonstraram que a germinação e a mobilização de lipídios são reguladas independentemente em sementes de *Arabidopsis*, ao observarem que a mobilização lipídica é metabolicamente ativa na presença de ABA, que as enzimas e sinais que iniciam a digestão dessas reservas estão presentes e que ocorre acúmulo de sacarose, embora não se tenha germinação nas mesmas condições.

Segundo Hooks et al. (2010), o processo de mobilização das reservas lipídicas se tornará especialmente importante no período pós germinativo e no estabelecimento das plântulas, até o momento em que estas se tornem autotróficas. Corte et al. (2006) e Lima et al. (2008) observaram acentuado declínio nos teores de lipídios de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* e *Aniba rosaeodora* imediatamente após a protrusão da radícula.

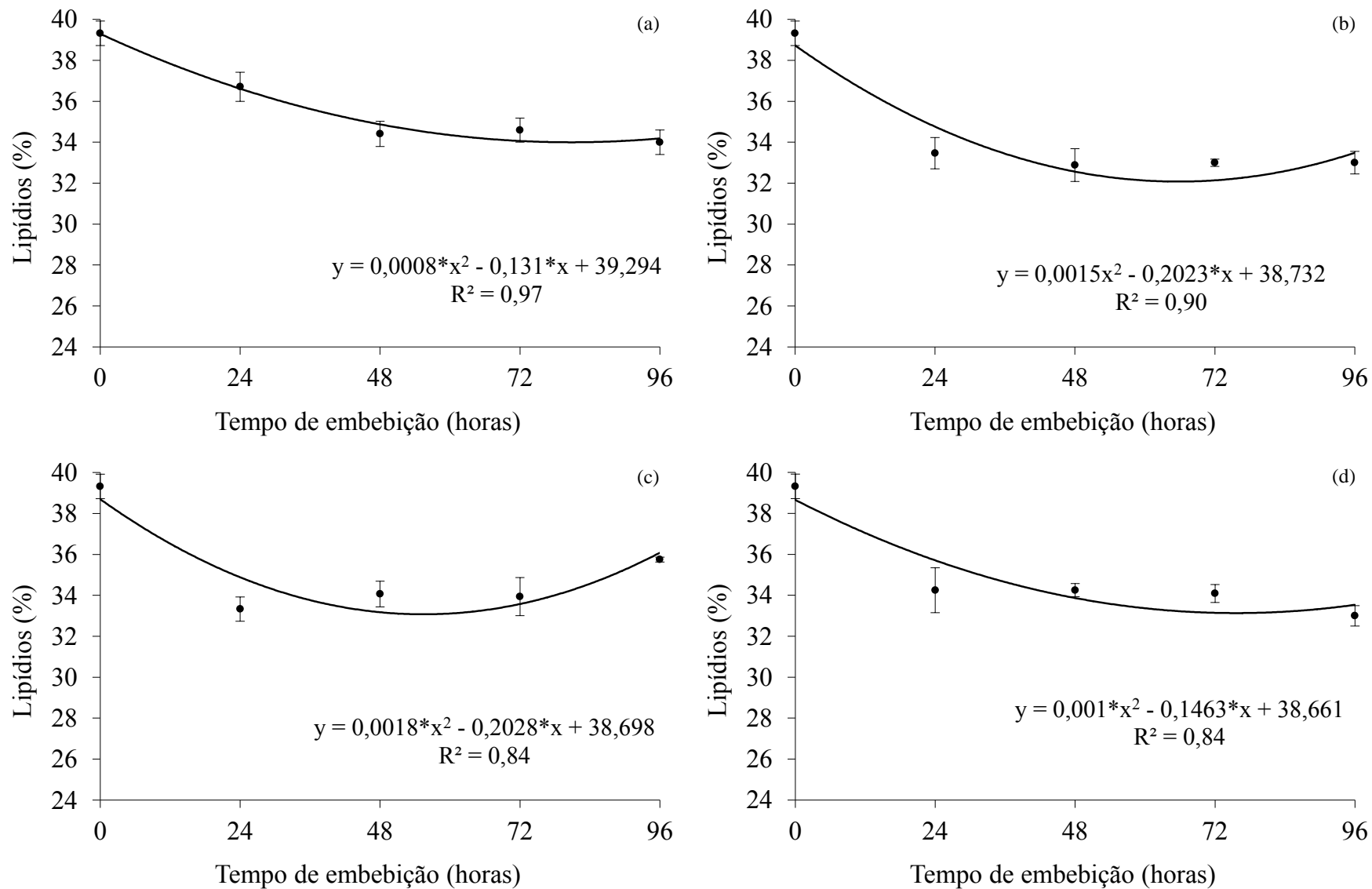


Figura 3. Porcentagem de lipídios de cotilédones de sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação nas temperaturas de 10 (a), 25 (b), 30 (c) e 40 °C (d). * - Significativo a 5%, pelo teste t ($p < 0,05$).

Pela observação das alterações nas reservas de açúcares solúveis pode-se inferir que estas foram prontamente utilizadas durante a germinação das sementes em todas as temperaturas, porém maiores decréscimos foram observados nas temperaturas de 25 e 30 °C (Figura 3b e 3c). Nestas, o teor de açúcares solúveis decresceu de 713,15 para 434,75 e 455,45 mg.g⁻¹ (redução de 39,04 e 36,14%), respectivamente, enquanto para as temperaturas de 10 e 40 °C (Figuras 3a e 3d) tal decréscimo não ultrapassou 25%, com valores correspondentes a 554,83 e 550,50 mg.g⁻¹ após 96 horas de embebição. Neste contexto, possivelmente, na faixa ótima de temperatura para germinação das sementes de *M. brauna* (25-30 °C) o metabolismo é estimulado pela assimilação e translocação mais eficiente dos carboidratos de reserva. Os decréscimos nos teores de açúcares solúveis nos cotilédones indicam que estes foram, aparentemente, usados na respiração durante a fase inicial de embebição.

Os carboidratos pré-formados nas sementes servem como substrato da respiração durante o período pré-germinativo (Bewley et al., 2013), sendo os oligossacarídeos da série rafínósica utilizados como fontes primárias de energia em sementes de *Sesbania marginata*, *Trigonella foenum-graecum*, *Dalbergia nigra* e *Vicia faba*, respectivamente (Buckeridge e Dietrich, 1996; Dirk et al., 1999; Carrijo et al., 2010; Goyoaga et al., 2011). Logo após a hidratação das sementes, inicia-se o processo de reparo dos tecidos que foram danificados durante a secagem, cujo gasto de energia é suprido pelas reservas de sacarose, possibilitando às células os níveis de atividade metabólica necessários para sustentar o desenvolvimento do embrião (Buckeridge et al., 2004).

Além da temperatura, alterações nas reservas de carboidratos também foram observadas em resposta ao estresse salino durante a germinação, simulado com polietileno glicol em sementes de *Erythrina velutina* (Reis et al., 2012), ou à presença de metais pesados, tais como cádmio em *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris* (Rahoui et al., 2008; Sfaxi-Bousbih et al., 2010) e alumínio nas sementes de *Oryza sativa* (Misra e Duhbei, 2008).

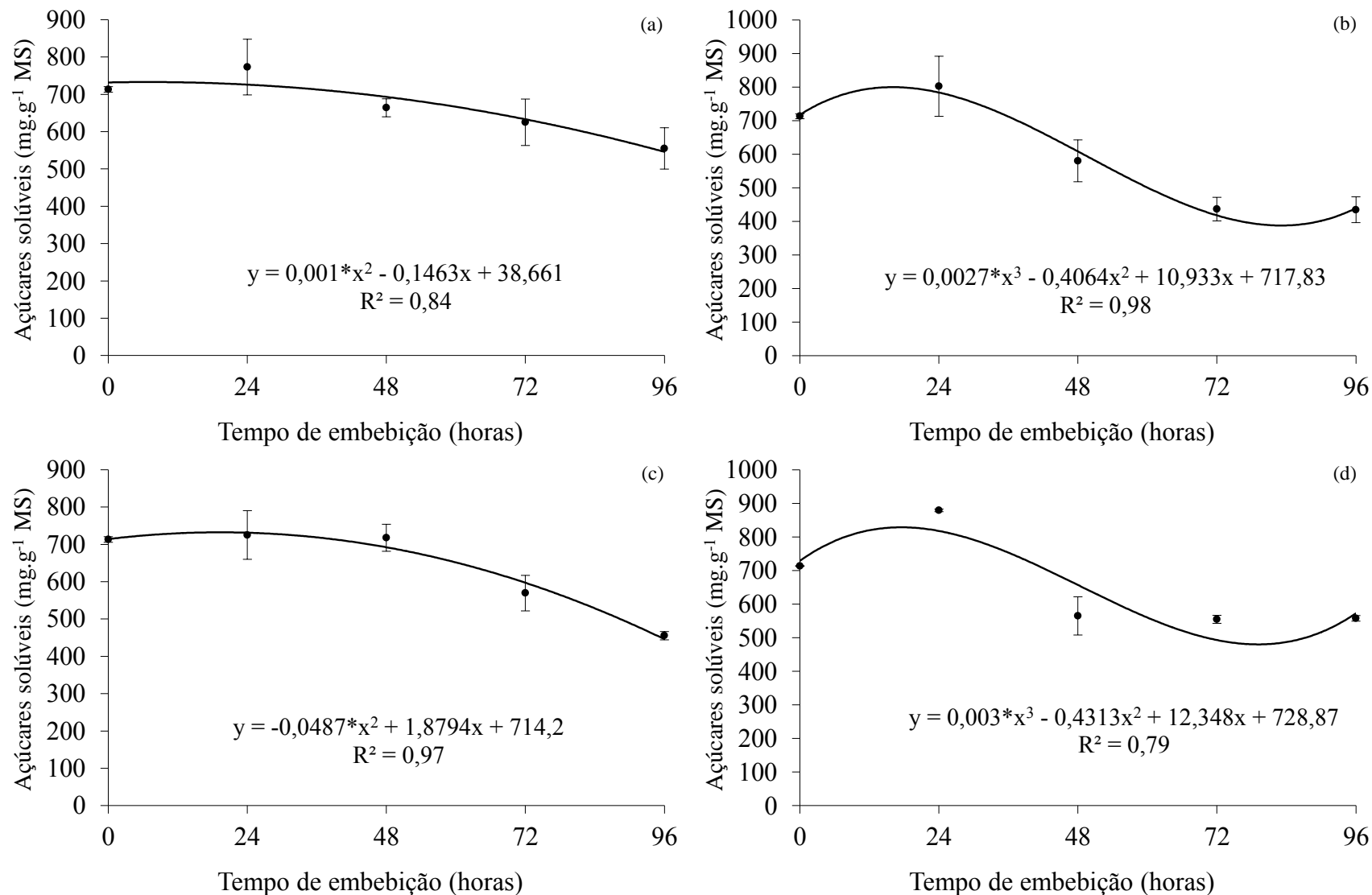


Figura 5. Açúcares solúveis (mg. g⁻¹ de massa seca) de cotilédones de sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação nas temperaturas de 10 (a), 25 (b), 30 (c) e 40 °C (d). * - Significativo a 5%, pelo teste t (p<0,05).

Os teores médios de amido durante a germinação das sementes na temperatura de 10 °C decresceram após 72 horas de embebição, com novo acréscimo, no tempo de 96 horas (Figura 6a). Na temperatura de 25 °C, foram observados decréscimos do tempo zero (44,64 mg.g⁻¹ MS) até 48 horas de embebição (29,49 mg.g⁻¹ MS), com tendência de estabilização em seguida, até as 96 horas, que manteve valores de 29,25 mg.g⁻¹ MS (Figura 6b). Houve mobilização do amido até 72 horas após início da embebição em 30 °C, correspondendo a decréscimo de 43,22% (19,29 mg.g⁻¹ MS) em relação ao teor inicial da reserva, porém com novo incremento em 96 horas (Figura 6c). Para a temperatura de 40 °C, os teores médios de amido decresceram de 44,64 mg.g⁻¹ MS no início da embebição para 37,82 mg.g⁻¹ MS após 96 horas de embebição, indicando pequena variação no período analisado (Figura 6d).

Por esses resultados verifica-se que a mobilização do amido foi afetada pelas condições de temperatura durante a germinação. A maior variação na temperatura de 10 °C, no tempo de 72 horas, pode ser devido à amostragem, tendo em vista que a hidratação das sementes naquele tempo estava abaixo das demais e não resultou em protrusão radicular. Não houve, portanto, razão aparente para tal decréscimo, que indicaria possível utilização. Às temperaturas de 25 e 30 °C, o amido foi consumido até as primeiras 72 horas após início da embebição, fornecendo energia para o crescimento dos tecidos do eixo embrionário. Na temperatura de 30 °C, o aumento nas reservas de amido observado em 96 horas pode ser devido à protrusão da radícula, com síntese de novas estruturas de carbono para permitir o desenvolvimento da plântula. Na embebição das sementes sob temperatura de 40 °C, a temperatura supra ótima possivelmente acarretou danos ao sistema enzimático do metabolismo do amido, prejudicando a degradação do polissacarídeo.

O acúmulo de amido nas sementes no período pós-germinativo à temperatura de 30°C pode ser atribuído à formação de amido transitório, resultante do início da mobilização das reservas lipídicas, que são convertidos em glicose por gliconeogênese e podem ser armazenados temporariamente como amido (Shimara e Hara-Nishimura, 2010), conforme observado por Bicalho (2011).

A mobilização de amido nos cotilédones das leguminosas é realizada pela ação de amilases, e resulta na produção de sacarose, sendo este o produto final da digestão dessa reserva (Buckeridge et al., 2004b). Segundo Tan et al. (2013), a utilização de sacarose proveniente da mobilização do amido durante a germinação é afetada por diferentes condições ambientais, tais como presença de metais pesados, ácido abscísico, infecção por patógenos e estresse salino.

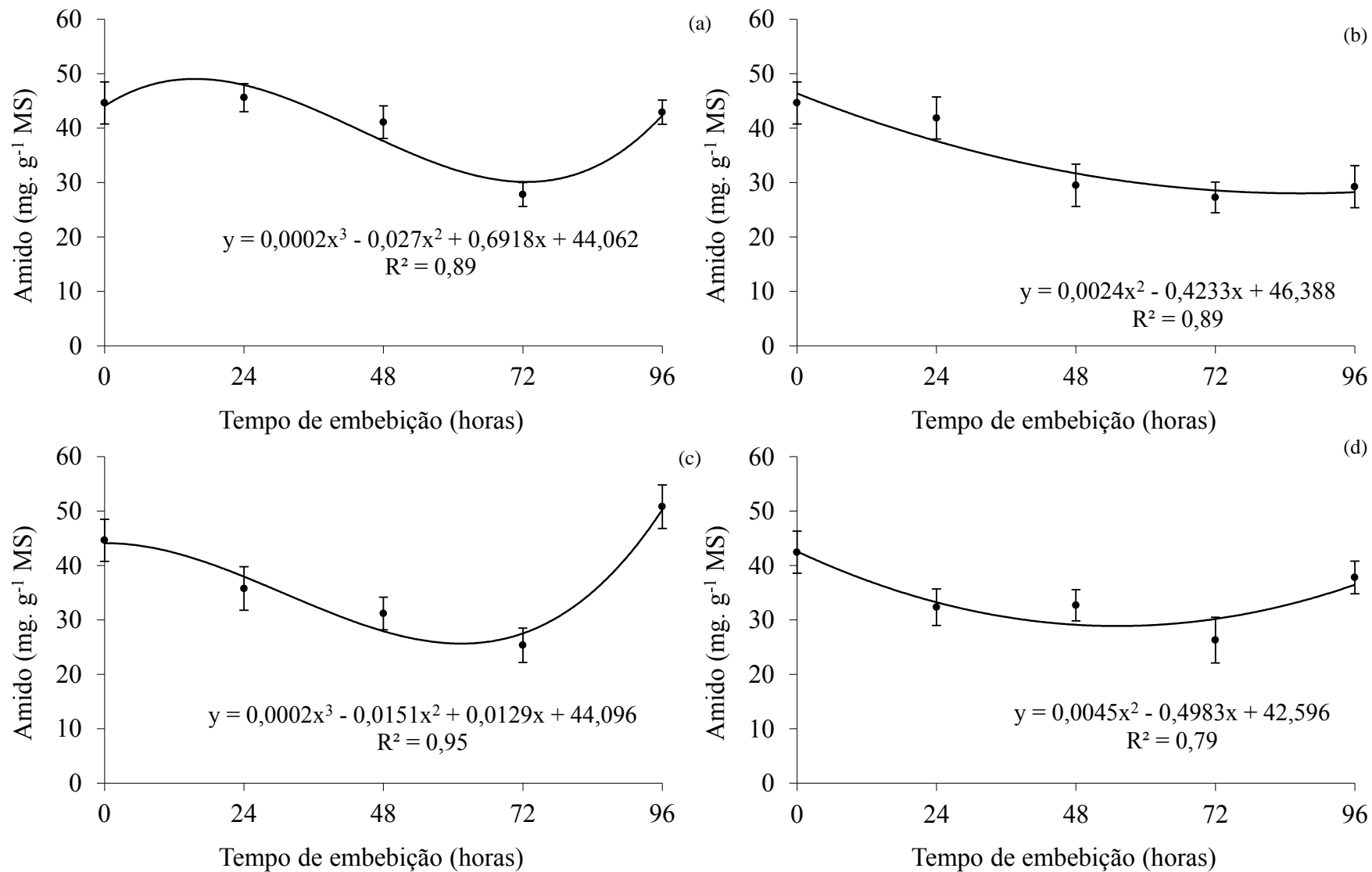


Figura 6. Teores médios de amido (mg. g⁻¹ de massa seca) de cotilédones de sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação nas temperaturas de 10 (a), 25 (b), 30 (c) e 40 °C (d).

Eixos embrionários e cotilédones das sementes de *M. brauna* apresentaram tendência de mobilização de proteínas solúveis em todas as temperaturas analisadas, com predominância nos cotilédones, nas primeiras 48 horas de embebição (Figura 7). Observou-se quantidade um pouco superior de proteínas solúveis nos eixos embrionários das sementes secas ($46,78 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$), quando comparado aos cotilédones ($43,74 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$). Em 10°C , os valores de proteínas solúveis nos eixos embrionários foram relativamente estáveis por 72 horas. Nos cotilédones verificou-se decréscimo contínuo nos teores. Na temperatura de 40°C , houve redução contínua e similar nos teores de proteínas entre eixos embrionários, representando decréscimo de 29,23 e 37,01% em eixos embrionários e cotilédones, respectivamente, após 96 horas.

Nas temperaturas 25 e 30°C foram observados decréscimos progressivos nos teores de proteínas em eixos embrionários ao longo da embebição, com destaque para o grande consumo nessa reserva após 72 horas de embebição a 30°C , atingindo valores de $10,82 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ em 96 horas, o que representa redução de 76,86% em relação aos teores iniciais. Assim, a hidrólise das reservas protéicas ocorreu em todas as temperaturas avaliadas, porém foi mais expressiva após a emissão da radícula a 30°C .

As proteínas são acumuladas nas sementes em compartimentos denominados corpos protéicos, servindo como fonte de nitrogênio, o qual será utilizado para a síntese de novos aminoácidos e subsequente síntese de novas proteínas durante o processo de germinação (Müntz et al., 2001).

Essas proteínas de reserva são sintetizadas durante o desenvolvimento da semente e hidrolisadas a partir da atividade de enzimas proteolíticas, responsáveis por catalisar a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas, podendo atuar nas ligações internas (proteínases ou endopeptidases) ou entre os resíduos de aminoácidos C- ou N- terminal (protease ou exopeptidases) (Müntz et al., 2001; Shen e Chou, 2009). Segundo Buckeridge et al. (2004b), por serem as únicas reservas que possuem nitrogênio em sua composição, as proteínas são mobilizadas também para a estruturação dos processos que conferem capacidade de absorver nutrientes e de realizar fotossíntese.

A mobilização mais intensa de proteínas no período pós-germinativo em dicotiledôneas é devido principalmente ao abaixamento do pH nos vacúolos pela introdução de íons H^+ após a germinação, tornando o meio favorável à atividade das proteases, associado à síntese de novas proteínas neste período, que fornecem substrato para as endo e exopeptidases (Bewley et al., 2013).

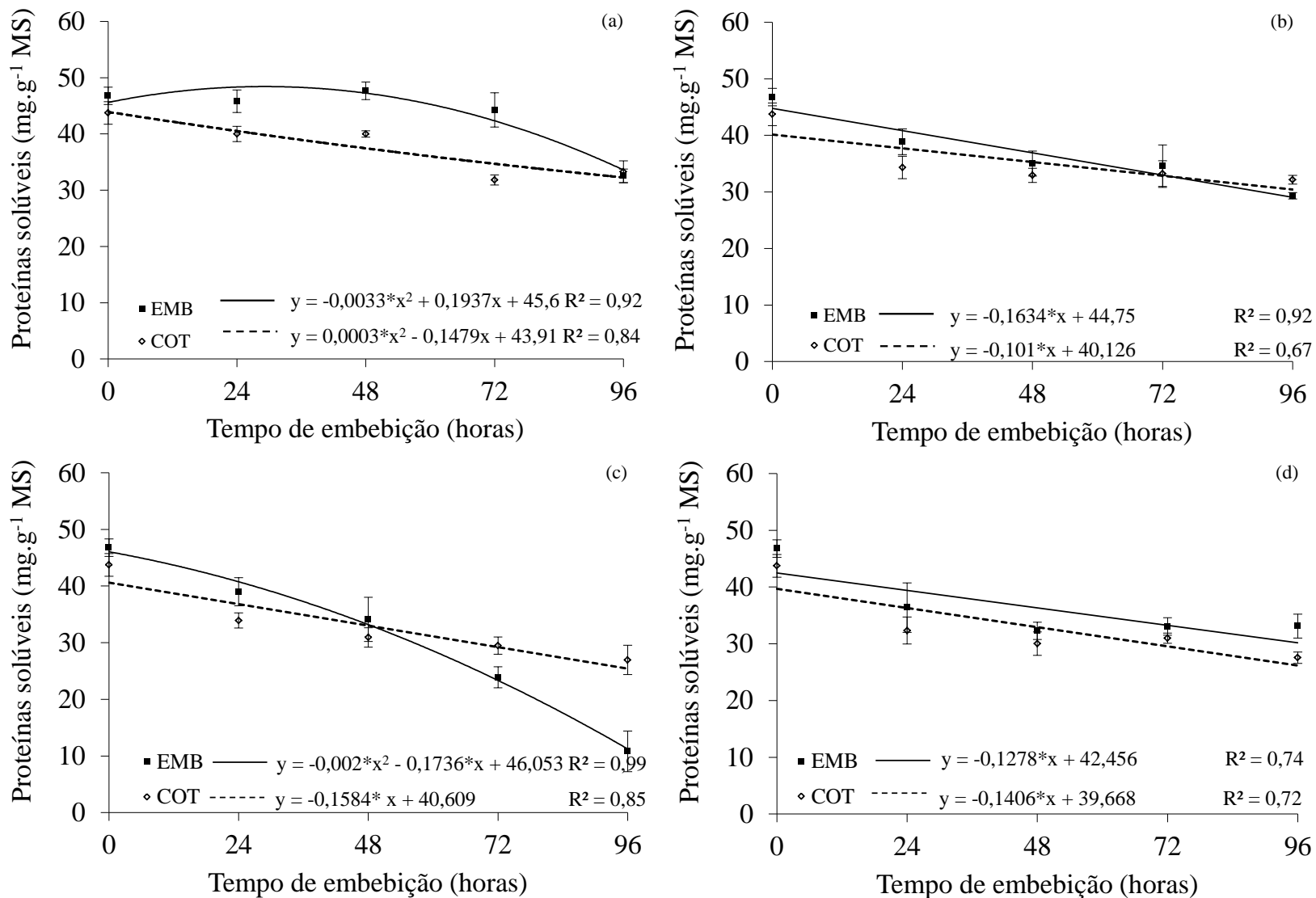


Figura 7. Proteínas solúveis (mg. g⁻¹ de massa seca) em eixos embrionários (EMB) e cotilédones (COT) de sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação nas temperaturas de 10 (a), 25 (b), 30 (c) e 40 °C (d). * - Significativo a 5%, pelo teste t (p<0,05).

A atividade específica da enzima α -amilase apresentou tendência de aumento nas primeiras 24 horas de germinação na temperatura de 10 °C, mantendo-se constante até o final do período avaliado (96 horas), conforme apresentando na Figura 8a. Nas temperaturas de 25 e 30 °C, a atividade da enzima permaneceu sempre em crescimento durante o processo germinativo, atingindo valores máximos após 96 horas de embebição (Figuras 8b e 8c). Tais valores representam aumento de 77,1 e 62,7% em relação ao total inicial da enzima (0,01475 mg glicose.mL⁻¹.mg⁻¹ proteína), enquanto na germinação das sementes a 40 °C a enzima α -amilase exibe aumento na atividade específica até 48 horas e decresce em seguida, estabilizando após 72 horas, com médias próximas a 0,0186 mg glicose.mL⁻¹.mg⁻¹ proteína em 72 e 96 horas de embebição (Figura 8d).

Para a β -amilase, a atividade da enzima detectada no tempo zero foi de 0,01018 mg glicose.mL⁻¹.mg⁻¹ proteína, a qual aumentou durante a germinação das sementes nas temperaturas 10, 25 e 30 °C, atingindo valores de 0,01899, 0,01956 e 0,01955 mg glicose.mL⁻¹.mg⁻¹ proteína após 96 de embebição. Em 40 °C, a atividade da enzima permaneceu estável durante o período de observação. Assim, as temperaturas de 10 e 40 °C, abaixo e acima da faixa ótima de germinação das sementes de *M. brauna*, respectivamente, influenciaram negativamente na atividade das enzimas.

Em condições fisiológicas adequadas, as enzimas que atuam no processo germinativo são sintetizadas e ativadas com o progresso da hidratação das sementes, durante as fases I e II da embebição, em resposta à atividade hormonal (Marcos Filho, 2005). As amilases são enzimas hidrolíticas que provocam clivagens nas moléculas de amido pela adição de água, de forma que a α -amilase é a enzima inicial na mobilização da reserva, hidrolisando as ligações internas α -1,4 de glicanos lineares ou ramificados da molécula de amilopectina (Smith et al., 2005). A β -amilase atua posteriormente à α -amilase, desdobrando ligações α -1,4 sequencialmente alternadas, a partir da extremidade não redutora de uma cadeia glucânica, produzindo maltose, a qual será transportada para o citosol e hidrolisada pela enzima α -glicosidase a glicose (Helland et al., 2002).

O aumento na atividade de amilases durante a germinação foi observado nas sementes de *Aniba rosewood* (Lima et al., 2008), *Hordeum vulgare* (Santos et al., 2010), *Sorghum vulgare* (Raimi et al., 2012) e *Cajanus cajan* (Laura et al., 2013). Em sementes de *Triticum aestivum*, a produção da enzima α -amilase foi fortemente reduzida

durante a germinação a baixas temperaturas, em comparação à atividade da enzima na temperatura ótima de germinação da espécie, estando tal comportando relacionado à inativação enzimática em condições de metabolismo mais lento (Fleming et al., 1960). Por outro lado, Tawaba et al. (2013) verificaram que, a partir da temperatura de 24 °C, aumentos de 4 a 8 °C na temperatura de germinação das sementes de *Sorghum bicolor* foram suficientes para reduzir a síntese de atividade da enzima β -amilase, relacionando a menor liberação de maltose e maltotriose em altas temperaturas à minimização da síntese da enzima. Maior atividade de amilases relacionadas à diminuição da temperatura de germinação próxima à ótima de germinação também foi sugerida por Kaplan et al. (2004) e Kaplan e Guy (2005).

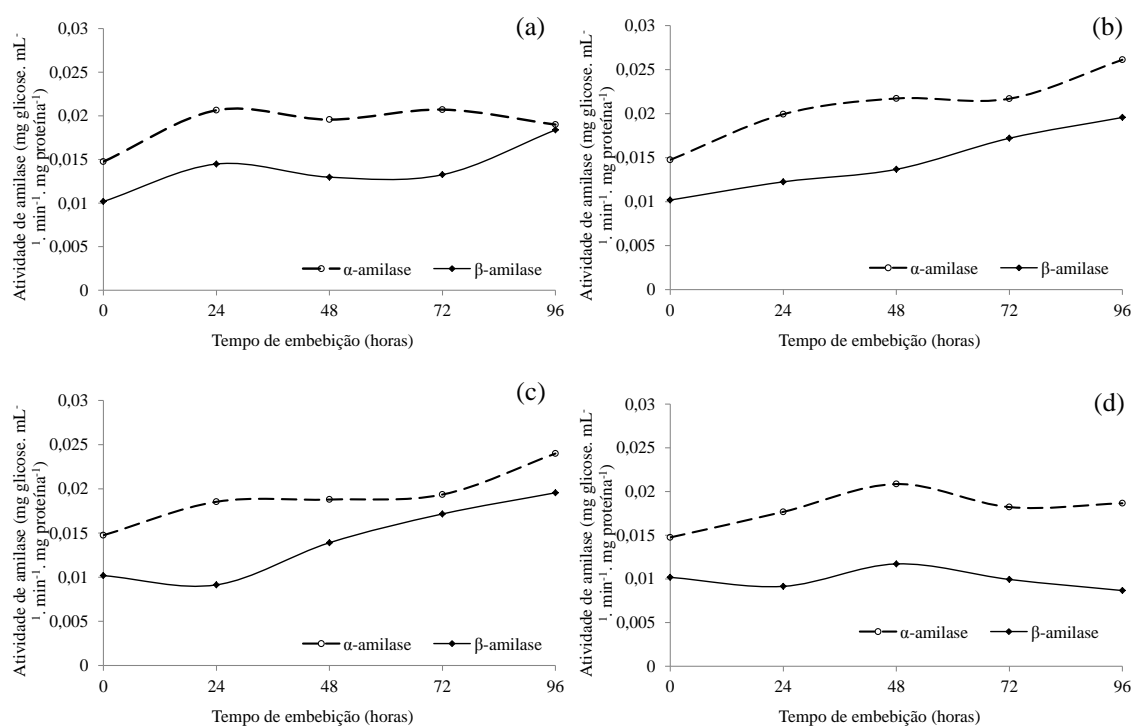


Figura 8. Atividade das enzimas α e β -amilase (mg glicose. mL⁻¹. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína) em sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação nas temperaturas de 10 (a), 25 (b), 30 (c) e 40 °C (d).

As alterações na atividade específica da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PdH) em eixos embrionários e cotilédones de sementes de *M. brauna* encontram-se na Figura 9. No tempo zero, a atividade média detectada nos eixos embrionários e cotilédones foi de, respectivamente, 0,10000 e 0,10770 $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Nas

temperaturas de 25 e 30 °C, a atividade da enzima apresentou tendência de estabilização nos cotilédones e aumento nos eixos embrionários, sendo este mais acentuado após 84 horas de embebição na temperatura de 30 °C, com acréscimos na atividade equivalentes a 333,36%, momento em que também se observou protrusão radicular nesta temperatura (Figura 2). Em 25 °C, o aumento na atividade após 96 horas correspondeu a 79,99%, atingindo valores de $0,18622 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Sob temperatura de 10 °C, a atividade da enzima foi constante nos eixos embrionários e aumentou nas primeiras 24 horas de germinação, seguida de decréscimo lento e contínuo nos cotilédones, onde chegou a $0,07979 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ao final da embebição (Figura 9a). A 40 °C, a atividade também foi estável nos eixos embrionários, enquanto nos cotilédones decresceu desde o início do período avaliado, sendo observada atividade de $0,04412 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ após 12 horas, que se manteve durante a embebição das sementes, e foi de $0,04495 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ em 96 horas (Figura 9d).

A enzima G6PdH atua no processo de respiração celular, especificamente na rota alternativa das pentoses monofosfatadas, sendo responsável pela manutenção de um nível adequado de NADPH nas células (Shan-Zhi et al., 2005). Em resposta a algum tipo de estresse, como por exemplo, nas temperaturas de 10 e 40 °C, a menor atividade da enzima pode estar associada à queda no vigor das sementes (Figura 1b), evidenciando um possível declínio das funções metabólicas internas. Em *Oryza sativa*, a atividade respiratória e da enzima G6PdH apresentou alta relação com a qualidade fisiológica das sementes expostas a diferentes temperaturas, onde a exposição a temperaturas superiores a 25 °C depreciaram a qualidade das sementes da espécie (Marini et al., 2013). A associação da atividade da G6PdH com a perda da qualidade também foi verificada em sementes de *Glycine max* (Muniz et al., 2007).

Por ser a primeira enzima geradora de NADPH na rota das pentoses fosfatadas (Wakoo et al., 2008), células deficientes em G6PdH são altamente sensíveis ao estresse oxidativo, em comparação àquelas que expressam atividade endógena adequada da enzima (Liu et al., 2007), associado ao fato da enzima G6PdH ser uma enzima reguladora da rota oxidativa (Taiz e Zeiger, 2009), o que permite supor que o estresse causado pelas temperaturas acima e abaixo da faixa ótima de germinação das sementes de *M. brauna* possivelmente resultaram em menos energia disponível para os processos de biossíntese durante a germinação, devido à menor atividade da enzima.

Em contrapartida, a elevação da atividade da enzima G6PdH no período pós-germinativo a 30 °C expressou a eficiência da atividade respiratória neste período, quando a nova plântula apresenta maiores taxas de respiração, em comparação à embebição. Segundo Bewley et al. (2013), a respiração aumenta linearmente à medida em que mais substratos estão disponíveis para as sementes, justificando as amplas taxas de consumo de oxigênio e mobilização de reservas no período pós-germinativo.

Taiz e Zeiger (2009) afirmam que a rota oxidativa das pentoses fosfatadas desempenha papel fundamental antes de o tecido se tornar fotoautotrófico, gerando intermediários para o ciclo de Calvin, ao mesmo tempo em que supre as células de NADPH para as reações de biossíntese e assimilação de nitrogênio.

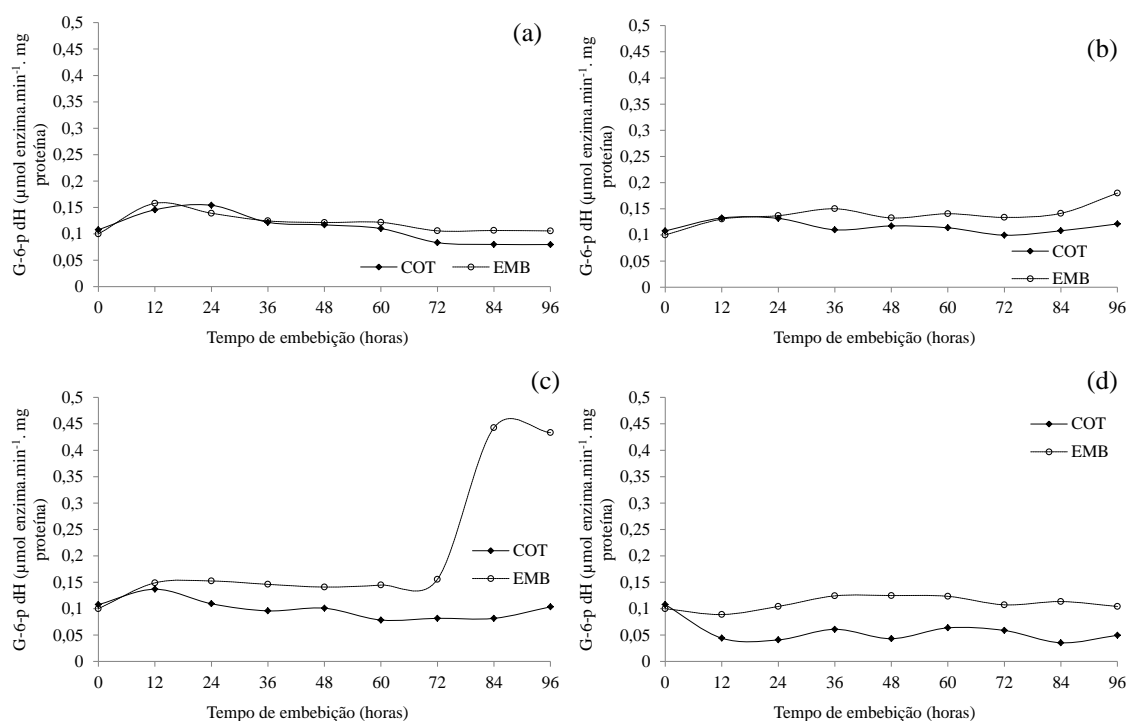


Figura 9. Atividade da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) em eixos embrionários (EMB) e cotilédones (COT) de sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação nas temperaturas de 10 (a), 25 (b), 30 (c) e 40 °C (d).

CONCLUSÕES

As alterações nas reservas de carboidratos solúveis foram as que apresentaram maior decréscimo durante o período germinativo de sementes de *Melanoxylon brauna*, enquanto as proteínas decrescem significativamente no início do período pós germinativo, à temperatura de 30 °C.

Nas temperaturas 25 e 30 °C, a atividade das enzimas α -amilase, β -amilase e glicose-6-fosfato-desidrogenase aumenta com a embebição das sementes, gerando substrato para a respiração e formação de estruturas de carbono para o crescimento.

Às temperaturas 10 e 40 °C, acima e abaixo da faixa ótima de germinação para espécie, a atividade das enzimas α -amilase, β -amilase e glicose-6-fosfato desidrogenase é reduzida, prejudicando o desenvolvimento adequado do 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.

BERNFELD, P. Amylase α and β . **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 149- 151, 1955.

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

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds. Physiology of development and germination**. Londres: Plenum Press, 1994.

BICALHO, E.M. **Germinação e mobilização de reservas de sementes de macaúba (Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex. Martius)**. Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia). 2011. 71 p.

BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑARODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 83-136.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SDA/ACS, 2009. 399p.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Galactomanans from Brazilian legume seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 13, p. 109-112, 1990.

BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; BRAGA, J. F.; DELACHIAVE, M. E. A. Escarificação ácida, temperatura e luz no processo germinativo de sementes de *Senna alata* (L.) Roxb. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2010.

BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 31-50, 2004a.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; AIDAR, M. P. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 163-185, 2004b.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Mobilization of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). **Plant Science**, v. 117, p. 33-43, 1996.

CARRIJO, L. C.L; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LOPES, M. R.; BRUNE, A. α -galactosidase activity and carbohydrate mobilization in seeds of *Dalbergia nigra* during germination. **Cerne**, v. 16, n. 3, p. 283-289, 2010.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3 ed. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 424p.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LEITE, I. T. A.; VENTRELLA, M. C.; MATHIAS, A. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, v. 30, n. 6, p. 941-949, 2006.

DIRK, L. M. A.; KROI, A. R. V.; VREUGDENHIL, D.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 41-50, 1999.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Annalitical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FLEMING, J. R.; JOHNSON, J. A.; MILLER, B.S. Effect of malting procedure and wheat storage conditions on alpha-amylase and protease activities. **Malting procedure vs. enzyme activity**, v. 37, p. 363-370, 1960.

GOYOAGA, C.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; ROMERO, C.; GUILLAMO, E.; VARELA, A.; PEDROSA, M. M.; MUZQUIA, M. Content and distribution of protein, sugars and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 391-397, 2011.

GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 115-142, 2008.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; VIANA, J. S.; GONÇALVES, E. P. Germinação e vigor de sementes de *Apeiba tibourbou* submetidas ao estresse hídrico e diferentes temperaturas. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 1, p. 45-53, 2013.

HELLAND, M. H.; WICKLUND, T.; NARVHUS, J. A. Effect of germination time on alpha-amylase production and viscosity of maize porridge. **Food Research International**, v. 35, n. 2-3, p. 315-321, 2002.

HOOKS, M. A.; ALLEN, E.; WATTIS, J. A. D. Modelling the peroxisomal carbon leak during lipid mobilization in Arabidopsis. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, n. 5, p. 1230-1233, 2010.

KISSMANN, C.; SCALON, S. P. Q.; SCALON FILHO, H.; RIBEIRO, N. Tratamentos para quebra de dormência, temperaturas e substratos na germinação de *Adenanthera pavonina* L. **Ciência Agrotécnica**, v. 32, n. 2, p. 668-674, 2008.

KAPLAN, F.; KOPKA, J.; HASKELL, D.W.; ZHAO, W.; SCHILLER, K.C.; GATZKE, N.; SUNG, D.Y.; GUY, C.L. Exploring the temperature stress metabolome of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 136, p. 4159-4168, 2004.

KAPLAN, F.; GUY, C.L. β -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1674-1684, 2004.

LAURA, J. S., SINGH, A.; RANA, J. Toxicity impacts of sewage effluent on the amylase activity of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) plant. **International Journal of Development Research**, v. 3, n. 4, p. 18-20, 2013.

LIMA, R. B. S.; GONÇALVES, J. F. C.; PANDO, S. C.; FERNANDES, A. V.; SANTOS, A. L. W. Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaeodora* ducke) seeds. **Revista Árvore**, v. 32, n. 1, p.19-25, 2008.

LIU, Y.; WU, R.; WAN, Q.; XIE, G.; BI, Y. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots. **Plant Cell Physiology**, v. 48, n. 3, p. 511-522, 2007.

LOPES, L. S.; GALLÃO, M. I.; BERTINI, C. H. C. M. Mobilisation of reserves during germination of *Jatropha* seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 371-378, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2009.

MAGALHÃES, S. R.; BORGES, E. E. L.; BERGER, A. P. A. Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake durante a germinação. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 4, p. 589-595, 2010.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluating or seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

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

MARINI, P.; MORAES, C. L.; LARRÉ, C. F.; LIMA, M. 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.

MISHRA, P.; DUBEY, R. S. Effect of aluminium on metabolism of starch and sugars in growing rice seedlings. **Acta Physiology Plantarum**, v. 30, p. 265-275, 2008.

MMA – Instrução Normativa nº 6 de 23 de setembro de 2008a. Ministério do Meio Ambiente. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção** – acesso em 1/05/2013. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/arquivos/83_19092008034949.pdf>

MUNIZ, F. R.; CARDOSO, M. G.; VON PINHO, E. V. R.; VILELA, M. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p.195-204, 2007.

MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M. A.; DUNAEVSKY, Y. E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 362, p. 1741-1752, 2001.

OLIVEIRA, A. K. M.; RIBEIRO, J. W. F.; PEREIRA, K. C. L.; SILVA, C. A. A. Temperaturas para germinação de sementes de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. **Comunicata Scientiae**, v. 3, n. 2, p. 98-103, 2012.

PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 223 p.

PONTES, C. A.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; SOARES, C. P. B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v.26, n.5, p.593-601, 2002.

PRITCHARD, S. L.; CHARLTON, W. L.; BAKER, A.; GRAHAM, I. A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 31, n. 5, p. 639-647, 2002.

RAHOUI, S.; CHAOUI, A.; FERJANI, E. E. Differential sensitivity to cadmium in germinating seeds of three cultivars of faba bean (*Vicia faba* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 451-456, 2008.

RAIMI, O.G.; OLAITAN, S.N.; FAJANA, O.O.; SANNI, J.O. Effect of germination time on fat and protein contents, and α -amylase activity of Guinea Corn (*Sorghum vulgare*). **Pakistan Journal of Food Sciences**, v. 22, n. 2, p. 86-89, 2012.

RAMOS, M. B. P.; VARELA, V. P.; RIBEIRO, M. N.; MAFRA, R. M.; BATALHA, L. F. P. Volume de água no substrato e temperatura na germinação de sementes de

mulateiro (*Peltogyne paniculata* Benth.). **Revista de Ciências Agrárias**, n. 48, p.193-203, 2007.

REIS, R. C. R.; DANTAS, B. F.; PELACANI, C. R. Mobilization of reserves and germination of seeds of *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) under different osmotic potentials. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4 p. 580-588, 2012.

SANTOS, I. J.; SANTOS, Y. L.; OLIVEIRA, M. G. A.; SILVA, P. H. A. Expressão da alfa e beta amilase durante a germinação de cevada. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 67-73, 2010.

SFAXI-BOUSBIH, A.; CHAOUI, A.; FERJANI, E. E. Copper affects the cotyledonary carbohydrate status during the germination of bean seed. **Biological Trace Element Research**, v. 137, p. 110-116, 2010.

SHAN-ZHI, L.; ZHANG, Z. Y.; LIU, W.; LIN, Y.Z.; ZHANG, O.; ZHU, B. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing-induced freezing resistance of *Populus suaveolens*. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 31, p. 34-40, 2005.

SHEN, H.; CHOU, K. Identification of proteases and their types. **Analytical Biochemistry**, v. 385, n. 1, p. 153-160, 2009.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos** - métodos químicos e biológicos. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1990. 165 p.

SMITH, A.M.; ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M. Starch degradation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 73-98, 2005.

STATSOFT INC. **Statistica data analysis system version 8.0**. Tulsa: Statsoft Inc., 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: ARTMED. 2009. 719p.

TAN, L.; CHEN, S.; WANG, S.; DAI, S. Proteomic insights into seed germination in response to environmental factors. Weinheim: WILEY-VCH & Co. **Proteomics Journal**, 52 p, 2013.

TAWABA, J. B.; BÉRA, F.; THONART, P. Modelling the β -amylase activity during red sorghum malting when *Bacillus subtilis* is used to control mould growth. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 1, p. 115-119, 2013.

THEOUDOULO, F. L.; EASTMOND, P. J. Seed storage oil catabolism: a story of give and take. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 322-328, 2012.

VARELA, V. P.; RAMOS, M. B. P.; MELO, M. F. F. Efeitos de substratos e temperaturas na germinação de sementes de *Dinizia excelsa* Duckering. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 46, p.171-179, 2006.

VIRGENS, I.O.; CASTRO, R.D.; FERNANDEZ, L.G.; PELACAMI, C.R. Comportamento fisiológico de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae) submetidas a fatores abióticos. **Ciência Florestal**, v.22, n.4, p.681-692, 2012.

WAKKO, S.; ANDRE, C.; BENNING, C. Functional analyses of cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenases and their contribution to seed oil accumulation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 146, p. 277-288, 2008.

Anatomia e histoquímica de sementes *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae) durante a germinação em diferentes temperaturas

Resumo

Do ponto de vista anatômico, pouco se conhece sobre a germinação e mobilização de reservas em sementes, especialmente quando submetidas a diferentes temperaturas. Neste contexto, no presente trabalho objetivou-se estudar a anatomia e histoquímica durante a germinação e consequente mobilização de reservas em sementes de *Melanoxylon brauna* em diferentes temperaturas. Para tanto, sementes da espécie foram colocadas para germinar às temperaturas de 10, 25, 30 e 40 °C, sob luz constante. Em sementes secas (testemunha) e após 96 horas do início da embebição, foram retiradas amostras, as quais foram fixadas em FAA₅₀ e incluídas em glicol-metacrilato. Para acompanhamento da mobilização das reservas em eixos embrionários e cotilédones, foram utilizados os reagentes xilidine ponceau (XP) para detecção de proteínas, sudan black B para lipídios e lugol para amido, além do azul de toluidina para as análises estruturais. As observações foram realizadas em microscópio óptico, a partir de seções longitudinais e transversais. As reservas proteicas encontraram-se igualmente distribuídas entre eixos embrionários e cotilédones, com maior decréscimo nas temperaturas de 25 e 30 °C. À temperatura de 40 °C, foi observado desorganização no padrão de distribuição e morfologia do material proteico, indicando desnaturação dessas proteínas devido à alta temperatura. Os lipídios, presentes em maior quantidade nos cotilédones, não apresentaram decréscimo significativo no período avaliado, enquanto houve a formação de grãos de amido, possivelmente em decorrência do catabolismo de reservas do próprio embrião. A análise estrutural comprova a presença de células vacuoladas, alongadas, justapostas e com intensa atividade celular após início da embebição das sementes.

Palavras chave: proteínas, lipídios, amido, embrião, histoquímica, análise estrutural

CHAPTER IV

Anatomy and histochemistry of *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae) seeds during germination at different temperatures

Summary

From the anatomical point of view, little is known about the germination and mobilization of reserves in seeds, especially when subjected to different temperatures. In this context, the present study aimed investigate histochemically and anatomical changes in germination and reserve mobilization in *Melanoxylon brauna* seeds at different temperatures. Therefore, seeds of species were germinated at temperatures of 10, 25, 30 and 40 ° C under constant light. In dry seeds (control) and after 96 hours of the start of imbibition, samples were taken for analysis, which were fixed in FAA₅₀ and embedded in glycol methacrylate. To follow the mobilization of reserves in embryonic axes and cotyledons were used reagents xilidine ponceau (XP) to detect proteins, sudan black B for lipids and Lugol for starch, beyond toluidine blue for structural analyzes. The observations were made under an optical microscope from sections of the longitudinal and transverse cuts. Proteins were found equally distributed between embryonic axes and cotyledons, with greater decrease at 25 and 30 ° C during germination. At a temperature of 40 ° C was observed disruption in the distribution pattern and morphology of the proteinaceous material, indicating denaturation of the proteins due to high temperature. The lipids present in greater amounts in the cotyledons, showed no significant decrease during this period, while there was the formation of starch grains, possibly due to the catabolism of reserves in the embryo itself. The structural analysis confirms the presence of vacuolated cells, elongated, juxtaposed with intense cellular activity after onset of imbibition.

Keywords: protein, lipids, starch, embryo, histochemistry, structural analysis

INTRODUÇÃO

Melanoxylon brauna é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae Caesalpinoideae de ocorrência na Floresta pluvial Atlântica do Sul da Bahia até São Paulo e Minas Gerais, utilizada para obras externas e hidráulicas, mourões, postes, construção civil, e com características ornamentais que a recomendam para o paisagismo em geral (Lorenzi, 2009). Devido ao alto valor comercial de sua madeira e à exploração sem replantios, a espécie atualmente encontra-se na “Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçada de extinção”, na categoria vulnerável, segundo instrução normativa do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2008).

As sementes de *M. brauna* são ovais, de coloração marrom escuro, coriáceas e com superfície lisa a pouco rugosa (Gunn, 1991). Segundo o autor, as sementes da espécie são ausentes em endosperma, classificando estas sementes como exalbuminosas, ou seja, sementes que, até seu amadurecimento, utilizam as substâncias de reserva presentes no endosperma para o desenvolvimento do embrião. Os cotilédones, portanto, atuam como órgão de reserva.

Estudos com a família Fabaceae, uma das mais representativas nas formações florestais brasileiras (Lima et al., 2007), vêm sendo desenvolvidos em diferentes linhas de pesquisa, como na florística (Silveira e Miotto, 2013), propagação (Alves et al., 2012; Fermino Junior e Scherwinski-Pereira, 2012), sistemas agroflorestais (Melotto et al., 2009; Fernandes et al., 2010) e na etnobotânica (Landim e Costa, 2012).

Particularmente, a avaliação anatômica foi destacada como instrumento fundamental na identificação e separação de espécies de um mesmo gênero por Silva et al. (2012a), ao avaliar as características anatômicas das folhas de cinco espécies da família, e por Moreira-Conegliani e Oliveira (2006), que relataram a importância das descrições anatômicas de limbos cotiledonares e eofilares de 15 espécies de Fabaceae Caesalpinoideae como subsídio para interpretações filogenéticas e taxonômicas da família.

Entretanto, diante da diversidade e complexidade das espécies presentes na família Fabaceae, associada à importância ecológica e econômica que representa, pouco se conhece sobre a anatomia das diferentes espécies da família, de *M. brauna* em particular, especialmente na germinação e mobilização de reservas. Para Crestana e Beltrati (1988), estudos anatômicos e morfológicos da germinação de sementes de

espécies florestais tropicais são fundamentais, haja vista a demanda por seus produtos e a redução das populações naturais em face das alterações ambientais provocadas principalmente pelo desmatamento continuado.

A germinação pode ser caracterizada como o processo de retomada do crescimento do embrião fisiologicamente maduro, que se inicia com a absorção de água pelas sementes, a qual ativa seu metabolismo e leva à expansão do embrião e protrusão da raiz primária ou outra estrutura embrionária através dos tecidos circundantes (Bewley et al., 2013). Durante este processo, ocorre a mobilização das reservas armazenadas nos tecidos das sementes, as quais visam fornecer nutrientes para o crescimento das plântulas até que estas se tornem autotróficas (Castro e Hilhosrt, 2004).

Dentre os fatores abióticos que afetam a germinação, a temperatura pode interferir na capacidade germinativa das sementes, ao controlar as reações bioquímicas do metabolismo, ativando enzimas do processo e interferindo na mobilização de reservas, uma vez que a germinação ocorre em limites bem definidos de temperatura, dentro dos quais existe uma temperatura em que o processo ocorre com maior eficiência (Carvalho e Nakagawa, 2000). Para *M. brauna*, a faixa ótima para germinação das sementes da espécie situa-se entre as temperaturas de 25 e 30 °C, conforme observado no Capítulo 2.

Diante do exposto, no presente trabalho objetivou-se estudar a anatomia e histoquímica de sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação em diferentes temperaturas.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no período de janeiro a julho de 2013. Foram utilizadas sementes de *Melanoxylon brauna* coletadas em setembro de 2012 na região de Leopoldina, Minas Gerais. Os frutos foram secos ao sol e beneficiados manualmente para extração das sementes, sendo eliminadas as sementes imaturas, deterioradas ou danificadas por pragas e doenças.

Cinco repetições de 20 sementes de *M. brauna* foram colocadas para embeber em água, em placas de Petri com 9 cm de diâmetro forradas duplamente com papel germitest, às temperaturas de 10, 25, 30 e 40 °C, sob luz constante proporcionada por quatro lâmpadas de 40W tipo luz do dia, por 10 dias. Nestas condições, as sementes da espécie apresentaram germinação média de 5, 93, 98 e 5%, respectivamente, computadas pelo número de sementes que emitiram raiz primária no período.

Para as análises anatômicas e histoquímicas, foram retiradas amostras de sementes sem embebição (testemunha) e após 96 horas de embebição em cada temperatura (Figuras 1A-E). Os embriões foram separados em eixo embrionário e cotilédones. Nas sementes da testemunha e após 96 horas nas temperaturas 10, 25, 30 e 40 °C, o teor de água médio das sementes foi de 10,5, 49,2, 60,2, 67,7 e 70,8%, respectivamente.

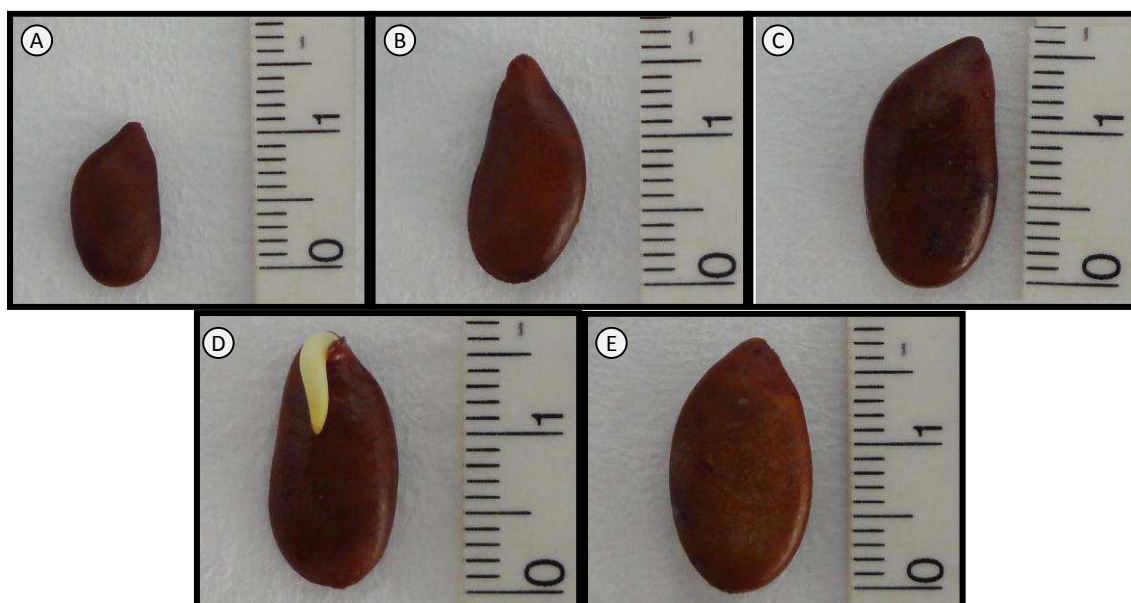


Figura 1. Estádios do processo germinativo de sementes de *Melanoxylon brauna* onde foram feitas as coletas: sementes sem embebição (A – testemunha) e após embebição em diferentes temperaturas (B – 10 °C; C – 25 °C; D – 30 °C; E – 40 °C).

As amostras foram fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%, 1:1:18, v/v) por 48 horas e estocadas em álcool 70%. Posteriormente as amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica®)

(Johansen, 1940). As seções transversais e longitudinais (5 µm de espessura) foram obtidas com o auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático.

Para avaliação das alterações na composição das células, as seções obtidas foram coradas com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien et al. 1964) para metacromasia. Os testes histoquímicos realizados para detecção dos compostos de reserva das sementes foram: Sudan black B, para localização de compostos lipídicos (Johansen, 1940); Xilidine Ponceau para identificar proteínas (Vidal, 1977); e Lugol para a localização de amido (Johansen, 1940).

As observações e a documentação fotográfica do laminário permanente foram realizadas em microscópio de luz Olympus (AX-70), equipado com sistema fotográfico U-photo, e o software utilizado foi o Spot-Basic.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da caracterização histoquímica das sementes de *M. brauna* na testemunha quanto à presença ou ausência dos compostos proteínas, lipídios e amido encontra-se na Tabela 1 e representada na Figura 2.

Os cotilédones, observados em seção transversal, apresentam epiderme adaxial e abaxial, constituídas de uma camada de células justapostas e parênquima indiferenciado na maior parte do órgão, sem nenhuma célula com parede lignificada, conforme observado na Figura 2A.

Em corte longitudinal, é possível observar que o eixo embrionário tem seção elíptica, tendo sido seccionado em ápice e região do córtex (Figuras 2B e 2C, respectivamente). Na extremidade radicular do eixo embrionário se observa um primórdio de coifa (Figura 2B), constituído de células pequenas com aspecto homogêneo. Durante a germinação, tal região se desenvolverá, funcionando como a estrutura de rompimento do tegumento (Flores, 2011).

O meristema fundamental preenche as regiões cortical e medular, exibindo células de conteúdo denso. O procâmbio compõe-se de células alongadas, de citoplasma denso e não apresenta grande diferenciação. Verifica-se a presença de uma plúmula moderadamente desenvolvida localizada na região proximal à interseção aos cotilédones (Figuras 2C, 2F e 2I), em concordância com Gunn (1991).

Oliveira (1999), estudando a morfo-anatomia do embrião de 15 leguminosas arbóreas nativas, observou em espécies da subfamília Caesalpinoideae presença de plúmula diferenciada, associada a embriões com epicótilo alongado, células do procâmbio indiferenciado e extremidade radicular com primórdio caracterizado de coifa, semelhante ao observado no presente estudo, contribuindo com subsídios adicionais para trabalhos de sistemática e filogenia dessa subfamília.

Os cotilédones e eixos embrionários de sementes da testemunha corados pelo reagente Xilidine Ponceau (XP) evidenciaram a presença de proteínas totais (Figuras 2A, 2B e 2C). Todas as seções avaliadas apresentaram semelhança quanto ao padrão de coloração observada, indicando a distribuição uniforme de proteínas no embrião.

Segundo Bortolloto et al. (2008), as proteínas são os componentes básicos de toda célula viva, e, nas sementes exercem duas funções principais, atuando como substância de reserva e com funções metabólicas ou estruturais, na maioria das vezes catalisando reações químicas. Como compostos de reserva, as proteínas estão alocadas em subestruturas celulares denominadas corpos proteicos (Shewry, 1995; Herman e Larkins, 1999; Shewry e Halford, 2002;), e, durante o processo germinativo, são hidrolisadas a aminoácidos, os quais são utilizados na germinação e crescimento da plântula (Borges e Rena, 1993). A presença de proteína, como material de reserva de sementes, foi detectada em *Dalbergia miscolobium* (Silva et al., 1997), *Moringa oleifera* (Gallao et al., 2006) e *Phenakospermum guyanense* (Oliveira et al. 2012).

Lipídios totais foram evidenciados com o teste Sudan Black B, sendo observada maior presença de corpos lipídicos nas células dos cotilédones, quando comparados aos eixos embrionários (Figuras 2D, 2E e 2F). Nos cotilédones, os corpos lipídicos encontraram-se homogeneamente distribuídos por todo o mesofilo cotiledonar, enquanto nos eixos embrionários foram visualizados pequenos corpos oleaginosos dispersos na região do ápice e próximo à interseção da plúmula.

Os principais lipídios armazenados como reservas nas sementes são os triacilgliceróis, formados pela esterificação do glicerol com diferentes ácidos graxos (Borges e Rena, 1993; Bewley et al., 2013). Estes triacilgliceróis estão presentes em pequenos corpúsculos celulares, delimitadas por membrana de fosfolipídios e oleosinas (proteínas associadas), chamadas de corpos oleaginosos (Feussner et al., 1995; Buckeridge et al., 2004), ou gotas lipídicas (Sorokin, 1976).

O teste de lugol, utilizado para a detecção de amido, apresentou reação negativa no material analisado para as sementes antes do início da embebição, conforme observado nas Figuras 2G, 2H e 2I. O amido é um polissacarídeo composto por unidades de glucose, organizadas em dois homopolissacarídeos, a amilose e a amilopectina (Amaral et al., 2007). A amilose praticamente não apresenta ramificações, sendo as unidades de glucose conectadas por ligações glicosídicas do tipo α (1,4), enquanto a amilopectina, uma das maiores biomoléculas conhecidas, é altamente ramificada e possui cadeias de resíduos de glucose ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo α (1,4) com ramificações α (1,6) (Myers et al. 2000).

Ao reagir com a solução de lugol, as cadeias de amilose adquirem coloração azul a arroxeadada, e a amilopectina coloração avermelhada, sendo a coloração final dependente da proporção dos dois compostos, que normalmente varia de azul escuro para azul violeta (Albrechtová, 2004). Santos et al. (2013) destacam ainda que o iodo metálico presente no lugol forma complexos com a cadeia de amilose do amido, formando um composto de cor roxa. Assim, a não detecção histoquímica do amido nas sementes da testemunha pode ser devido ao fato da amilose encontrar-se em pequenas quantidades no tecido. Gallao et al. (2006) relatam ainda que em sementes que apresentam grande quantidade de proteínas, estas podem impedir a visualização dos grânulos de amido.

Em sementes secas de *Moringa oleífera*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Bactris gasipaes* foi constatada a ausência de compostos amiláceos no embrião pelos testes histoquímicos, conforme observado por Gallao et al. (2006), Soares et al. (2007) e Nazario et al. (2013), respectivamente.

Segundo Sasaki (2008), os constituintes das sementes são determinados geneticamente, mas a quantidade relativa destes constituintes pode ser influenciada por fatores ambientais, tais como nutrição mineral e clima durante o processo de formação e desenvolvimento da semente. A grande quantidade de lipídios nos cotilédones, associada à presença de proteínas em ambas as estruturas demonstra que estas constituem fontes de reserva nutricionais para o desenvolvimento do processo germinativo e posterior crescimento da plântula de *M. brauna*, junto aos carboidratos solúveis e estruturais não quantificados neste trabalho.

Tabela 1. Resultados histoquímicos em cotilédones e eixos embrionários de sementes secas (testemunha) de *Melanoxylon brauna* (+ presença; - ausência; o número de sinais expressa a intensidade da reação).

Reagente/Teste	Composto químico	Cotilédone	Eixo embrionário
Xilidine Ponceau	Proteínas	++	++
Sudan Black B	Lipídios	++	+
Lugol	Amido	-	-

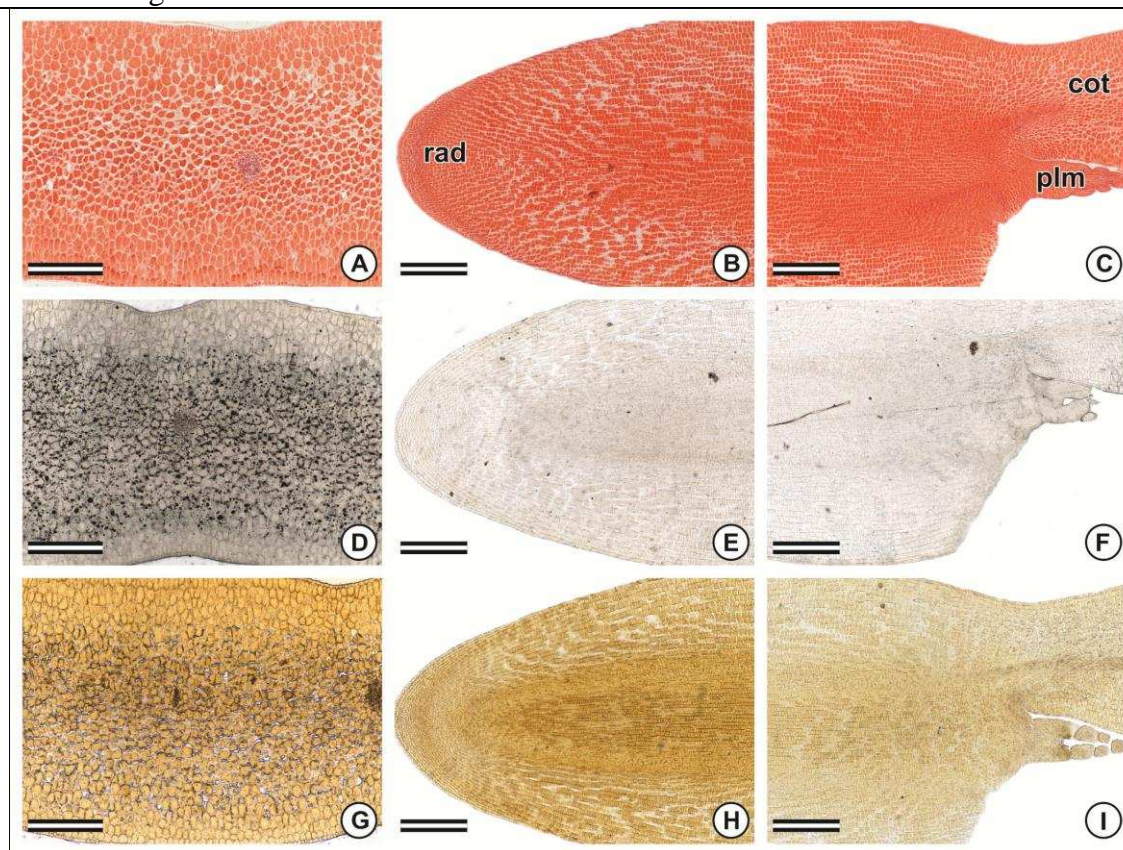


Figura 2. Seções transversais de cotilédones (A, D e G) e longitudinais de eixos embrionários seccionados no ápice (B, E e H) ou na região de interseção do eixo embrionário com o cotilédone (C, F e I) de sementes secas (testemunha) de *Melanoxylon brauna* coradas com os reagentes XP (proteínas), sudan black B (lipídios) e lugol (amido). Barras: A, D e G: 250 μm ; B, C, E, F, H, e I: 400 μm . rad: radícula; cot: cotilédone; plm: plúmula.

Com o teste de XP, foi possível observar a presença de corpúsculos globulares, intensamente corados de vermelho nas sementes das testemunha, tanto nas células de cotilédones (Figura 3A) quanto de eixos embrionários (Figura 3B). Nestas, ainda não é possível visualizar corpos protéicos bem formados, devido ao fato das sementes não terem iniciado o processo de embebição e apresentarem, portanto, alto nível de desidratação das células.

Para as sementes submetidas ao processo de embebição à temperatura de 10 °C, os cotilédones de *M. brauna* apresentaram corpúsculos que reagiram positivamente ao XP com arranjo espacial mais denso que os visualizados na testemunha (Figura 3C), enquanto nos cortes longitudinais dos eixos embrionários o material corado apresenta forma celular mais definida, com células justapostas e coloração forte (Figura 3D). Apesar das células das sementes submetidas a esta temperatura apresentarem-se maiores e com formato dos corpos proteicos mais proeminentes que aquelas observadas na testemunha, é possível supor que as reservas proteicas não foram degradadas durante o processo de embebição, pela observação de coloração ainda intensa, associada ao alto conteúdo citoplasmático.

Assim, à temperatura de 10 °C, as sementes absorvem água, ocorrendo a formação de novas proteínas e síntese de RNA, completando a fase I do processo germinativo, conforme sugerem Marcus e Felley (1964), porém estas proteínas não foram degradadas durante a embebição até 96 horas, provavelmente pela baixa atividade de enzimas associadas à quebra dessas reservas, como as exopeptidases e endopeptidases. Callis (1995) afirma que diversas proteinases acumulam nos tecidos quando estes são expostos a estresses ambientais, como os observados após estresses de seca (Gosti et al., 1995), salino (Koizumi, 1993; Aghaei et al., 2009) e de baixa temperatura (Schaffer e Fischer, 1988).

Nas temperaturas na faixa ótima de germinação para a espécie (25 e 30 °C) verifica-se mudança significativa de coloração das células em relação ao observado nas sementes da testemunha e nas temperaturas de estresse térmico, sendo possível detectar corpos proteicos globulares bem delimitados em todas as regiões dos cotilédones (Figuras 3E e 3G) e dos eixos embrionários (Figuras 3F e 3H). Nestas temperaturas, a coloração também apresenta-se menos intensa e os corpos globulares menores, evidenciando o decréscimo dessa reserva como fonte de energia ou para estrutura física para o processo germinativo.

Como no tempo de embebição de 96 horas já ocorreu a protrusão da raiz primária na temperatura de 30 °C, observa-se redução mais evidente na intensidade da coloração avermelhada das células do eixo embrionário, indicando declínio nas reservas proteicas no período pós-germinativo, onde se inicia o crescimento da plântula. Nestas, o envoltório dos corpos proteicos expandiu-se, formando cavidades internas e o material XP-positivo dentro desses corpúsculos estava restrito a cerca de um terço do seu volume interno (Figura 3H).

Durante a germinação, as proteínas de reservas de sementes são hidrolisadas a seus aminoácidos constituintes, os quais são utilizados para produção de novos aminoácidos ou proteínas ou para fornecer energia e esqueletos carbonados, por meio da via respiratória, após desaminação (Borges e Rena, 1993; Buckeridge et al., 2004). Por ser a única fonte de nitrogênio proveniente das reservas das sementes, as proteínas assumem papel importante no estabelecimento das plântulas (Werker et al., 1997). A mobilização de reservas proteicas durante o processo germinativo de espécies florestais leguminosas da Mata Atlântica também foi observada em *Caesalpinia peltophoroides* (Corte et al., 2008), *Schizolobium parahyba* (Magalhães et al., 2010) e *Dalbergia nigra* (Ataíde et al., 2013).

Nos cotilédones das sementes embebidas por 96 horas na temperatura de 40 °C (Figura 3J), houve um desarranjo no padrão globular em relação ao observado nos corpos proteicos nas temperaturas 10, 25 e 30 °C. Na temperatura supracitada, os corpos proteicos apresentaram-se fragmentados, sem forma e padrão definidos, e com coloração intermediária entre a observada na testemunha e nas temperaturas 25 e 30°C (Figuras 3F e 3H). Assim, a exposição das sementes à alta temperatura possivelmente resultou em desnaturação das proteínas nas células, associando a perda da capacidade germinativa à função degenerativa causada pelo estresse de temperatura.

Durante o processo de deterioração das sementes, ocorre decréscimo no teor e na síntese de proteínas totais e solúveis, associado a um acréscimo no teor de aminoácidos, em consequência à desnaturação provocada por temperaturas altas (Marcos Filho, 2005). Neste contexto, apesar de haver decréscimo no conteúdo total de proteínas, estas possivelmente perdem sua função de reserva e enzimática, tanto as enzimas pré-formadas como aquelas sintetizadas de novo, bloqueando assim o desenvolvimento do processo germinativo.

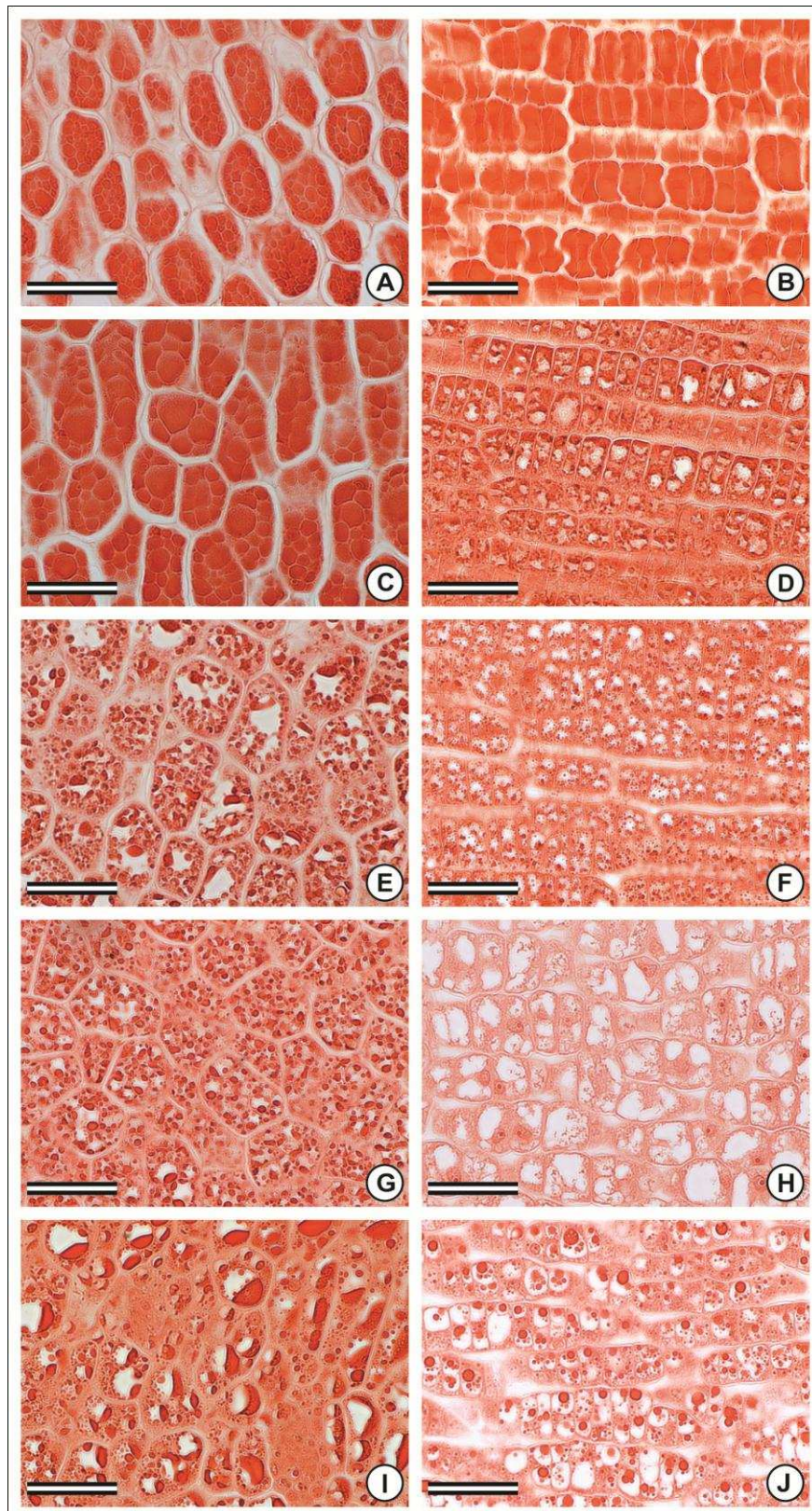


Figura 3. Seções transversais de cotilédones (A, C, E, G, e I) e longitudinais de eixos embrionários (B, D, F, H, e J) de sementes de *Melanoxylon brauna* coradas com XP (proteínas) sem embebição (A e B – testemunha) ou após embebição em diferentes

temperaturas por 96 horas. C e D – 10 °C; E e F – 25 °C; G e H – 30 °C; I e J – 40 °C. Barra: 50 µm.

Nas sementes da testemunha e em todas as temperaturas analisadas, foram observadas diferenças visíveis quanto à quantidade de corpos lipídicos presentes nas seções de eixos embrionários e cotilédones corados com Sudan Black B (Figura 4). O material lipídico foi encontrado principalmente nos cotilédones, formando gotas pequenas e espaçadas no interior das células (Figuras 4A, 4C, 4E, 4G e 4I). Essas gotas foram menores e menos evidentes nas células dos eixos embrionários (Figuras 4B, 4D, 4F, 4H e 4J), destacando o papel do cotilédone como tecido armazenador das reservas lipídicas nas sementes de *M. brauna*.

Tanto nos cotilédones quanto nos eixos embrionários, não foram verificadas diferenças marcantes quanto à presença de corpos oleaginosos entre sementes da testemunha e após embebição nas temperaturas estudadas, indicando que essa reserva se manteve constante, mesmo sob condições de estresse (Figura 4A-J).

Os triacilglicerois são reservas nutricionais de alto valor energético (Beever, 1979), e sua mobilização envolve uma sequência de reações bioquímicas para oxidação dos ácidos graxos constituintes e do glicerol, resultando em sacarose, que será translocada do tecido de reserva da semente para a plântula em formação (Borges e Rena, 1993; Bewley et al., 2013). Assim, a utilização dos lipídios de reserva das sementes tem sido relatada para a germinação e crescimento pós-germinativo das plântulas, como nos trabalhos feitos com *Carthamus tinctorius* (Tonguç et al., 2012) e *Dalbergia nigra* (Ataíde et al., 2013).

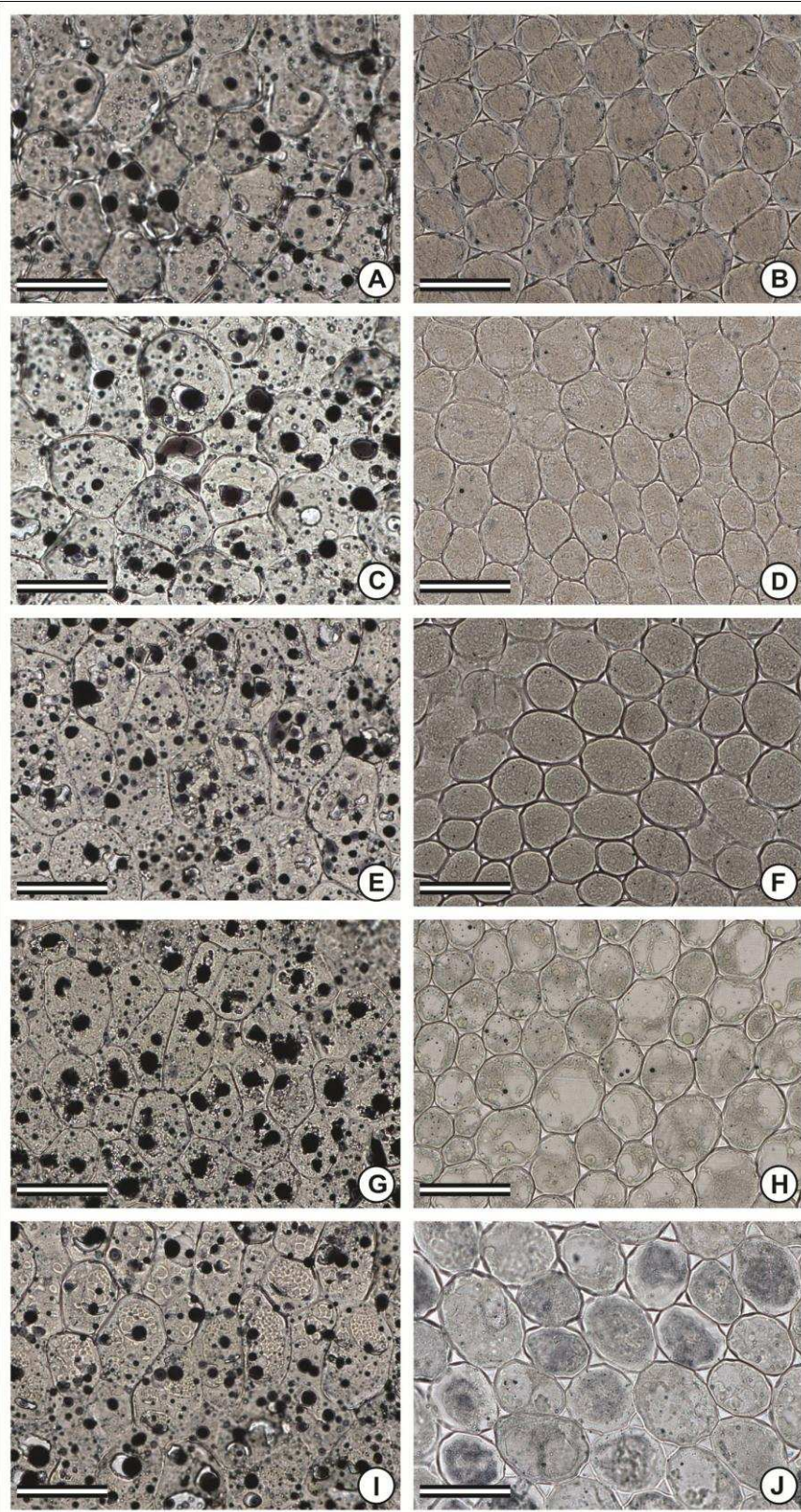


Figura 4. Seções transversais de cotilédones (A, C, E, G, e I) e de eixos embrionários (B, D, F, H, e J) de sementes de *Melanoxylon brauna* coradas com sudan black B (lipídios) após embebição em diferentes temperaturas por 96 horas. A e B – testemunha; C e D – 10°C; E e F – 25°C; G e H – 30°C; I e J – 40°C. Barra: 50 µm.

Com base na observação dos cortes longitudinais de cotilédones e eixos embrionários de sementes de *M. brauna*, não foram detectados histoquimicamente grãos de amido em sementes secas (Figuras 5A e 5D). No entanto, após embebição das sementes por 96 horas à temperatura de 30 °C foi observado aparecimento de grãos de amido pequenos e em grande quantidade em cotilédones e eixos embrionários, concomitantemente à germinação das sementes nesta temperatura (Figuras 5B, 5C, 5E e 5F). Estes grãos estão distribuídos uniformemente nas células do córtex, não sendo observada presença de amido nas células procambiais.

Além da associação entre o reagente lugol e amilose já citada na Figura 1, a formação de amido após a germinação das sementes é característica das sementes não amiláceas (Moura et al., 2010). Esta pode ser considerada como resultado do período pós-germinativo, em que inicia-se a degradação das reservas lipídicas e crescimento da raiz primária, o que contribui para o aumento temporário das reservas de amido, uma vez que a rota bioquímica de degradação dos lipídios, que envolvem a β -oxidação e o ciclo do glioxilato, levam à síntese de sacarose, via gliconeogênese, e esta, quando presente em altas concentrações no citosol, pode ser temporariamente armazenada como amido (Buckeridge et al., 2004a).

Assim, o anabolismo da sacarose a amido em sementes é realizada em dois locais distintos: inicia-se pela conversão da sacarose em glicose-1-fosfato no citoplasma, a qual é transportada para os amiloplastos, e convertida em moléculas de amilose e amilopectina pela atividade das enzimas amido sintase e ADP-glicose pirofosforilase (Buckeridge et al., 2004b). Este processo necessita de ATP como fonte de energia, o qual pode ser gerado pelo NADPH resultante da via das pentoses monofosfatadas, onde elétrons do NADPH podem terminar reduzindo O_2 e gerando ATP (Taiz e Zeiger, 2009), necessário ao processo e produzido em maior quantidade pela atividade superior da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase à temperatura de 30 °C, conforme observado no Capítulo 3.

A formação de grânulos de amido no decorrer do período germinativo foi observada em sementes de *Arabidopsis thaliana* (Mansfield e Briarty, 1996), *Dalbergia miscolobium* (Silva et al., 1998), *Caesalpinioidea peltophoroides* (Corte et al., 2008), *Cnidioscolus phyllacantus* (Pereira et al., 2010) e *Acrocomia aculeata* (Bicalho, 2011).

Possivelmente, o amido transitório acumulado nas sementes durante o período germinativo será degradado pelas enzimas fosforilase e α e β -amilase para produção de glicose como fonte de energia para as diversas reações metabólicas durante o crescimento inicial das plântulas, bem como fonte de glicose para biossíntese de celulose (Silva et al., 1998).

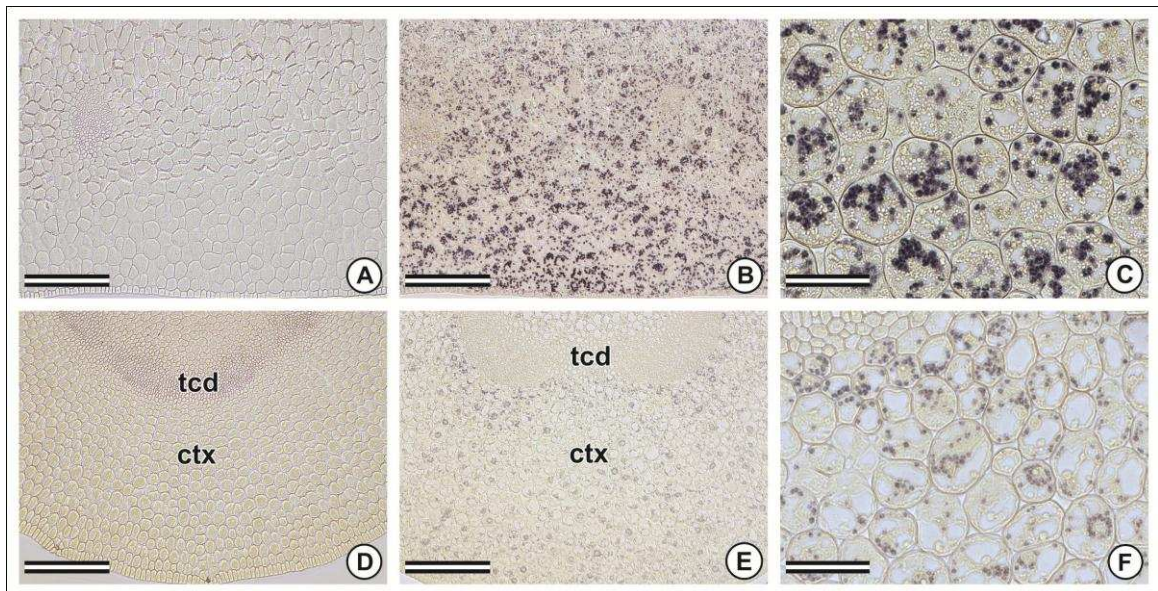


Figura 5. Seções transversais de cotilédones (A, B e C) e de eixos embrionários (D, E e F) de sementes de *Melanoxylon brauna* coradas com lugol (amido) nas sementes da testemunha (A e D) e após embebição por 96 horas à temperatura de 30°C (B, C, E e F). As imagens C e F representam aumento das imagens B e E, respectivamente. Barras: A, B, D e E: 200 μm; C e F: 50 μm. tcd: células procambiais; ctx: córtex.

A coloração das seções longitudinais e transversais de cotilédones e eixo embrionário de *M. brauna* com azul de toluidina representou as transformações morfoanatômicas que esses tecidos sofreram durante as 96 horas do período germinativo nas temperaturas analisadas (Figura 6). Nas sementes secas, observa-se, nas duas seções do eixo embrionário, células justapostas, com conteúdo citoplasmático denso e não vacuoladas, possivelmente devido à desidratação dos tecidos (Figuras 6B e 6C). Estas apresentaram formatos diversos, variando desde elíptico a arredondado nos cotilédones e com formato quadrangular nos eixos embrionários (Figuras 6A, 6B e 6C). As paredes celulares apresentaram-se delgadas, conforme descrito por Dickison (2000) e também observado em sementes maduras de *Moringa oleifera* (Gallão et al., 2006) e *Sorghum bicolor* (Oliveira et al., 2011).

Após embebição das sementes à temperatura de 10 °C, devido ao aumento no conteúdo de água, houve aumento no volume celular das células dos cotilédones (Figura 6D). Algumas células dos eixos embrionários apresentaram ocorrência de divisões celulares, resultando em núcleo esférico e nucléolo evidente, estando estas em maior quantidade na região do ápice radicular (Figura 6E).

Segundo Werker (1997), a absorção de água pelas sementes durante a germinação resulta em uma sequência de ativação no desenvolvimento de células, a qual começa ao longo e através do embrião. Dessa forma, aumento pronunciado nas células do embrião foi observado após início da embebição de sementes de *Euterpe precatória* (Aguiar e Mendonça, 2002), *Caesalpinioidea peltophoroides* (Corte et al., 2008) e *Acrocomia aculeata* (Bicalho, 2011).

À temperatura de 25 °C, semelhante ao observado para as sementes embebidas a 10 °C, as células cotiledonares apresentaram-se em tamanhos maiores que aquelas observadas nas sementes secas e com formatos variados, tendendo ao formato oblíquo (Figura 6G). As células dos eixos embrionários exibiam células de tamanho reduzido e citoplasma denso (Figuras 6H e 6I), com presença de núcleos, sendo estes densos e com poucos vacúolos, indicando que as células apresentavam intensa atividade celular, o que pode ser relacionado ao fato do tempo de embebição analisado (96 horas) estar próximo à protrusão radicular nesta temperatura, que ocorre em aproximadamente 120 horas.

Na temperatura de 30 °C, por outro lado, na qual as sementes já tinham germinado com 96 horas de embebição (Figuras 5J, 5K e 5L), foram observadas células dos eixos embrionários com núcleo menos denso, apesar de algumas ainda se

apresentarem em divisão. Nestas, foi constatada formação de vacúolo e presença de quatro feixes vasculares, as quais são características de células em alongamento. Neste contexto, pode-se supor que à temperatura de 30 °C as células da região de alongamento estão cessando o processo de divisão, finalizado com a protrusão da raiz primária, e iniciando o processo de diferenciação celular da raiz da plântula em desenvolvimento, enquanto as células da região do meristema radicular continuam em atividade, com divisão celular. Anatomicamente, o início da germinação das sementes de *Oenocarpus minor* foi observado pelo alongamento e diferenciação das células parenquimáticas do embrião na região proximal ao cotilédone, resultando em uma expansão na zona periférica, de forma cilíndrica (Oliveira et al., 2010).

Em todas as temperaturas analisadas, ocorreu maior proporção de células com presença de núcleos na região do ápice dos eixos embrionários, quando comparado à região do córtex, que se localiza na região de transição entre o ápice e a plúmula. Assim, durante a germinação, nesta região de transição a característica principal das células é o alongamento, enquanto na região apical dos eixos embrionários, as células apresentam divisão celular. Nos cotilédones, de forma geral, não foi observada presença de células em divisão.

Bewley et al. (2013) afirmam que a germinação das sementes ocorre devido ao alongamento celular na faixa de transição entre a radícula e o hipocótilo, de forma que a protrusão da radícula ocorre após esta ser empurrada pela expansão das células alongadas. Estas constatações foram confirmadas em estudos com citometria de fluxo e microscopia confocal em sementes de *Brassica oleracea* (Barroco et al., 2005), *Arabidopsis thaliana* (Sliwinska et al., 2009) e *Medicago trunculata* (Gimeno-Gilles et al., 2009). Após a embebição, as alterações causadas pela expansão celular ajustam a extensibilidade das suas paredes celulares, por remodelarem os principais constituintes destas, como as microfibrilas de celulose e a matriz de pectina /hemicelulose (Weitbrecht et al., 2011).

A coloração das sementes com azul toluidina no tratamento após 96 horas de embebição a 40 °C revelou células cotiledonares isodiamétricas e de menores dimensões que nas demais temperaturas (Figura 6M), associadas a células dos eixos embrionários também menores, diferenciadas e com presença de divisão celular, porém em menor quantidade que observado a 25 °C (Figuras 6N e 6O). Em maiores temperaturas, ocorre maior absorção de água pelas sementes e, conseqüentemente maior

acúmulo de massa fresca, o que justifica o maior volume celular observado nas células desta temperatura.

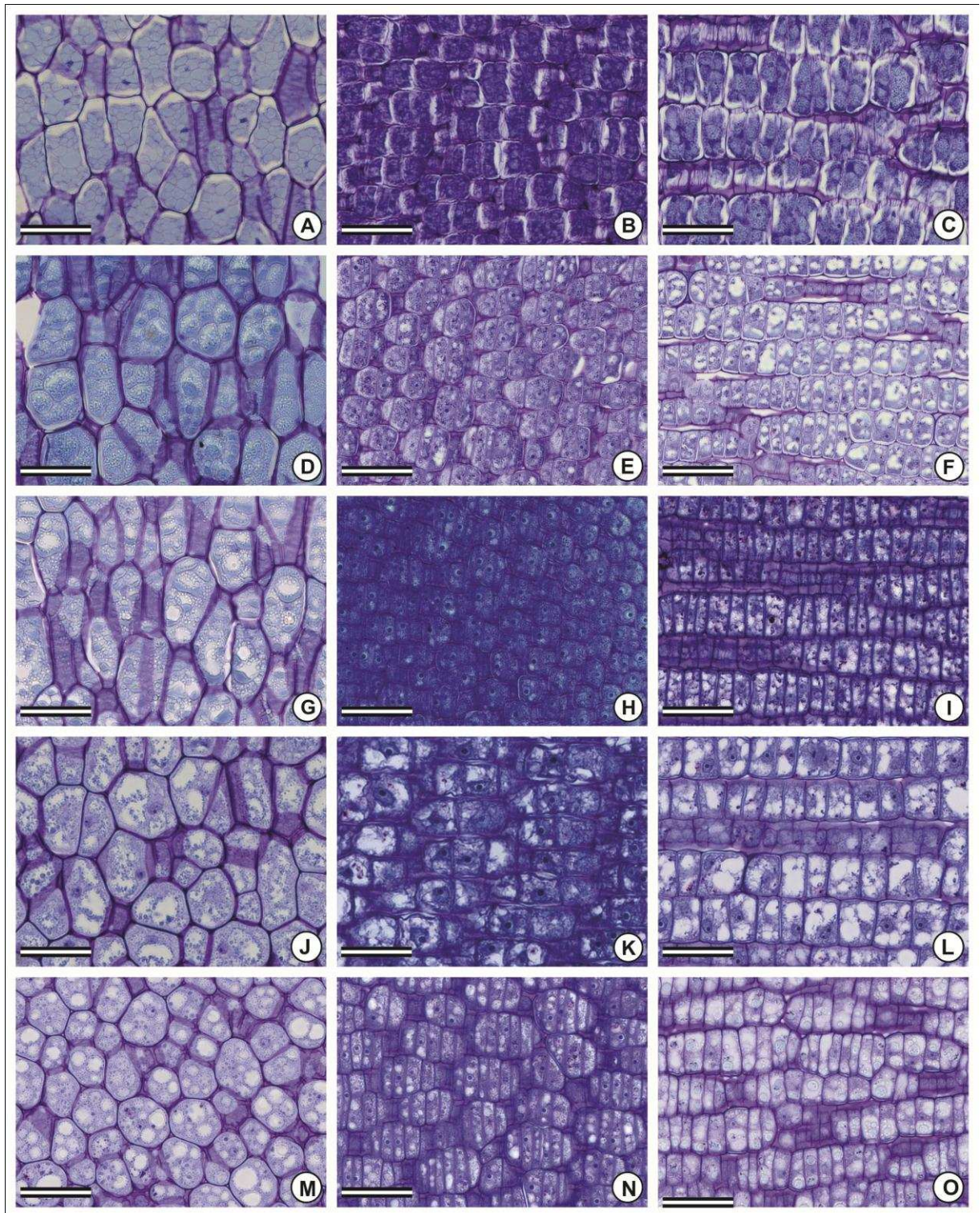


Figura 5. Seções longitudinais de cotilédones (A, D, G, J e M) e de eixos embrionários seccionados no ápice (B, E, H, K, e N) ou no córtex (C, F, I, L e O) de sementes de *Melanoxylon brauna* coradas com azul de toluidina após embebição em diferentes temperaturas por 96 horas. A, B e C – testemunha; D, E e F – 10 °C; G, H e I – 25 °C; J, K e L – 30 °C; M, N e O – 40 °C. Barra: 50 µm.

CONCLUSÕES

As proteínas são degradadas durante a germinação, com hidrólise mais significativa às temperaturas de 25 e 30 °C e ocorrendo deformação em sua estrutura à temperatura de 40 °C.

As reservas lipídicas mantiveram-se constantes no período estudado. Em consequência, foi observada formação de grão de amido nas sementes após protrusão da raiz primária na temperatura de 30 °C.

A análise estrutural comprova a presença de células vacuoladas, alongadas, justapostas e com intensa atividade celular após início da embebição das sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAEI, K.; EHSANPOUR, A.A.; SHAH, A.H.; KOMATSU, S. Proteasome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. **Amino Acids**, v. 36, p. 91-98, 2009.
- AGUIAR, M.O.; MENDONÇA, M.S. Aspectos morfo-anatômicos do embrião de *Euterpe precatoria* Mart. durante o processo germinativo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, p. 241-249, 2002.
- ALBRECHTOVÁ, J. **Plant Anatomy in Environmental Physiology**. Habilitation (Assoc. Prof.) Thesis, Faculty of Science, Charles University in Prague, 38 p.
- AMARAL, L.I.V.; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2007.
- ATAÍDE, G.M.; BORGES, E.E.L.; GONÇALVES, J.F.C.; GUIMARÃES, 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, n.1, p.56-63, 2013.
- BARROCO, R.M.; POUCKE, K.V.; BERGERVOET, J.H.W; VEYLDER, L.; GROOT, S.P.C; INZE, D.; ENGLER, G. The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. **Plant Physiology**, v.137, p. 127-140, 2005.
- BEEVERS, H. Microbodies in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.30, p.159–193, 1979.
- BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Nova York: Springer, 2013. 392 p.
- BICALHO, E.M. **Germinação e mobilização de reservas de sementes de macaúba** (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia). 2011. 71 p.
- BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 83-136.
- BORTOLOTTO, R.P.; MENEZES, N.L.; GARCIA, D.C.; MATTIONI, N.M. Teor de proteína e qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Bragantia**, v.67, n.2, p. 513-520, 2008.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; AIDAR, M. P. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 163-185, 2004a.

BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 31-50, 2004b.

BUSSOTTI, F.; GRAVANO, E.; GROSSONI, P.; TANI, C. Occurrence of tannins in leaves of beech trees (*Fagus sylvatica*) along an ecological gradient, detected by histochemical and ultrastructural analyses. **New Phytologist**, v.138, p. 469-479, 1998.

CALLIS, J. Regulation of Protein Degradation. **The Plant Cell**, v. 7, p. 845-857, 1995.

CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Técnica de inclusão de material vegetal em historresina. In: Encontro Regional de Anatomistas do Estado de São Paulo, 1, 1995, Rio Claro. **Apostila**. Rio Claro: UNESP, 1995. 7p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3 ed. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 424p.

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

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; VENTRELLA, M.C.; LEITE, I.T.A.; BRAGA, A.J.T. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. **Revista Árvore**, v. 32, n. 4, p. 641-650, 2008.

CRESTANA, C.M. & BELTRATI, C.M. Morfologia e anatomia de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (LeguminosaeCaesalpinioideae). **Naturalia**, v.13, p.45-54, 1988.

DICKISON, W.C. **Integrative plant anatomy**. Hartcourt: Academy Press, 2000. 533p.

Dixon, R.A.; Paiva, N.L. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.

FERMINO JUNIOR, P.C.P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Germinação e propagação in vitro de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.

FEUSSNER, I.; WASTERACK, C.; KINDL, H.;KÜHN, H. Lipoyxygenase-catalysed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. **Plant Biology**, v.2, p.11849-11853, 1995.

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, 2011.

GALLAO, M.I.; DAMASCENO, L.F.; BRITO, E.S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, n.1, p.106-109, 2006.

GIMENO-GILLES, C.; LELIÈVRE, E.; VIAU, L.; MALIK-GHULAM, M.; RICOULT, C.; NIEBEL, A.; LEDUC, N.; LIMAMI, A.M. ABA-mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: modifying enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. **Molecular Plant**, v. 2, p. 108-119, 2009.

GUNN, C. R. **Fruits and seeds of genera in the subfamily Caesalpinioideae (Fabaceae).** United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Port Royal Road, Springfield, 408pp. (Technical Bulletin Number 1755). 1991.

HENDERSON, J.H.M.; NITSCH, J.P. Effect of certain phenolic acids on the elongation of *Avena* first internodes in the presence of auxin and tryptophan. **Nature**, v. 195, n. 4843, p. 780-782, 1962.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein Storage Bodies and Vacuoles. **The Plant Cell**, v. 11, p. 601-613, 1999.

HULLER, A.; SCHOCK, A.A. Avaliação do potencial alelopático de três espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) sobre o processo germinativo de *Lactuca sativa* L. **Revista de Ciências Ambientais**, v.5, n.1, p. 25-37, 2011.

ISFAHAN, M.N.; SHARIATI, M. The effect of some allelochemicals on seed germination of *Coronilla varia* L. seeds. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 2, n. 5, p. 534-538, 2007.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique.** New York: McGraw Hill Book Company, 1940. 523p.

KOIZUMI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; TSUJI, H.; SHINOZAKI, K. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, v. 129, n. 2, p. 175-182, 1993.

LANDIM, L.P.; COSTA, J.G.M. *Dimorphandra gardneriana* Tulasne (Fava d'anta) - Uma abordagem etnobotânica e riscos de extinção. **Revista da Biologia**, v. 9, n. 1, p. 6-11, 2012.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in Research**, v. 661, p. 23-67, 2006.

LIMA, L.C.P.; GARCIA, F.C.P.; SARTORI, A.L.B. Leguminosae nas florestas estacionais do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: ervas, arbustos, subarbustos, lianas e trepadeiras. **Rodriguésia**, v. 58, n. 2, p. 331-358, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Ed. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2009. 368 p.

MACIEL, A.S.; BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G. Determinação da presença de fenóis em sementes de espécies florestais e sua relação com inibidores de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 1, p. 1-4, 1992.

MAGALHÃES, S.R.; BORGES, E.E.L.; BERGER, A.P. Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake durante a germinação. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 4, p. 589-595, 2010.

MANSFIELD, S.G.; BRIARTY, L.G. The dynamics of seedling and cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve mobilization. **International Journal of Plant Science**, v.157, n.3, p.280-295, 1996.

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

MARCUS, A.; FEELEY, J. Activation of protein synthesis in the imbibition phase of seed germination. **Biochemistry**, v. 51, p. 1075-1079, 1964.

MELOTTO, A.; NICODEMO, M.L.; BOCCHESI, R.A.; LAURA, V.A.; GONTIJO NETO, M.G.; SCHLEDER, D.D.; POTT, A.; SILVA, V.P. Sobrevivência e crescimento inicial em campo de espécies florestais nativas do Brasil central indicadas para sistemas silvipastoris. **Revista Árvore**, v. 33, n. 3, p. 425-432, 2009.

MMA – Instrução Normativa nº 6 de 23 de setembro de 2008. Ministério do Meio Ambiente. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção** – acesso em 1/05/2013. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/arquivos/83_19092008034949.pdf>

MOREIRA-CONEGLIAN, I.R.; OLIVEIRA, D.M.T. Anatomia comparada dos limbos cotiledonares e eofilares de dez espécies de Caesalpinioideae (Fabaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 193-207, 2006.

MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v. 67, n. 4, p. 399-407, 2010.

MYERS, A.M.; MORELL, M.K.; JAMES, M.G.; BALL, S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, v. 122, p. 989-997, 2000.

NAZARIO, P.; FERREIRA, S.A.N.; BORGES, E.E.L.; MARCOMINI, P.R.G.; MENDONÇA, M.S. Anatomical and histochemical aspects of the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) seed. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, p. 171-178, 2013.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 367-373, 1964.

OLIVEIRA, A.B.; ALENCAR, N.L.M.; GALLÃO, M.I.; GOMES FILHO, E. Avaliação citotóxica durante a germinação de sementes de sorgo envelhecidas artificialmente e osmocondicionadas, sob salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 223-231, 2011.

OLIVEIRA, A.B.; CASSINO, M.F.; GURGEL, E.S.C.; SOUZA, M.A.D.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M.; MEIRA, R.M.S.A.; MENDONÇA, M.S. Morfoanatomia e histoquímica da semente de sororoca (*Phenakospermum guyanense* (Rich.) Endl. - Strelitziaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2 p. 280-287, 2012.

OLIVEIRA, A.B.; MENDONÇA, M.S.; ARAÚJO, M.G.P. Aspectos anatômicos do embrião e desenvolvimento inicial de *Oenocarpus minor* Mart.: uma palmeira da Amazônia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 20-24, 2010.

OLIVEIRA, D.M.T. Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 3, p. 1999.

PEREIRA, G.M.; FERREIRA, M.C.; FREIRE, D.L.; CUNHA, J.R.C.; MELO, Y.L.; LICHSTON, J.E.; VOIGT, E.L. Aspectos histoquímicos da mobilização de reservas em sementes de faveleira (*Cnidocolus phyllacantus* Pax & Hoffman). In: Congresso Brasileiro de Mamona, 4 & Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, 1, 2010, João Pessoa. Inclusão Social e Energia: **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 1957-1961.

RIVERO, R.M.; RUIZ, J.M.; GARCIA, P.C.; LOPEZ-LEFEBRE, L.R.; SANCHEZ, E.; ROMERO, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, v. 160, p. 315-321, 2001.

SASAKI, M. **Lipídios, carboidratos e proteínas de sementes de leguminosas do cerrado**. Dissertação (Mestrado: Ciências – Botânicas, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – USP), São Paulo, SP. 75p. 2008.

SANTOS, A.P.S.A.; SILVA, B.T.F.; RIBEIRO, D.L.; BARROQUEIRO, E.S.B.; CARTAGENES, E.S.B.; NUNES, S.; SILVA, S.N.; NUNES, S.P.H. **Bioquímica**

- prática - protocolos para análise de biomoléculas e exercícios complementares.** Maranhão: UFMA, 93 p. 2013.
- SCHAFFER, M.A.; FISCHER, R.L. Analysis of mRNAs that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. **Plant Physiology**, v. 87, p. 431-436, 1988.
- SHEWRY, P.R.; HALFORD, N.G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue, p. 947-958, 2002.
- SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 945-956, 1995.
- SILVA, M.S.; LEITE, K.R.B.; SABA, M.D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpinioideae-Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 673-679, 2012b.
- SILVA, T.R.G.; CORTELAZZO, A.L.; DIETRICH, S.M.C. Variations in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. **Revista Bras. Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p.119-124, 1998.
- SILVA, T.R.G.; CORTELAZZO, A.L.; DIETRICH, S.M.C. Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**. Vol.49, n.3, pag. 219-222, 1997.
- SILVEIRA, F.S.; MIOTTO, S.T.S.. A família Fabaceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil: aspectos taxonômicos e ecológicos. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 11, p. 93-114, 2013.
- SLIWINSKA, E.; BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D. Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 12, p. 3587-3594, 2009.
- SOARES, D.A.; NORMANDO, L.R.O.; GALLÃO, M.I. Mobilização de reservas em sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong durante a germinação. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu: Sociedade de Ecologia do Brasil, p. 1-2, 2007.
- SOROKIN, H.P. The spherosomes and the reserve fat in plant cells. **American Journal of Botany**, v.54, n.8, p.1008-1016, 1967.

TOKUHISA, D.; DIAS, D.C.F.S.; ALVARENGA, E.M.; HILST, P.C.; DEMUNER, A.J. Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 180-188, 2007.

TONGUÇ, M.; ELKOYUNU, R.; ERBAŞ, S.; KARAKURT, Y. Changes in seed reserve composition during germination and initial seedling development of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Turkish Journal of Biology**, v. 36, p. 107-112, 2012.

VENTRELLA, M.C.; ALMEIDA, A.L.; NERY, L.A.; COELHO, V.P.M. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**. Viçosa: Editora UFV, 2013. 40 p.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine-Ponceau 2R. **Annales d'Histochimie**, v. 15, p. 289-296, 1970.

WEITBRECHT, K.; MULLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3289-3309, 2011.

WERKER, E. **Seed anatomy**. Berlin, Stuttgart: Gebruder Borntraeger, 1997. 424 p.

WRÓBEL, M.; KARAMAC, M.; AMAROWICZ, R.; FRACZEK, E.; WEIDNER, S. Metabolism of phenolic compounds in *Vitis riparia* seeds during stratification and during germination under optimal and low temperature stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 3^a, p. 313-320, 2005.

ZENK, M.H.; MULLER, G. In vivo destruction of exogenously applied indolyl-3-acetic acid as influenced by naturally occurring phenolic acids. **Nature**, v. 200, n. 4908, p. 761-763, 1963.

CONCLUSÕES GERAIS

O teste de condutividade elétrica em sementes de *Melanoxylon brauna* é eficiente para determinar diferenças na qualidade fisiológica entre lotes, sendo indicada a utilização de 50 sementes por 48 horas em 48 mL de água na condução do teste.

A faixa ótima de temperatura para germinação das sementes de *M. brauna* está entre 25 e 30 °C, porém a embebição das sementes a 10 e 40 °C por curtos períodos de tempo com posterior retorno à 25 °C resulta em acréscimos na germinação em relação à manutenção das sementes nas temperaturas constantes 10 e 40 °C.

As taxas de absorção de água, massa fresca, comprimento, largura e espessura das sementes aumentam à medida em que se aumenta a temperatura.

As reservas de carboidratos solúveis e proteínas são as apresentam maior decréscimo durante o período germinativo, em todas as temperaturas.

Nas temperaturas 25 e 30 °C, a atividade das enzimas α -amilase, β -amilase e glicose-6-fosfato desidrogenase aumenta com a embebição das sementes, gerando substrato para a respiração e formação de estruturas de carbono para o crescimento. Às temperaturas 10 e 40 °C, a atividade das enzimas α -amilase, β -amilase e glicose-6-fosfato desidrogenase é reduzida, prejudicando o desenvolvimento adequado do processo germinativo.

A germinação das sementes à temperatura de 40 °C resulta em deformação nas estrutura das proteínas, que apresentam aspecto de desnaturação. As reservas lipídicas permanecem constantes no período estudado até as 96 horas após início da embebição em todas as temperaturas estudadas, sendo responsáveis pela manutenção da plântula após o início do crescimento. Em consequência, foi observada formação de grão de amido nas sementes após protrusão da raiz primária na temperatura de 30 °C, resultados coerentes com as informações levantadas quanto à atividade enzimática e de germinação das sementes nesta temperatura.