

GLAUCIANA DA MATA ATAÍDE

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DURANTE A
HIDRATAÇÃO DE SEMENTES DE *Dalbergia nigra* ((VELL.) FR. ALL.
EX BENTH.)

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

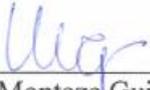
VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

GLAUCIANA DA MATA ATAÍDE

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DURANTE A
HIDRATAÇÃO DE SEMENTES DE *Dalbergia nigra* ((VELL.) FR.
ALL. EX BENTH.)**

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

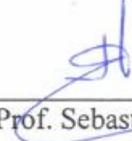
APROVADA: 26 de julho de 2011.



Prof.^a Valéria Monteze Guimarães
(Co-orientadora)



Prof. José Francisco de Carvalho Gonçalves
(Co-orientador).



Prof. Sebastião Tavares de Rezende



Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges
(Orientador)

*"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original."
(Albert Einstein)*

Aos meus anjos aqui na Terra, que, mesmo cuidando de suas próprias vidas, de suas próprias dificuldades, de seus outros filhos, de parentes e amigos, conseguiram lutar comigo até o fim para a concretização deste trabalho.

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

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, Ivone e João, por serem meus exemplos, por todo o amor e carinho com que me conduziram na vida, e pela força e apoio 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.

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

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Engenharia Florestal pela oportunidade de realizar o curso; 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, contribuindo de maneira ímpar para minha formação e amadurecimento profissional.

À Prof^a Valéria Monteze Guimarães por toda a ajuda e pela oportunidade de me deixar compartilhar de seus conhecimentos.

Ao Prof. José Francisco de Carvalho Gonçalves pelas ótimas sugestões e pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Sebastião Tavares de Rezende pelas valiosas contribuições.

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

À amiga Andressa Vasconcelos Flores por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho, pelos conselhos e pela convivência, tanto dentro quanto fora do ambiente de trabalho, ajudando sempre em todos os momentos.

À amiga Elisa Monteze Bicalho, pela ajuda essencial na realização dos experimentos e pela companhia no laboratório, e por todas as discussões e ideias acerca da fisiologia e bioquímica de sementes.

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.

Aos laboratoristas Mauro e Leacir pelo auxílio durante o desenvolvimento dos trabalhos, e ao Chico, Márcio, Machado, Pedro e todos os funcionários da silvicultura pela ótima convivência e apoio logístico durante a realização deste trabalho.

Aos estagiários do LASF pelo apoio: Rafael, Dani, Thaís e Yathaanderson.

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

Aos queridos amigos, “pedras preciosas” que vieram de Diamantina para 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, Aninha, Cândida, Tati, Anna, Érica e Kate 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: Ritinha, Ana, Aninha, Carol, Mili, Thays, Polly, Lina, Luciana, Lívinha, Graciele, Luiz Eduardo e Cíntia.

Aos meus irmãos escoteiros, por me fazerem acreditar em um mundo melhor, e em pessoas melhores para este mundo: Matheus, Tadeu, Fabi, Carine, Dany, Lívia, Léo, Cândido e Fabrício.

Ao Helton pelo amor e companheirismo em todas as etapas da realização deste trabalho.

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, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, em julho de 2011, com defesa da dissertação.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO I - Alterações fisiológicas durante a hidratação de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> ((Vell.) Fr. All. Ex Benth.)	8
Resumo	8
Abstract.....	9
Introdução	10
Material e Métodos.....	12
Resultados e Discussão	14
Conclusões	25
Referências Bibliográficas.....	26
CAPÍTULO II – Alteração nas reservas de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> ((Vell.) Fr. All. Ex Benth.) durante a hidratação	35
Resumo	35
Abstract	36
Introdução	37
Material e Métodos.....	39
Resultados e Discussão	42
Conclusões	51
Referências Bibliográficas.....	52
CAPÍTULO III - Atividades de α-galactosidase, β-mananase e poligalacturonase durante a hidratação de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> ((Vell.) Fr. All. Ex Benth.)..	60
Resumo	60
Abstract.....	61
Introdução	62
Material e Métodos.....	64
Resultados e Discussão	68
Conclusões	76
Referências Bibliográficas	77
CONCLUSÕES GERAIS	83

RESUMO

ATAÍDE, Glauciana da Mata, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a hidratação de sementes de *Dalbergia nigra* ((Vell.) Fr. All. Ex Benth.** Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Coorientadores: Valéria Monteze Guimarães e José Francisco de Carvalho Gonçalves.

A produção e utilização de sementes de alta qualidade são fatores de grande importância para o sucesso na produção de mudas e implantação de povoamentos florestais com espécies nativas. A hidratação das sementes em água é uma técnica utilizada como forma de melhorar a germinação e o vigor, por meio da embebição das sementes sob condições controladas, para iniciar os primeiros eventos da germinação, sem entretanto, atingir a fase III da germinação e ocorrer a emergência da radícula. Dentre as alterações decorrentes desta hidratação, têm sido relacionadas os vários processos fisiológicos e bioquímicos associados à preparação do metabolismo, tais como: estruturação do sistema de membranas, início da atividade respiratória, aumento da produção de ATP e da atividade enzimática e síntese de proteínas. Considerando-se que a água é fator essencial para a reativação do metabolismo das sementes, o objetivo deste trabalho foi investigar alterações fisiológicas e bioquímicas decorrentes da hidratação de sementes da espécie jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*). Para tanto, os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa - UFV. Foram utilizadas neste trabalho sementes de *Dalbergia nigra* colhidas em matrizes de duas procedências, as quais constituíram os lotes I e II. Em seguida, sementes pertencentes aos dois lotes foram colocadas para hidratar em água em dessecadores com umidades relativas de 95-99%, nas temperaturas de 15 e 25°C, até atingirem aproximadamente quatro níveis de hidratação: 10, 15, 20 e 25% de umidade nas sementes. No primeiro capítulo, os lotes I e II foram inicialmente caracterizados quanto aos dados biométricos (comprimento, largura, espessura), massa de mil sementes, porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e condutividade elétrica. Em seguida, foram avaliadas as alterações fisiológicas nas sementes dos dois lotes após chegaram aos níveis de hidratação desejados, sendo analisadas a curva de embebição das sementes, germinação, IVG e condutividade elétrica. No segundo capítulo foi estudada a mobilização de substâncias de reserva nos cotilédones de sementes de *D. nigra* durante a hidratação, por meio da quantificação das concentrações

de lipídios, açúcares solúveis, amido e proteínas solúveis nas sementes dos lotes I e II após os tratamentos de hidratação nas temperaturas de 15 e 25°C. O terceiro capítulo abordou as variações nas reservas de monossacarídeos nos cotilédones e as atividades das enzimas α -galactosidase, β -mananase e poligalacturonase em cotilédones e embriões durante a hidratação nas sementes dos dois lotes de *Dalbergia nigra*. Sementes pertencentes ao lote I possuíam qualidade fisiológica superior ao lote II, por apresentarem maiores médias de germinação e índice de velocidade de germinação e menor quantidade de lixiviados no teste de condutividade elétrica. Não foram observadas diferenças significativas entre as temperaturas de hidratação 15 e 25°C para os testes analisados neste trabalho. A hidratação lenta em água favoreceu a germinação e o vigor das sementes de *D. nigra* dos dois lotes, porém efeitos mais expressivos foram observados no lote II. A manutenção das sementes em hidratação até 15% de umidade foi a mais indicada para incremento na qualidade das sementes dos lotes de diferentes qualidades fisiológicas. A mobilização de reservas durante a hidratação lenta em água foi similar entre os dois lotes avaliados, com pequena variação nos teores de lipídios, enquanto os conteúdos de carboidratos solúveis e amido apresentaram decréscimo a partir do nível de hidratação de 15% e proteínas solúveis exibiram tendência gradativa de queda, desde a testemunha (sementes secas) até o nível de 25% de umidade. Nos dois lotes avaliados, as concentrações de ramnose e xilose apresentaram valores altos na testemunha e redução durante a hidratação até 15% de umidade, momento a partir do qual aumentaram novamente. Foram observadas diferenças entre as concentrações de glicose entre os dois lotes, de forma que o lote I, de qualidade superior, possui maior síntese e degradação desse açúcar durante a hidratação das sementes. A enzima α -galactosidase mostrou ser pré-formada e possuiu maior atividade inicialmente no embrião, gerando substrato para a respiração e formação de estruturas de carbono para o crescimento. As atividades das enzimas β -mananase e poligalacturonase aumentam com a embebição das sementes e foram diferentes entre cotilédone e embrião, alcançando maiores valores nos cotilédones que no eixo embrionário.

ABSTRACT

ATAÍDE, Glauciana da Mata, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Physiological and biochemical changes during hydration of *Dalbergia nigra* ((Vell.) Fr. All. Ex Benth.) seeds.** Adviser: Eduardo Euclides de Lima e Borges. } Coadvisers: Valéria Monteze Guimarães and José Francisco de Carvalho Gonçalves.

The production and use of seeds with high quality are basic factors for successful seedling production and establishment of forests with native species. The hydration of the seeds in water is a methodology used to improve germination and vigor, by soaking the seeds in water under controlled conditions, to initiate the first events of germination, however, without reach the stage III of germination and occur radicle emergence. Among the changes resulting from this hydration, have been linked to various physiological and biochemical processes associated with the preparation of metabolism, such as the system of membranes, onset of respiratory activity, increased production of ATP and enzyme activity and protein synthesis. Considering that water is an essential factor for the reactivation of metabolism of seeds, the objective of this study was to investigate the physiological and biochemical alterations resulting from the hydration of jacaranda-da-bahia (*Dalbergia nigra*) seeds. To this end, experiments were conducted at the Seed Analysis Laboratory of Department of Forest Engineering, Federal University of Viçosa - UFV. In this work were used seeds collected in arrays of two different origins of *Dalbergia nigra*, which were the lots I and II. Then, seeds belonging to the two lots were placed in water to hydrate in desiccators with relative humidities of 95-99% at temperatures of 15 and 25 °C, to achieve approximately four hydration levels: 10, 15, 20 and 25%. In the first chapter, lots I and II were initially characterized as biometric data (length, width, thickness), weight of thousand seeds, germination percentage, germination speed index (IVG) and electrical conductivity. Next, were assessed the physiological changes in seeds of both lots after reaching the desired moisture levels, and analyzed the curve of seed imbibition, germination, IVG and electrical conductivity. In the second chapter were studied the mobilization of reserve substances in the cotyledons of jacaranda-da-bahia seeds during hydration, by quantifying the levels of lipids, soluble sugars, starch and soluble proteins in the seeds of lots I and II after treatment hydration at temperatures of 15 and 25°C. The third chapter dealt with the changes in reserves of monosaccharides in the cotyledons and the activities of the enzymes α -galactosidase, β -mannanase and polygalacturonase in cotyledons and embryos during hydration of the two lots seeds. Seeds belonging to the

lot I had superior physiological quality than the lot II, they have higher average of germination and germination rate and lower leachates in the electrical conductivity test. There were no significant differences between the temperatures of hydration 15 and 25°C for the tests in this paper. The slow hydration in water favored the germination and seed vigor of two lots of jacaranda-da-bahia, but more significant effects were observed in lot II. The maintenance of seed hydration up to 15% moisture was the most suitable for increasing the quality of seeds in lots of different physiological qualities. The mobilization of reserves during the slow hydration in water was similar between the two lots evaluated, with little variation in levels of lipids, while the content of soluble carbohydrates and starch showed a decrease from the level of hydration of 15%, and soluble proteins showed a gradual tendency of fall from the control (dry seeds) to the level of 25% humidity. In two lots, the levels of rhamnase and xylose showed high values in the control and reduction during hydration up to 15% humidity, at which time increased again. Differences were observed between the glucose content between the lots, lot I, with superior quality, showed higher synthesis and degradation of sugar during the hydration of seeds. The enzyme α -galactosidase is preformed initially and has greater activity in the embryo, generating substrate for respiration and formation of carbon structures for growth. The activities of enzymes β -mannanase and polygalacturonase increased with seed imbibition and are different between cotyledons and embryos, reaching higher values in the cotyledons than in embryonic axis.

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de sementes florestais de alta qualidade é o primeiro passo na propagação das espécies nativas, a serem utilizadas para os diversos fins. Desta forma, estudos fisiológicos das sementes são fundamentais para o entendimento do processo germinativo, que possui grande importância em programas de produção de mudas, para reposição florestal, reflorestamento, recuperação de áreas degradadas, arborização urbana, dentre outras atividades.

A qualidade fisiológica das sementes está intimamente associada à água presente em suas células, sendo o fator que mais influencia no processo de germinação (Carvalho e Nakagawa, 2000). 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). Devido à diversidade das relações água/sementes, que influenciam vários aspectos do seu desempenho, torna-se necessária a condução de pesquisas básicas e aplicadas para a elucidação dos fenômenos, processos ou procedimentos tecnológicos associados (Marcos Filho, 2005).

A hidratação controlada das sementes até níveis pré-determinados de umidade permite que alguns eventos metabólicos iniciais do processo germinativo aconteçam, sem que a germinação seja completada e ocorra a protrusão da radícula (Ashraf e Poolad, 2005). Dessa forma, é possível que mecanismos moleculares de proteção ao sistema de membranas possam ser ativados durante tais tratamentos de pré-hidratação, limitando a lixiviação do conteúdo celular, garantindo a compartimentalização celular necessária e permitindo melhor desempenho das sementes durante a germinação (Costa et al., 2008).

A hidratação das sementes depende de sua composição química, da permeabilidade do tegumento (Beckert e Silva, 2002), espécie, disponibilidade de água,

área de contato e temperatura (Carvalho e Nakagawa, 2000). A temperatura de hidratação pode alterar acentuadamente a viabilidade e o vigor das sementes, de forma que o período de embebição das sementes aumenta com a diminuição da temperatura, ocorrendo mais rapidamente em temperaturas elevadas (Bhattacharya et al., 1997; Khazaei e Mohammad, 2009; Rahman et al., 2011). No entanto, a rápida embebição pode ocasionar danos à membrana celular, caracterizando o dano por embebição, que resulta em danos irreparáveis no nível do sistema de membranas, e leva à lixiviação de conteúdos celulares, afetando negativamente a germinação (Castro e Hilhorst, 2004). Além da temperatura, o potencial fisiológico das sementes também pode influenciar o processo de absorção de água, e, possivelmente, sementes de potencial fisiológico inferior apresentam deficiências no processo de reparo e/ou proteção ao sistema de membranas durante a fase inicial de embebição (Costa et al., 2008).

Uma vez iniciada a embebição, a atividade respiratória é ativada, com consequente liberação de energia para a retomada do crescimento embrionário. Durante a fase II de absorção de água ocorre a translocação das reservas digeridas para o eixo embrionário, movimentando-se principalmente a sacarose e aminoácidos, além de compostos fosforados (Marcos Filho, 2005). Assim, a absorção de água é necessária para o metabolismo das sementes, estimulando a utilização das reservas como fonte de energia e substrato para estruturas celulares, as quais serão utilizadas para germinação e crescimento das plântulas (Kikuchi et al., 2006).

Os principais compostos de reserva nas sementes são lipídios, carboidratos e proteínas, variando em proporções entre as diferentes espécies (Corte et al., 2006). Os lipídios são armazenados na forma de triglicerídeos e estão presentes em corpos lipídicos nas sementes (Somerville et al., 2000). Durante a germinação, as lipases hidrolisam os triglicerídeos, formando glicerol e ácidos graxos; parte destes é transformada posteriormente em açúcares, liberando energia para a germinação (Bewley e Black, 1994; Buckeridge et al., 2004). Os carboidratos pré-formados na semente são degradados, liberando como produtos finais da digestão sacarose e ATP, utilizados como fonte de energia e para formação de paredes celulares e protoplasma (Marcos Filho, 2005). A digestão do amido fornece glicose para ser utilizada tanto na respiração, para gerar energia, quanto para compor estruturas físicas durante o crescimento do embrião na fase de germinação (Preiss e Levi, 1980). As proteínas são hidrolisadas a seus aminoácidos constituintes, que podem ser usados para a síntese de várias enzimas e proteínas estruturais ou para fornecer energia pela oxidação do esqueleto de carbono após a desaminação (Ashton, 1976; Bewley e Black, 1994).

A absorção de água pelas sementes promove a ativação de enzimas, as quais facilitam a mobilização e translocação de reservas (Abebe e Modi, 2009). Dentre estas, as enzimas hidrolíticas α -galactosidase e β -mananase estão relacionadas à degradação de mananos, que são polissacarídeos constituintes de paredes celulares, sendo seus produtos de degradação usados para diferentes propósitos, tais como a geração de energia e a produção de matéria prima para a construção de novos tecidos e células (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989). A degradação de reservas da família rafínósica também é feita pela enzima α -galactosidase, conforme constatado por Guimarães et al. (2001) em sementes de *Glycine max* e por Blöchl et al. (2008) em sementes de *Pisum sativum*.

A enzima poligalacturonase atua na quebra de ligações glicosídicas das substâncias pécticas da parede celular, para formar ácido galacturônico livre (Mutlu et al., 1999), sendo bastante estudada no amadurecimento de frutos. Em sementes, estudos relacionando a atividade da poligalacturonase à germinação e embebição das sementes ainda são escassos (Pontes, 2008). Sitrit et al. (1999) relacionaram a atividade desta enzima ao afrouxamento da parede celular do endosperma para a protrusão da radícula em *Lycopersicon esculentum*. O aumento da atividade da poligalacturonase durante a embebição de sementes de *Schizolobium parahyba* foi relacionado à perda de coesão entre as células e dissolução das paredes celulares, permitindo o ataque de outras enzimas nas reservas do citoplasma (Magalhães et al., 2009).

Dalbergia nigra, conhecida popularmente como jacarandá-da-bahia, jacarandá-caviúna ou jacarandá-preto, é uma espécie arbórea pertencente à família Leguminosae Papilionoidea, ocorrendo principalmente na Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) dos Estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Lorenzi, 1992). Sua madeira é dura e moderadamente pesada, sendo utilizada, principalmente, para fabricação de móveis de luxo, peças decorativas e instrumentos musicais, como o piano (Carvalho, 1994). É uma espécie com alto potencial para o manejo florestal sustentável, e apresenta como principais vantagens a facilidade de comercialização no mercado atual, a alta taxa de regeneração em florestas alteradas e a fácil adaptação em terrenos de baixa fertilidade (Rêgo e Possamai, 2003). Devido à exploração desordenada sem plantios de reposição e ao alto valor de sua madeira, encontra-se na lista oficial das espécies brasileiras ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (Ibama, 2008).

Para a maioria das espécies florestais nativas, não são encontradas na literatura informações sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na

germinação, especialmente analisando a fase de hidratação das sementes. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou estudar as alterações fisiológicas e bioquímicas durante a hidratação de sementes de lotes de alto e baixo vigor de *Dalbergia nigra*, relacionadas às mudanças nos aspectos germinativos, na mobilização de reservas e na atividade de enzimas hidrolases durante a absorção de água pelas sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, A. T.; MODI, A. T. Hydro-priming in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Research Journal of Seed Science**, v. 2, p, 23-31, 2009.

ASHTON, F. M. Mobilization of storage proteins of seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 27, p. 95-117, 1976.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Pre-sowing seed treatment – a shotgun approach to improve germination, plant growth and crop yield under saline and non-saline conditions. **Advances in Agronomy**, v. 88, p. 223-271, 2005.

BHATTACHARYA, S.; BAL, S.; MUKHERJEE, R. K.; BHATTACHARYA, S. Kinetics of Tamarind Seed Hydration. **Journal of Food Engineering**, v. 33, p. 129-138, 1997.

BECKERT, O. P.; SILVA, W. R. O uso da hidratação para estimar o desempenho de sementes de soja. **Bragantia**, v. 61, n. 1, p. 61-69, 2002.

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

BLÖCHL, A.; PETERBAUER, T.; HOFMANN, J.; RICHTER, A. Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds. **Planta**, v. 228, n. 1, p. 99-110, 2008.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; AIDAR, M. P. Mobilização de reservas. IN: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F (Eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 324 p.

CAPOCCHI, A. MUCCILLI, V.; CASANI, S.; FOTI, S.; GALLESCHI, L.; FONTANINI, D. Proteolytic enzymes in storage protein mobilization and cell death of the megagametophyte of *Araucaria bidwillii* Hook. post-germinated seeds. **Planta**, v. 233, p. 817-830, 2011.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações, silviculturas, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília: Embrapa-SPI, p. 638p, 1994.

CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 324 p.

COSTA, C. J.; VILLELA, F. A.; BERTONCELLO, M. R. Pré-hidratação de sementes de ervilha e sua interferência na avaliação do potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p.198-207, 2008.

GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G.; FELIX, C. R. Characterization of α -galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, p. 67-73, 2001.

IBAMA – **Lista Oficial de Flora ameaçada de extinção** – acesso em 02/05/2010. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm>

KHAZAEI, J.; MOHAMMADI, N. Effect of temperature on hydration kinetics of sesame seeds (*Sesamum indicum* L.). **Journal of Food Engineering**, v. 91, p.542-552, 2009.

KIKUCHI, K.; KOIZUMI, M.; ISHIDA, N.; HIROMI, K. Water uptake by dry beans observed by micro-magnetic resonance imaging. **Annals of Botany**, v. 98, p. 545-553, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MAGALHÃES, S. M.; BORGER, E. E. L.; BERGER, A. P. A. Alterações nas atividades das enzimas alfa-galactosidade e poligalacturonase e nas reservas de

carboidratos de sementes de *Schizolobium parahyba* (Well) Blake (guapuruvú) durante a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 253-261, 2009.

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

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 3. ed. Oxford: Pergamon Press Ltda., 1989. 192p.

PONTES, C. A. **Influência das enzimas α -galactosidase e poligalacturonase na germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Leguminosae-Papilionoidea)**. 2008. 55p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

PREISS, J.; LEVI, C. Starch biosynthesis and degradation. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. **The biochemistry of plants. Carbohydrates: structure and function (v.3)**. Nova York: Academic Press, 1980, 644 p.

RAHMAN, M. M.; AHAMMAD, K. U.; ALAM, M. M. Effect of soaking condition and temperature on imbibition rate of maize and chickpea seeds. **Research Journal of Seed Science**, v. 4, n. 2, p. 117-124, 2011.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. **Jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* Vellozo) Leguminosae- Papilionoidae: Produção de Mudas**. Comunicado Técnico Embrapa, n. 106, p. 1-3, 2003.

SITRIT, Y.; HADFIELD, K. A.; BENNETT, A. B.; BRADFORD, K. J.; DOWNIE, A. B. Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. **Plant Physiology**, v. 121, p. 419-428, 1999.

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J.; JAWORSKI, J. G.; OHLROGGE, J. B. Lipids. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.), **Biochemistry and molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 456-527, 2000.

CAPÍTULO I

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DURANTE A HIDRATAÇÃO DE SEMENTES DE *Dalbergia nigra* ((VELL.) FR. ALL. EX BENTH.)

RESUMO

Durante a germinação uma série de eventos seqüenciais ocorre nas sementes em resposta a fatores endógenos e/ou exógenos às mesmas. O objetivo deste trabalho foi investigar as alterações fisiológicas decorrentes da hidratação lenta em água (fator exógeno) em sementes de *Dalbergia nigra* (jacarandá-da-bahia). Para tanto, dois lotes de sementes separados como de alto e de baixo vigor foram utilizados nos ensaios. As sementes pertencentes aos dois lotes, após assepsia, foram então hidratadas em água, pelo método da atmosfera úmida (umidade relativa de 95-99%), até atingirem quatro níveis de hidratação: 10, 15, 20 e 25% de umidades nas sementes, nas temperaturas (fator exógeno) de 15 e 25°C. Diante dos tratamentos de hidratação e temperatura, foram analisadas as seguintes variáveis: curva de embebição, percentagem de germinação, índice de velocidade (IVG) e condutividade elétrica. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na resposta fisiológica das sementes entre as temperaturas. Por outro lado, para a hidratação verificou-se que até 15% de umidade aumentou a qualidade fisiológica das sementes de ambos os lotes, que apresentaram maiores valores de germinação, IVG e menores quantidades de compostos lixiviados. A partir de 15% de umidade verificou-se queda na qualidade das sementes classificadas como de alto vigor, enquanto aquelas de baixo vigor continuaram apresentando respostas positivas em 20 e 25% de umidade. Diante disto, conclui-se que as alterações fisiológicas podem servir de indicadores da qualidade das sementes quando relacionados ao seu desempenho germinativo. Adicionalmente, sugere-se que o efeito combinado do fator exógeno principal (níveis de hidratação) versus temperatura não implicou diferentes respostas dos mecanismos germinativos para a espécie *D. nigra*, enquanto a aplicação de diferentes níveis de hidratação foi efetiva em detectar alterações fisiológicas na germinação de *D. nigra*.

Palavras-chave: embebição, germinação, vigor, jacarandá-da-bahia.

CHAPTER I

PHYSIOLOGICAL CHANGES DURING HYDRATION OF *Dalbergia nigra* (VELL.) FR. ALL. EX BENTH.) SEEDS

ABSTRACT

During germination a serie of sequential events occur in seeds in response to endogenous and / or exogenous to them. The objective of this study was to investigate the physiological changes resulting from the slow hydration in water (exogenous factor) in seeds of jacaranda-da-bahia (*Dalbergia nigra*). To this end, two lots of seeds separated as high and low vigor were used in the tests. Seeds belonging to the two lots, after sterilization, were hydrated in water, with the method of humid atmosphere (relative humidity 95-99%) to reach four hydration levels: 10, 15, 20 and 25% moisture content in seeds, in temperatures (exogenous factor) of 15 and 25 ° C. Before hydration and temperature treatments, were analyzed the following variables: curve soaking, germination percentage, germination speed index (GSI) and electrical conductivity. The results showed no significant difference in physiological response of the seeds between the temperatures. On the other hand, for hydration was found that up to 15% humidity increased the physiological quality of seeds of both lots, which showed higher germination values, IVG and smaller amounts of leached compounds. From 15% moisture were found a reduction in the quality of seeds classified as high vigor, while those of low vigor continued to show positive responses in 20 and 25% humidity. Given this, it is concluded that physiological changes can be indicators of quality of seeds related to their germination performance. Additionally, it is suggested that the combined effect of the main exogenous factor (moisture levels) versus temperature did not imply different responses of germination mechanisms for the specie *D. nigra*, while the application of different moisture levels was effective in detecting physiological changes in the germination of *D. nigra*.

Keywords: imbibition, germination, vigor, jacarandá-da-bahia.

INTRODUÇÃO

No decorrer do processo germinativo, eventos sucessivos ocorrem para consolidar o crescimento do embrião e a emissão das estruturas que darão condições para o estabelecimento da nova planta, destacando-se a ativação da respiração (Bewley e Black, 1994), o reparo de macromoléculas (Osborne, 1993), a mobilização de reservas (Gallardo et al., 2001) e o reinício do ciclo celular (Castro et al, 1995; Vásquez-Ramos e Sánchez, 2004), assim como o enfraquecimento das estruturas que cobrem a semente para permitir a protrusão da raiz primária (Groot e Karssen, 1987). No entanto, quase todos os mecanismos associados ao início e adequado funcionamento da germinação estão relacionados ao teor de água nas células e tecidos da semente.

Assim, para que uma semente complete a germinação, é necessário que alcance teor de água suficiente para a ativação das reações químicas relacionadas ao metabolismo, com consequente expansão radicular. Nesse sentido, tratamentos pré-germinativos que utilizam meios com restrição hídrica ou embebição controlada das sementes em água têm sido usados, visando aumentar a uniformidade e a velocidade da germinação (Schwember e Bradford, 2010).

Tais tratamentos envolvem determinado período de hidratação controlada até um ponto próximo da emergência da plântula (Powell et al., 2000). A semente absorve água até o nível em que todos os processos preparatórios ocorrem, sem, contudo, atingir a fase de alongamento celular e, conseqüentemente, a protrusão da raiz primária (Varier et al., 2010; Murungu, 2011), assim como, sem que ocorra a embebição muito rápida, o que poderia causar danos às membranas celulares (Castro e Hilhorst, 2004). Dentre os métodos empregados, são encontrados na literatura trabalhos avaliando o condicionamento das sementes em soluções de Polietilenoglicol (PEG) (Kissmann et al., 2010; Lima e Marcos Filho, 2010; Martins et al., 2011), manitol (Costa et al., 2004; Ávila et al., 2007) ou a hidratação das sementes em água, utilizando metodologias de substrato umedecido e atmosfera úmida (Araújo e Rossetto, 2005; Amooaghaie, 2011).

A hidratação em água apresenta-se como um método simples e barato para envigorar as sementes, além de propiciar aumento da porcentagem, velocidade e sincronização da germinação, e favorecer o desenvolvimento das plântulas (Fujikura et al., 1993; Pinedo e Ferraz, 2008). Estes aspectos foram destacados em experimentos com o condicionamento em água das espécies *Anadenanthera peregrina*, *Parkia multijuga* e *Astrocaryum aculeata* (Ferreira e Gentil, 2006; Calvi et al., 2008; Pinedo e Ferraz, 2008).

Dalbergia nigra, popularmente conhecida como jacarandá-da-bahia, é uma espécie classificada com secundária tardia a clímax e apresenta distribuição natural restrita à floresta atlântica, mais especificamente do sul da Bahia até o norte de São Paulo (Lorenzi, 1992). Além de apresentar alto potencial para o manejo florestal sustentável, sua madeira pode ser utilizada na fabricação de mobiliário de luxo e de instrumentos musicais, como o piano (Rêgo e Possamai, 2003; Carvalho, 1994). Quanto às propriedades tecnológicas, *D. nigra* possui alta durabilidade natural, tem sido usada como decorativa, além de apresentar madeira dura e moderadamente pesada, fato que implica maior valor agregado (Rizzini, 1972). Tal valorização contribuiu para exploração inadequada, aspecto que contribuiu para inclusão na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (Ibama, 2008).

Portanto, considerando questões de sustentabilidade e conservação da espécie *D. nigra*, percebe-se que pesquisas relacionadas ao processo germinativo de suas sementes, principal meio de propagação desta espécie, podem ser a base para eventual plano de manejo e uso desta importante espécie do bioma Mata Atlântica. Diante destes precedentes, com a execução deste trabalho a expectativa é que se possa entender melhor os efeitos da hidratação controlada e da temperatura sobre lotes de alto e baixo vigor de *D. nigra* a partir das mudanças fisiológicas ocorridas durante a germinação.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Sementes de *Dalbergia nigra* colhidas na região de Viçosa, Minas Gerais, em setembro de 2010 foram utilizadas nesta pesquisa. 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.

Sementes coletadas de diferentes matrizes constituíram os lotes I e II, os quais foram selecionados em função da classe de viabilidade. Inicialmente, os lotes foram caracterizados quanto ao grau de umidade, dados biométricos (comprimento, largura e espessura), massa de mil sementes, porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e condutividade elétrica.

Em seguida, as sementes destes lotes foram colocadas para hidratar em água até atingirem aproximadamente quatro níveis de hidratação: 10, 15, 20 e 25% de umidade nas sementes, nas temperaturas de 15 e 25°C. Para ajustar o teor de água para as quantidades desejadas, utilizou-se o método de hidrocondicionamento em atmosfera úmida, sendo as sementes mantidas em sacos de náilon tipo filó (10 x 13 cm) em dessecadores saturados (95-99% UR), nas temperaturas determinadas. A marcha de absorção de água foi conduzida por meio de pesagens constantes das amostras, até que atingissem a umidade proposta, segundo procedimento descrito por Caseiro et al. (2004). O tempo de embebição até as amostras de sementes adquirirem o nível de hidratação desejado foi calculado pelo teor de água inicial e massa de cada uma das amostras, conforme a expressão abaixo (Cromarty et al., 1990):

$$M = \frac{(100 - CA_1)}{(100 - CA_2)} \times Mi$$

Onde: M = massa no conteúdo de água desejada (g); Mi = massa no conteúdo de água original (g); CA₁ = conteúdo de água original (% base úmida); CA₂ = conteúdo de água desejado (% base úmida)

Após chegarem às umidades pré-definidas, quatro repetições de 200 sementes foram utilizadas para os testes fisiológicos:

Teor de água: determinado pelo método da estufa a 105 ± 3°C por 24 horas, utilizando-se três repetições de 20 sementes para cada tratamento, com resultados expressos em porcentagem (base úmida) (Brasil, 2009).

Curva de embebição: A curva foi estabelecida por meio da pesagem inicial de cinco repetições de 20 sementes para cada tratamento. Depois, as sementes foram colocadas para embeber em água destilada sob luz constante, na temperatura de 25°C, sendo pesadas em intervalos de 02 em 02 horas durante as primeiras 12 horas, e após, em intervalos de 12 horas até que atingissem 50% de germinação, ou até o 10º dia após o início da embebição. Antes de cada pesagem, as sementes foram secas com papel absorvente e, em seguida, recolocadas em água destilada. A porcentagem de ganho de água (%) foi calculada em relação ao peso inicial das sementes para cada tratamento.

Germinação: as sementes foram tratadas com o fungicida CAPTAN 0,5% por três minutos e colocadas para germinar em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, forradas duplamente com papel de filtro do tipo germitest umedecido com 4 mL de água destilada. As placas foram mantidas em germinador a 25°C e sob luz constante, proporcionada por quatro lâmpadas 40 W tipo luz do dia, durante 12 dias. A porcentagem de germinação foi determinada pela contagem diária das sementes que emitiram radícula, sendo os resultados expressos em porcentagem média.

Índice de velocidade de germinação: para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962): $IVG = \frac{\sum \left(\frac{n_i}{t_i} \right)}$, onde, n_i é o número de sementes por dia e t_i é o tempo (dias).

Condutividade elétrica: com a finalidade de comparar a integridade das membranas após a aplicação dos tratamentos, foi conduzido o teste de condutividade elétrica, pelo método de massa. Quatro repetições de 50 sementes foram pesadas em balança digital com precisão de duas casas decimais e, em seguida, colocadas em erlenmeyer com 75 mL de água deionizada a 25°C por 36 horas (Marques et al., 2002a). A condutividade elétrica dos lixiviados foi determinada utilizando-se condutivímetro MICRONAL, modelo B 330, eletrodo com constante igual a 1,0. O resultado foi expresso em $\mu\text{s. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de semente.

Delineamento experimental e análises estatísticas: O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), obedecendo a experimento fatorial 4x2 dentro de cada lote (quatro teores de umidade e duas temperaturas), com a testemunha (sementes sem hidratação) como tratamento adicional. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação entre os diferentes tratamentos feita pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes pertencentes ao lote I possuíam menor teor inicial de água e apresentaram-se maiores, com médias de comprimento, largura e espessura superiores ao lote II (Tabela 1). Estas sementes exibiram ainda maior massa, correspondendo a cerca de 15.840 sementes por quilograma, enquanto o lote II possuía aproximadamente 21.687 sementes. O valor encontrado para o lote I foi semelhante ao peso de mil sementes de *D. nigra* apresentado por Davide et al. (1995), de 17.300 sementes, ao passo que o lote II correspondeu aos valores encontrados por Marques et al. (2002b), de 20.004, 20.032 e 19.402 sementes, para três lotes distintos da espécie.

O tamanho e o peso das sementes são características relacionadas ao processo de maturação fisiológica, onde se associam ao desenvolvimento de fitormônios durante a maturação e desenvolvimento da semente (Laboriau, 1983) e às diferenças no número e tamanho das células presentes no embrião, endosperma e tegumento (Ohto et al., 2009). Estas características podem variar entre espécies e dentro da mesma espécie, dependendo das condições do local e da árvore matriz em que foram coletadas, visto que estão sob forte controle genético, principalmente, de origem materna (Bagchi et al., 1989).

Tabela 1. Caracterização dos lotes de sementes I e II de *Dalbergia nigra* quanto ao teor inicial de água (U), aos dados biométricos (comprimento, largura e espessura) e à massa de mil sementes (MMS).

	U (%)	Comprimento (mm)*	Largura (mm)*	Espessura (mm)*	MMS (g)
Lote I	7,92	10,4±0,5	5,5±0,4	1,5±0,2	63,1
Lote II	8,98	9,3± 0,5	4,8±0,3	1,4±0,2	46,1

* Média ± desvio padrão

A porcentagem de germinação e a condutividade elétrica dos dois lotes foram estatisticamente diferentes, com o lote I apresentando valores superiores de germinação e menor valor de condutividade em relação ao lote II. O teste de vigor também mostrou o lote I como superior, com maiores médias de IVG (Tabela 2). Dessa forma, as três características avaliadas discriminaram o lote I como de alto vigor e o lote II como de baixo vigor.

Como o lote I possui sementes de tamanho e densidade superiores, estas características também podem exercer influência no processo de germinação, haja vista

que as sementes maiores são as que foram melhor nutridas durante seu desenvolvimento e que normalmente possuem embriões bem formados e com maiores quantidade de reservas sendo, potencialmente, as mais vigorosas (Carvalho e Nakagawa, 2000; Gaspar e Nakagawa, 2002).

A aplicação do teste de germinação juntamente a testes de vigor em diferentes lotes permite a avaliação mais adequada da qualidade dessas sementes (Larré et al., 2009). As comparações de vigor de sementes entre matrizes, progênies e procedências também fornecem ao pesquisador dados adicionais na fase inicial de um programa de melhoramento ou conservação genética (Santos e Paula, 2007). Sementes de mesmo genótipo podem apresentar aspectos fisiológicos distintos, de forma que a região e a área de produção e as condições climáticas durante a maturação afetam diretamente o desempenho das sementes maduras (Marcos Filho, 2005). Dessa forma, lotes de sementes da mesma espécie e idade cronológica podem exibir comportamento variável durante a germinação, ou mesmo quando armazenados sob mesmas condições (Maeda et al., 1986; Raboteaux e Anderson, 2009).

Tabela 2. Caracterização dos lotes I e II de sementes de *Dalbergia nigra* quanto à porcentagem de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e condutividade elétrica (CE).

	G (%)	IVG	CE ($\mu\text{s. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)
Lote I	80 a	1,85 a	112,7 a
Lote II	33 b	0,74 b	132,5 b
Valor de F	34,5	36,7	12,6
CV (%)	21,1	21,0	5,3

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Sementes dos dois lotes exibiram curva característica de absorção de água (Figura 1). As sementes do lote II necessitaram de menor período de embebição para atingirem os graus de umidade desejados. Tal fato pode ser justificado pelo teor de água inicial superior neste lote em relação ao lote I. Em estudos de hidratação de sementes de *Glycine Max* verificou-se que as mais deterioradas absorveram água mais rapidamente, visto que nestas as membranas celulares são mais permeáveis à entrada de água (Beckert e Silva, 2002). Por outro lado, é possível que a redução na permeabilidade das membranas libere parcialmente os solutos celulares para o meio, ficando parte destes nas sementes próximos ao tegumento, conforme observado em sementes deterioradas de

D. nigra, onde se verificou redução do potencial hídrico, resultando na maior e mais rápida hidratação (Borges et al., 2000). Nas sementes mais vigorosas o caminho da água torna-se mais complexo, mesmo tendo as aquaporinas (canais protéicos nas membranas) facilitando o fluxo através das células (Maurel et al., 2008), além do potencial de parede que reduz a quantidade final de água nas células intactas (Bradford, 1990).

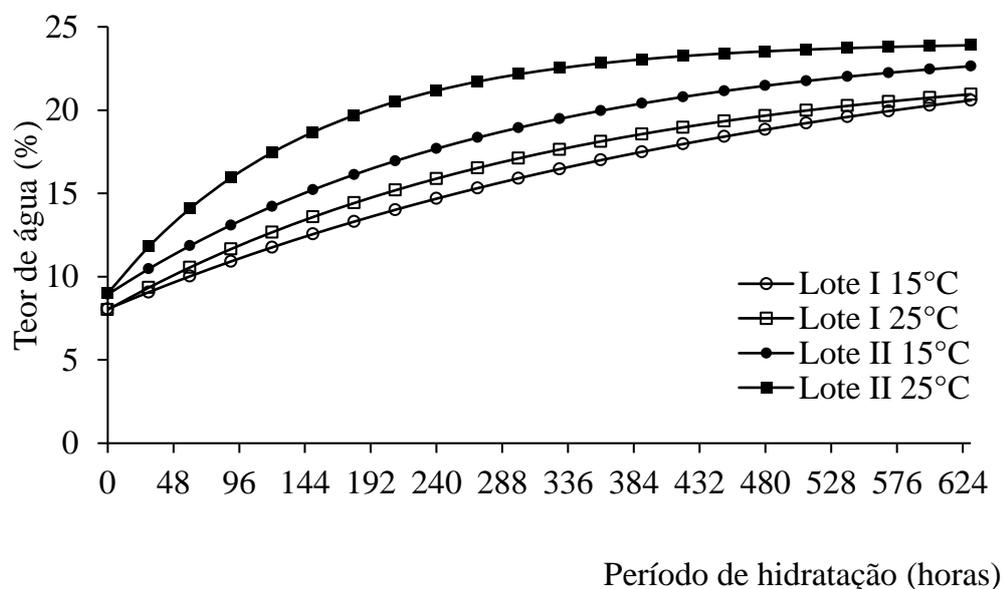


Figura 1. Absorção de água das sementes de *Dalbergia nigra* dos lotes I e II, nas temperaturas de 15 e 25°C.

Em ambos os lotes, a temperatura de 25°C foi a que proporcionou maiores taxas de embebição. A viscosidade é uma propriedade da água fortemente dependente da temperatura, estando envolvida nas taxas de absorção das sementes (Murphy e Noland, 1981). Assim, em temperaturas mais altas ocorre diminuição na viscosidade da água (Woodstock, 1988), de forma que a capacidade de absorção de água aumenta com o aumento da temperatura, sendo esta absorvida mais rapidamente pelos tecidos (Khazaei e Mohammadi, 2009). Percebe-se que esta explicação é clara para o lote I, não sendo, entretanto, para o lote II, onde as curvas de embebição estão mais próximas.

O intervalo entre 20 e 30°C foi definido como o ótimo para a germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Ferraz-Grande e Takaki, 2001). Dessa forma, apesar da embebição ser um processo físico, governado apenas por reações de superfície entre a água e a matéria adsorvedora e, biologicamente, pela afinidade da semente em beber em função da presença de substâncias osmoticamente ativas (Pazdera e Hosnedl, 2002), as condições adequadas de temperatura, em tese, podem favorecer ao rápido

desenvolvimento das fases I e II do processo de germinação, iniciando-se a sucessão de eventos pela absorção de água (Biligtu et al., 2011).

Os teores de água desejados e alcançados encontram-se apresentados na Tabela 3. As diferenças percentuais entre os valores desejados e obtidos não ultrapassaram 1,6 pontos percentuais, sendo considerados satisfatórios para o desenvolvimento das etapas posteriores. O método da atmosfera úmida foi utilizado para a reidratação das sementes de *Parkia multijuga* com relativo sucesso, alcançando as umidades desejadas para efeito de tratamento com precisão adequada (Ramos et al., 2000).

Tabela 3. Teores de água desejados e alcançados durante a hidratação dos lotes I e II de sementes de *Dalbergia nigra*, utilizando-se o método de atmosfera úmida, nas temperaturas de 15 e 25°C.

Temp. (°C)	Lote I		Lote II	
	Teor desejado (%)	Teor alcançado (%)	Teor desejado (%)	Teor alcançado (%)
15	10	11,17	10	9,32
	15	15,66	15	15,19
	20	19,37	20	21,19
	25	25,81	25	25,12
25	10	11,6	10	10,82
	15	14,66	15	15,94
	20	19,99	20	19,54
	25	26,12	25	25,91

A umidade inicial das sementes é importante no processo germinativo, pois a retomada do metabolismo durante a germinação é iniciada mais rapidamente quanto mais rápido a semente alcançar o nível crítico de hidratação. O período de tempo necessário para que a hidratação ocorra varia conforme as características da espécie e da temperatura sob a qual as sementes se encontram. Assim, a água atua como o principal agente estimulador e controlador, proporcionando mediante reações químicas o enfraquecimento do tegumento, acréscimo no volume do embrião e dos tecidos de reserva, assim como aumento nos estímulos à digestão, translocação, e assimilação de nutrientes, com conseqüente crescimento do eixo embrionário (Marcos Filho, 2005; Guimarães et al.; 2008).

As curvas de embebição das sementes dos lotes I e II, hidratadas nas temperaturas de 15 e 25°C permitem constatar que a reidratação segue o padrão trifásico (Bewley e Black, 1994) (Figura 2). A porcentagem de ganho de água foi alta durante as

primeiras 24 horas após o início da embebição, em todos os tratamentos, com aumentos de cerca de 100% na massa para os dois lotes, completando assim a fase inicial do processo (fase I). O padrão de embebição nos lotes de diferentes qualidades fisiológicas demonstra ser esta fase um processo físico de hidratação, dependendo unicamente das diferenças de potencial hídrico entre os dois ambientes. Por outro lado, ao se submeter o lote I à temperatura de 25°C, percebe-se a separação entre as curvas nesta fase, o que poderia ser creditado ao aumento na atividade metabólica, sendo intensificada pelo teor de água.

Conforme verificado no tratamento com teor de umidade de 10%, o metabolismo não ocorreu com a mesma intensidade das demais, mas requerendo prolongamento do tempo para que atingissem nível crítico de umidade ou ajuste interno por meio da osmorregulação, que resultaria em abaixamento do potencial hídrico e conseqüentemente término da germinação. No lote II, de menor vigor, o comportamento a 25°C não se mostrou com grande diferença do lote I, mantendo-se a mesma seqüência das curvas, mas não ocorrendo a germinação no mesmo tempo que o lote de qualidade superior, que finalizou o processo entre 144 e 192 horas, para os teores de 10, 15 e 20%. Na temperatura de 15°C os resultados foram semelhantes, com a diferença de que com 15% de umidade no lote II a germinação ocorreu em 192 horas, mantendo-se o mesmo padrão das demais a 25°C.

Comparando-se os diferentes teores iniciais de umidade em cada lote e temperatura, foi observado que as sementes com teor inicial de 25% de umidade absorveram água mais lentamente. A embebição das sementes é um processo regido pelo gradiente de potencial hídrico (Ψ_w) entre a semente e o ambiente. Dessa forma, quanto maior o Ψ_w da semente, mais hidratada esta se encontra, com o gradiente de embebição de água diminuído no sentido ambiente-semente (Castro e Hilhorst, 2004), enquanto sementes mais secas possuem potenciais matriciais mais negativos, absorvendo água mais rapidamente do que sementes úmidas (Long et al., 2010).

Além do teor inicial de água nas sementes, a velocidade de embebição é influenciada pela disponibilidade hídrica (Ferreira et al., 2006), potencial osmótico da solução que umedece o substrato (Miranda et al., 2010; Balestrazzi et al., 2011), procedência dos lotes de sementes (Mataruga et al., 2010) e características intrínsecas da semente, tais como tamanho (Duarte et al., 2010) e permeabilidade da cobertura protetora (Guimarães et al., 2011).

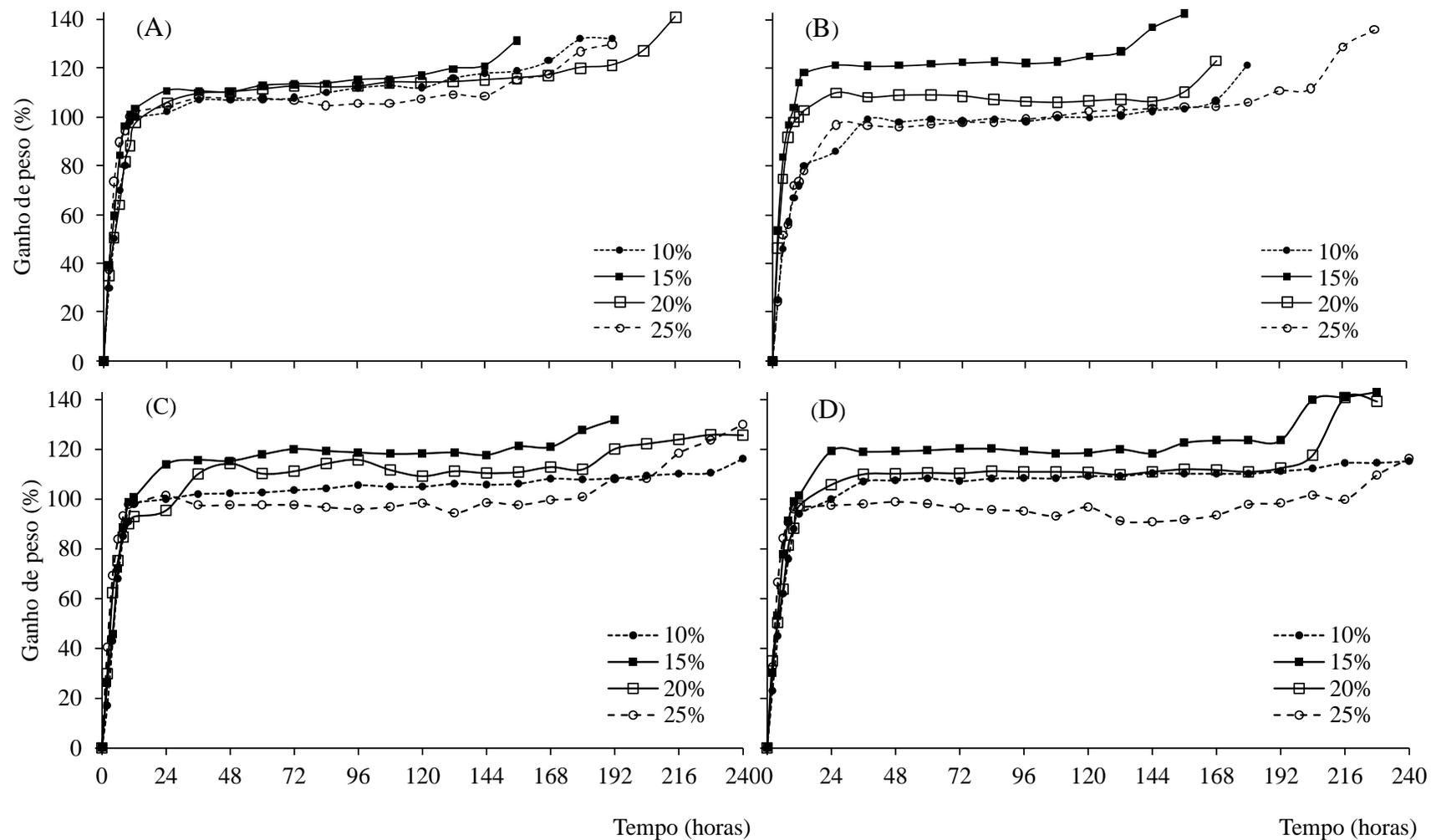


Figura 2. Curva de embebição de dois lotes de sementes de *Dalbergia nigra* a partir de diferentes teores iniciais de umidade e em diferentes temperaturas. A) Lote I - 15°C; B) Lote I - 25°C; C) Lote II - 15°C; D) Lote II - 25°C.

Os resultados da porcentagem de germinação das sementes, após atingirem os diferentes teores de água nas temperaturas de 15 e 25°C, demonstraram que no nível de hidratação de 15% de umidade ocorreram os maiores valores de germinação para os dois lotes, independente da temperatura de embebição, que não foi significativa para os percentuais de germinação (Figura 3).

Entre os diferentes níveis de umidade, constata-se que para o lote I apenas a umidade de 25%, a 25°C, diferiu estatisticamente da testemunha, que já apresentava 80% germinação. No lote II, que possuía germinação inicial de 33%, as sementes com umidade de 15, 20 e 25% apresentaram médias superiores à testemunha e ao tratamento com hidratação de 10% em ambas as temperaturas. Neste lote, em sementes com 15% de umidade, os ganhos percentuais de 45 e 49% de germinação em relação à testemunha para as temperaturas 15 e 25°C, respectivamente, indicam que a aplicação da hidratação em água foi eficiente para o revigoramento das sementes com menor qualidade fisiológica.

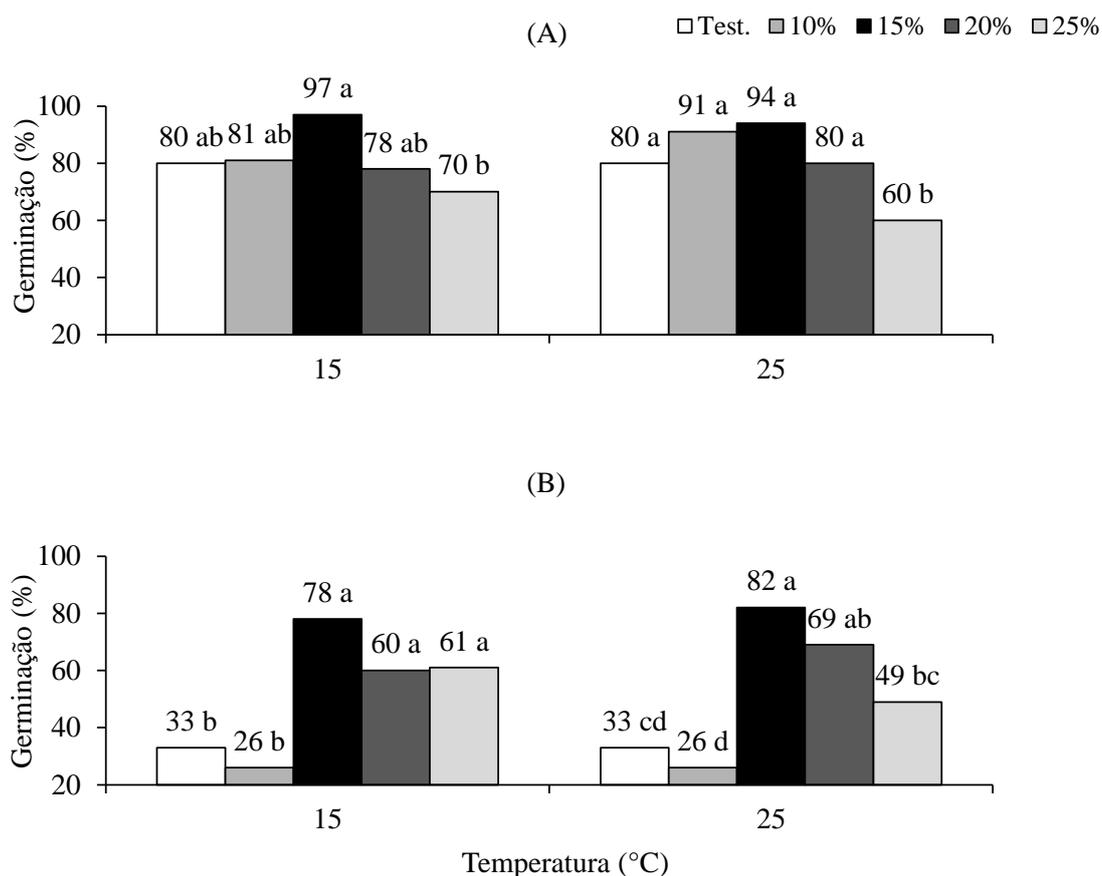


Figura 3. Porcentagem de germinação de sementes de *Dalbergia nigra* a partir dos teores iniciais de umidade de 10, 15, 20 e 25%, hidratadas nas temperaturas de 15 e

25°C. A) Lote I; B) Lote II. Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada lote e temperatura avaliados, não diferem entre si, a 5%, pelo teste Tukey.

O condicionamento em água melhora a longevidade das sementes de baixo vigor, enquanto reduz das sementes de alto vigor (Basu, 1994; Varier et al., 2010). Possivelmente as sementes de maior vigor encontram-se em estágio em que a água adicional resultará em germinação, desde que mantidas as condições requeridas para tal. Entretanto, a absorção de água após determinado nível que permita que o metabolismo ocorra sem, contudo, permitir que haja protrusão da radícula, resultará em deterioração das sementes (Powell et al., 2000). Quando uma semente de menor vigor é submetida ao condicionamento, esta possui mais tempo para reparar as lesões metabólicas antes que ocorra a germinação, evitando assim maior deterioração (Varier et al., 2010). O melhor desempenho germinativo das sementes de menor vigor tem sido relacionado ao desencadeamento dos mecanismos de reparo das membranas pela hidratação e à formação antecipada de metabólitos necessários à germinação (Burgasser e Powell, 1984; Sung e Chang, 1993).

Em estudos de embebição de sementes de baixo vigor de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) foram observados ganhos significativos na germinação, que aumentou de 58 para 70% quando as sementes passaram de 20 para 31% de umidade, momento a partir do qual a germinação decresceu (Ferreira e Gentil, 2006). A porcentagem de germinação foi aumentada significativamente após o condicionamento em água em sementes de *Tanacetum cinerariifolium* (Li et al., 2011) e *Cucurbita máxima* (Sun et al., 2011). Por outro lado, a hidratação em sementes de *Anadenanthera peregrina*, que já apresentavam germinação de 86% na testemunha, não provocou acréscimos significativos na porcentagem de germinação, que teve valor de 87% após a aplicação do tratamento (Reis e Cunha, 1997).

Os maiores valores de índices de velocidade de germinação foram observados nas sementes com grau de umidade de 15%, em ambos os lotes (Tabela 4). Também não foram verificadas diferenças significativas entre as temperaturas testadas para o IVG, assim como para o percentual de germinação. Para o lote I, todos os níveis de hidratação apresentaram valores de IVG maiores que a testemunha, enquanto no lote II os valores para a testemunha e com 10% de umidade foram iguais estatisticamente, que, por sua vez, foram inferiores e diferiram dos demais valores de umidade nas sementes.

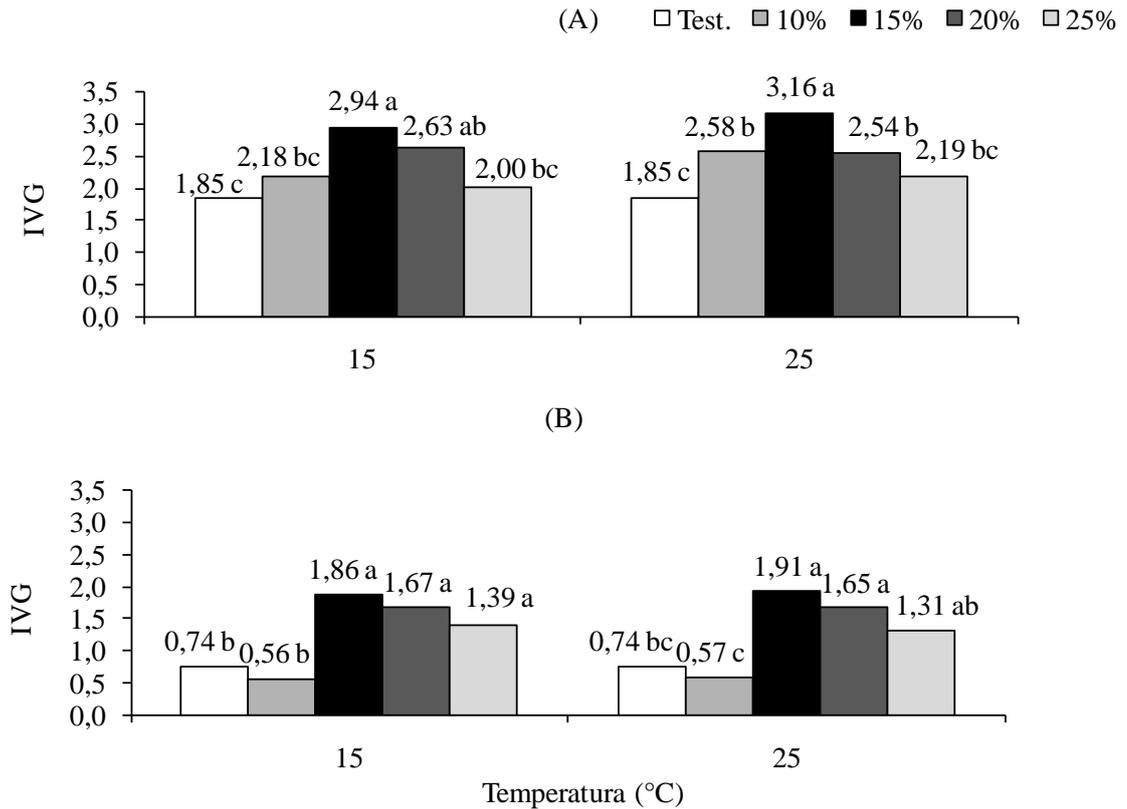


Figura 4. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Dalbergia nigra* a partir dos teores iniciais de umidade de 10, 15, 20 e 25%, hidratadas nas temperaturas de 15 e 25°C. A) Lote I; B) Lote II. Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada lote e temperatura avaliados, não diferem entre si, a 5%, pelo teste Tukey.

Para as sementes que já passaram anteriormente por um processo de embebição, quando colocadas novamente em contato com a água, não é necessária a reiteração dos processos já ocorridos na primeira hidratação, que possibilitou a reorganização e ativação de processos celulares que estavam inativos devido ao processo de dessecação (Bewley e Black, 1994). Dessa forma, as sementes hidratadas estão fisiologicamente mais próximas ao início da fase III de embebição e, conseqüentemente, da protrusão da radícula, apresentando maiores valores de velocidade de germinação. Tecnicamente, a duração adequada do período de condicionamento em água apresenta-se como fator fundamental para o vigor das sementes, pois ao melhorar a germinação pode assegurar o estabelecimento da plântula em condições de campo e fornecer parâmetros para a aplicação dos tratamentos pré-germinativos (Ghassemi-Golezani et al., 2010). Pesquisas confirmam os efeitos positivos da embebição em água sobre o vigor e germinação das

sementes em *Malpighia puniceifolia*, *Triplaris americana*, *Egletes viscosa* e *Sorghum bicolor* (Azeredo et al., 2005; Mendonça et al., 2005; Bezerra et al., 2006; Moradi e Younsei, 2009).

Sementes de *Dalbergia nigra* submetidas à hidratação à temperatura de 15°C, independente do grau de hidratação e do vigor no lote exibiram valores de condutividade inferiores às testemunhas, para os dois lotes (Tabela 4). Na temperatura de 25°C, os níveis de hidratação 10, 15 e 20% diferiram da testemunha para o lote I, enquanto no lote II foram observadas médias semelhantes entre a testemunha e os demais tratamentos.

Tabela 4. Condutividade elétrica (CE) de sementes dos lotes I e II de *Dalbergia nigra* em diferentes teores de umidade (10, 15, 20 e 25%), hidratadas nas temperaturas de 15 e 25°C.

Umidade (%)	Lote I		Lote II	
	Temperatura (°C)			
	15	25	15	25
Test.	112,704 b	112,704 b	132,524 c	132,524 ab
10	91,077 a A	87,657 a A	121,579 b A	126,002 a A
15	87,413 a A	88,674 a A	96,935 a A	111,758 a A
20	89,270 a A	97,772 a A	126,114 b A	130,508 a A
25	88,606 a A	113,852 b B	125,571 b A	157,823 b B

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, dentro de cada lote, não diferem entre si, a 5%, pelo teste Tukey.

Na embebição lenta há tempo suficiente para que as membranas das células, compostas por uma camada dupla de fosfolipídios, que ao se desidratarem passam de um estado fluído para um estado de gel, voltem ao estado cristalino líquido, sem ocorrer danos celulares e, por conseguinte, efluxo de compostos carregados eletricamente ou íons que configurem a lixiviação (Castro e Hilhorst, 2004). Por outro lado, a absorção de água pelas sementes dos lotes I e II até 25% de umidade na temperatura de 25°C causou alterações significativas na integridade das membranas, que apresentaram maiores quantidades de lixiviados em relação aos demais níveis de hidratação. A temperatura mais elevada, associada ao maior período de embebição e possível deterioração, pode ter provocado mudanças na conformação dos fosfolipídios presentes nas membranas, que resultaram em maiores valores de condutividade elétrica. Além disso, as sementes expostas em maior tempo ficam mais propícias à contaminação por microorganismos, que potencialmente causam danos estruturais às sementes e podem alterar o processo de embebição.

Em sementes de *Peltophorum dubium* após o pré-condicionamento em água durante 24 horas as membranas apresentaram-se melhor estruturadas, com menor concentração de eletrólitos liberados pelas sementes (Perez e Negreiros, 2001). A menor perda de vigor e viabilidade das sementes após a hidratação em água é associada à redução na lixiviação de açúcares, ao aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante e à menor peroxidação de lipídios nas sementes, resultando em diminuição no extravasamento celular (Rudrapal e Nakamura, 1998; Ella et al., 2011).

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos conclui-se que a técnica de hidratação lenta em água favoreceu a germinação da espécie *Dalbergia nigra*, independente do vigor das sementes;

A manutenção das sementes em hidratação até 15% de umidade foi a mais indicada para incremento na qualidade das sementes;

A hidratação por períodos em que as sementes alcancem 10% de umidade e a longos períodos, como até a 25%, foram menos benéficas, conferindo alterações fisiológicas que foram verificadas pela percentagem de germinação e pelo índice de velocidade de germinação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOOAGHAIE, R. The effect of hydro and osmopriming on alfalfa seed germination and antioxidant defenses under salt stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 33, p. 6269-6275, 2011.

ARAÚJO, A. E. S.; ROSSETTO, C. A. V. Influência da hidratação controlada na germinação de sementes de amendoim armazenadas. **Científica**, v. 33, n. 2, p. 199-207, 2005.

ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; FAGLIARI, J. R.; SANTOS, J. L. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p.98-106, 2007.

AZEREDO, G. A.; MATOS, V. P.; LOPES, K. P.; SILVA, A.; RODRIGUES, L. F. Viabilidade e vigor de sementes de acerola (*Malpighia puniceifolia*) submetidas a embebição sob diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, p. 81-84, 2005.

BAGCHI, S. K.; JOSHI, D. N.; RAWAT, D.S. Variation in seed size of Acacia spp. **Silvae Genetica**, v. 39, n. 3-4, p. 107-110, 1989.

BALESTRAZZI, A.; CONFALONIERI, M.; MACOVEI, A.; CARBONERA, D. Seed imbibition in *Medicago truncatula* Gaertn.: Expression profiles of DNA repair genes in relation to PEG-mediated stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 706-713, 2011.

BASU, R. N., An appraisal of research on wet and dry physiological seed treatments and their applicability with special reference to tropical and subtropical countries. **Seed Science and Technology**, v. 22, p. 107–126, 1994.

BECKERT, O. P.; SILVA, W. R. O uso da hidratação para estimar o desempenho de sementes de soja. **Bragantia**, v. 61, n. 1, p. 61-69, 2002.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** Nova York: Plenum Press, 1994.

BILIGETU, B.; SCHELLENBERG, M. P.; MCLEOD, J. G. The effect of temperature and water potential on seed germination of poly-cross side-oats grama (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.) population of Canadian Prairie. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 74-81, 2011.

BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; BUCKERIDGE, M. S. Alterações nas composições de carboidratos e de ácidos graxos em sementes de Jacarandá-da-Bahia osmocondicionadas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 1, p.10-16, 2000.

BRAFDORD, K. J. A water relations analysis of seed germination rates. **Plant Physiology**, v. 94, p. 840-849, 1990.

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

BURGASSER, R. W., POWELL, A. A. Evidence for repair processes in the invigoration of seeds by hydration. **Annals of Botany**, v. 53, p. 753-757, 1984.

CALVI, G. O.; AUDD, F. F.; VIEIRA, G.; FERRAZ, I. D. K. Tratamentos de pré-embrição para aumento do desempenho da germinação de sementes de *Parkia multijuga* Benth. **Revista Forestal Latinoamericana**, v. 23, n. 2, p. 53-65. 2008.

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

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações, silviculturas, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: Embrapa-CNPq; Brasília: Embrapa-SPI, p. 638p, 1994.

CASEIRO, R. F.; BENNETT, M. A.; MARCOS FILHO, J. Comparison of three priming techniques for onion seed lots differing in initial seed quality. **Seed Science and Technology**, v. 32, n. 2, p. 365-375, 2004.

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

CASTRO, R. D.; ZHENG, X.; BERGERVOET, J. H. W.; DE VOS, C. H. R.; BINO, R. b-Tubulin accumulation and DNA replication in imbibing tomato seeds. **Plant Physiology**, v. 109, p. 499-504, 1995.

COSTA, P. R.; CUSTÓDIO, C. C.; NETO, N. B. M.; MARUBAYASHI, O. M. Estresse hídrico induzido por manitol em sementes de soja de diferentes tamanhos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p.105-113, 2004.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **Design of seed storage facilities for genetic conservation**. Rome: International Board of Plant Genetic Resources, 1990. 109p.

DAVIDE A. C.; FARIA, J. M. R.; BOTELHO, S. A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE, 1995. 40p.

DUARTE, E. F.; CARNEIRO, I. F.; SILVA, N. F.; GUIMARÃES, N. N. R. Características físicas e germinação de sementes de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 4, p. 422-429, 2010.

ELLA, E. S.; DIONISIO-SESE, M. L.; ISMAIL, A. M. Seed pre-treatment in rice reduces damage, enhances carbohydrate mobilization and improves emergence and seedling establishment under flooded conditions. **AoB Plants**, v. 7, p. 1-11, 2011.

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.

FERREIRA, G.; GUIMARÃES, V. F.; PINHO, S. Z.; OLIVEIRA, M. C.; RICHART, A.; BRAGA, J. F.; DIAS, G. B. Curva de absorção de água em sementes de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) Cv. Gefneri. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 121-124, 2006.

FERREIRA, S. A. N.; GENTIL, D. F. O. Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). **Acta Amazônica**, v. 36, p. 141-146, 2006.

FUJIKURA, Y., KRAAK, H. L.; BASRA, A. S.; KARSSSEN, C. M. Hydropriming, a simple and inexpensive priming method. **Seed Science and Technology**, v. 21, p. 639-642, 1993.

GALLARDO, K.; JOB, C.; GROOT, S. P. C.; PUYPE, M.; DEMOL, H.; VANDEKERCKHOVE, J.; JOB, D. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. **Plant Physiology**, v. 126, p. 835-848, 2001.

GASPAR, C. M.; NAKAGAWA, J. Influência do tamanho na germinação e no vigor de sementes de milho (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 339-344, 2002.

GHASSEMI-GOLEZANI, K.; CHADORDOOZ-JEDDI, A.; NASROLLAHZADEH, S.; MOGHADDAM, M. Effects of Hydro-Priming Duration on Seedling Vigour and Grain Yield of Pinto Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, v. 38, n. 1, p. 109-113, 2010.

GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. **Planta**, v. 171, p. 525-531, 1987.

GUIMARÃES, C. C.; FARIA, J. M. R.; OLIVEIRA, J. M.; SILVA, E. A. A. Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de dna nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 2, p. 207-215, 2011.

GUIMARÃES, M. A.; DIAS, D. C. F. S.; LOUREIRO, M. E. Hidratação de sementes. **Revista Trópica**, v. 2, n. 1, p. 31-39, 2008.

IBAMA – **Lista Oficial de Flora ameaçada de extinção** – acesso em 02/05/2010. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/flora>.

KHAZAEI, j.; MOHAMMADI, N. Effect of temperature on hydration kinetics of sesame seeds (*Sesamum indicum* L.). **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 542-552, 2009.

KISSMANN, C.; SCALON, S. P. Q.; MPTA, L. H. S.; VIEIRA, M. C. Germinação de sementes de *Stryphnodendron mart.* osmocondicionadas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 26-35, 2010.

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

LARRÉ, C. F.; MORAES, D. M.; LOPES, N. F. Potencial fisiológico de dois lotes de sementes de arroz tratadas com 24-epibrassinolídeo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, p. 27-35, 2009.

LI, J.; YIN, L. Y.; JONGSMA, M. A.; WANG, C. Y. Effects of light, hydropriming and abiotic stress on seed germination, and shoot and root growth of pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*). **Industrial Crops and Products**, 2011 (no prelo).

LIMA, L. B.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes de pepino e germinação sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p.138-147, 2010.

LONG, R. L.; WILKLIAMS, K.; GRIFFITHS, E. M.; FLEMATTI, G. R.; MERRITT, D. J.; STEVENS, J. C.; TURNER, S. R.; POWLES, S. B.; DIXON, K. W. Prior hydration of *Brassica tournefortii* seeds reduces the stimulatory effect of karrikinolide on germination and increases seed sensitivity to abscisic acid. **Annals of Botany**, v. 105, p. 1063-1070, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MAEDA, J. A. C.; RAZERA, L. F.; LAGO, A. A.; UNGARO, M. R. G. Discriminação entre lotes de sementes de girassol através do teste de envelhecimento rápido. **Bragantia**, v. 45, n. 1, p. 133-141, 1986.

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.M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

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. Diferenciação de lotes de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (VELL.) Fr.All. ex Benth.) pelo teste de germinação em laboratório e viveiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 244-247, 2002b.

MARTINS, C. C.; PEREIRA, M. R. R.; MARCHI, S. R. Germinação de sementes de *Melaleuca quinquenervia* em condições de estresse hídrico e salino. **Planta Daninha**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2011.

MATARUGA, M.; HAASE, D. L.; ISAJEV, V. Dynamics of seed imbibition and germination of Austrian pine (*Pinus nigra* Arnold) from extreme habitat conditions within five Balkan provenances. **New Forests**, v. 40, p. 229-242, 2010.

MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D.; SANTONI, V. Plant Aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 595-624, 2008.

MENDONÇA, A. V. R.; COELHO, E. A.; SOUZA, N. A.; BALBINOT, E. B.; SILVA, R. F.; BARROSO, D. B. Efeito da hidratação e do condicionamento osmótico em sementes de pau-formiga. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p.111-116, 2005.

MIRANDA, D.; ULRICH, C.; FISCHER, G. Imbibition and percentage of germination of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) seeds under NaCl stress. **Agronomía Colombiana**, v. 28, n. 1, p. 29-35, 2010.

MORADI, A.; YOUNESI, O. Effects of osmo and hydro-priming on seed parameters of grain sorghum. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, p.1696-1700, 2009.

MURPHY, J. B.; NOLAND, T. L. Temperature effects on seed imbibition and leakage mediated by viscosity and membranes. **Plant Physiology**, v. 69, n. 2, p. 428-431, 1982.

MURUNGU, F.S. Effects of seed priming and water potential on seed germination and emergence of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties in laboratory assays and in the field. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 21, p. 4365-4371, 2011.

OHTO, M.; FLOYD, S. K.; FISHER, R. L.; GOLDBERG, R. R.; HARADA, J. J. Effects of APETALA2 on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in Arabidopsis. **Sexual Plant Reproduction**, v. 22, p. 277-289, 2009.

OSBORNE, D. J. Function of DNA synthesis and DNA repair in the survival of embryos during early germination and in dormancy. **Seed Science Research**, v. 3, p. 43-53, 1993.

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.

PEREZ, S. C. G. A.; NEGREIROS, G. F. Pré-condicionamento na viabilidade e no vigor de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng) Taub) em condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 175-183, 2001.

PINEDO, G. J. V.; FERRAZ, I. D. K. Hidrocondicionamento de *Parkia pendula* [Benth ex Walp]: sementes com dormência física de árvore da amazônia. **Revista Árvore**, v. 32, n. 1, p. 39-49, 2008.

POWELL, A. A.; YULE, L. J.; JING, H.; GROOT, S. P. C.; BINO, R. J.; PRITCHARD, H. W. The influence of aerated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equations. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 353, p. 2031-2043, 2000.

RABOTEAUX, N. N. G.; ANDERSON, N. O. Germination of *Cleome hassleriana* and *Polanisia dodecandra* seed lots in response to light, temperature and stratification. **Research Journal of Seed Science**, p. 1-17, 2009.

RAMOS, F. N.; LOUREIRO, M. B.; CRUZ, A. P. M.; ANDRADE, A. C. S. Comparação entre métodos de secagem na determinação do grau de umidade em sementes de *Parkia multijuga* Benth. (Leguminosa Mimonoideae). **Revista Árvore**, v. 24, n. 2, p. 175-179, 2000.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. **Jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* Vellozo) Leguminosae- Papilionoidae: Produção de Mudás**. Comunicado Técnico Embrapa, n. 106, p. 1-3, 2003.

REIS, A. M. M.; CUNHA, R. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. com diferentes conteúdos de umidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 1071-1079, 1997.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Editora da USP, 1972. 294 p.

RUDRAPAL, D. ; NAKAMURA, S. The effect of hydration-dehydration pretreatments on eggplant and radish seed viability and vigour. **Seed Science and Technology**, v. 16, p. 123-130. 1988.

SANTOS, S. R. G.; PAULA, R. C. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de lotes de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilha) – Euphorbiaceae. **Revista do Instituto Florestal**, v.19, n. 1, p. 1-12, 2007.

SCHWEMBER, A. R.; BRADFORD, K. J. A genetic locus and gene expression patterns associated with the priming effect on lettuce seed germination at elevated temperatures. **Plant Molecular Biology**, v. 73, p. 105-118, 2010.

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

SUN, Y. D.; LI, X. Z.; YANG, H. L.; SUN, L. Effect of priming techniques on seed germination characteristics of *C. Maxima* Duch. **Key Engineering Materials**, v. 36, p. 474-476, 2011.

SUNG, F. J. M.; CHANG, Y. H. Biochemical activities associated with priming of sweet corn seeds to improve vigor. **Seed Science and Technology**, v. 4, p. 301-311, 1993.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, v. 99, n. 4, p. 450-456, 2010.

VÁZQUEZ-RAMOS, J. M.; SÁNCHEZ, M. D. L. P. The cell cycle and seed germination. **Seed Science Research**, v. 13, p. 113-130, 2004.

WOODSTOCK, L.W. Seed imbibition: a critical period for successful germination. **Journal of Seed Technology**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 1988.

CAPÍTULO II

ALTERAÇÃO NAS RESERVAS DE SEMENTES DE *Dalbergia nigra* ((VELL.) FR. ALL. ex BENTH.) DURANTE A HIDRATAÇÃO

RESUMO

A embebição de sementes é o passo inicial do processo de germinação, que se caracteriza pela hidratação de tecidos e células, ativando e/ou induzindo a síntese de enzimas responsáveis pela mobilização das reservas, para atender as necessidades de respiração e a construção de novas estruturas celulares. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a mobilização de substâncias de reservas durante a hidratação lenta em água de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*). Sementes pertencentes a dois lotes distintos (lotes I e II) foram colocadas para hidratar em dessecadores saturados (95-99% UR) nas temperaturas de 15 e 25°C até atingirem os teores de água de 10, 15, 20 e 25%. Em cada nível de hidratação foram avaliadas as variações nas reservas de lipídios, carboidratos solúveis, amido e proteínas solúveis. A mobilização de reservas ocorreu de maneira similar nos dois lotes avaliados, porém não foram observadas diferenças entre as duas temperaturas de hidratação. Os teores de lipídios apresentaram pequena variação durante a hidratação, enquanto os conteúdos de carboidratos solúveis e amido apresentaram decréscimo a partir do nível de hidratação de 15%. Proteínas solúveis exibiram tendência gradativa de queda, desde a testemunha (sementes secas) até o nível de 25% de umidade.

Palavras-chave: jacarandá-da-bahia, embebição, lipídios, carboidratos, proteínas.

CHAPTER II

ALTERATION OF RESERVES OF *Dalbergia nigra* ((VELL.) FR. ALL. ex BENTH.) SEEDS DURING HYDRATION

ABSTRACT

The imbibition of seeds is the initial step of the germination process, which is characterized by the hydration of tissues and cells, activating and / or inducing the synthesis of enzymes responsible for the mobilization of reserves, to attend the needs of respiration and construction of new cell structures. Therefore, the objective of this study was to investigate the mobilization of reserve substances during the slow hydration in water of jacaranda-da-bahia (*Dalbergia nigra*) seeds. Seeds from two different lots (lots I and II) were placed to hydrate in saturated desiccators (95-99% RH) at temperatures of 15 and 25 ° C until they reach the water contents of 10, 15, 20 and 25%. At each level of hydration were evaluated changes in reserves of lipids, soluble carbohydrates, starch and soluble proteins. The mobilization of reserves was similarly evaluated in two lots, but no differences were observed between the two temperatures of hydration. The lipid content showed little variation during hydration, while the content of soluble carbohydrates and starch showed a decrease from the level of hydration of 15%. Soluble proteins showed a tendency of gradual decrease from the control (dry seeds) to the level of 25% humidity.

Keywords: jacarandá-da-bahia, imbibition, lipids, carbohydrates, proteins.

INTRODUÇÃO

Assim como na área de produção de sementes para fins alimentícios e industriais, a discussão a respeito da necessidade da propagação das espécies florestais nativas, como forma de promover a recuperação de áreas degradadas e recomposição da paisagem natural frente aos problemas ambientais atuais tem sido crescente nos últimos anos. Dessa forma, a geração de informações sobre a germinação, o cultivo e as potencialidades dessas espécies pode fornecer subsídios importantes para diferentes programas de manejo florestal, silvicultura de plantios e enriquecimento florestal.

No entanto, há necessidade de conhecer melhor detalhes determinantes no processo de germinação, visando o sucesso das iniciativas que envolvam as sementes de espécies nativas, uma vez que a despeito da importância ecológica e ambiental destas espécies e quiçá econômica, pouco tem sido esclarecido sobre o melhor desempenho na propagação de espécies nativas dos diferentes biomas brasileiros. Na Mata Atlântica, por exemplo, espécies como *Dalbergia nigra*, conhecida popularmente como jacarandá-da-bahia, jacarandá-caviúna ou jacarandá-preto, da família Papilionoidea, destaca-se por possuir madeira moderadamente dura, pesada, decorativa e de grande durabilidade natural, fato que implica valor comercial (Rizzini, 1972; Lorenzi, 1992). Devido a estes aspectos, sua madeira tem sido alvo de devastação e a espécie está incluída na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (Ibama, 2008). Por outro lado, pouco tem sido feito no sentido de aprofundar investigações científicas sobre a(s) estratégia(s) de propagação, em particular, com ênfase na sua germinação como um todo ou parte do processo germinativo, levando em conta as demandas específicas de etapas como a embebição, crescimento do embrião e estabelecimento das plântulas.

De maneira geral, a germinação inicia-se com a embebição das sementes, quando os processos metabólicos e fisiológicos inerentes ao processo germinativo são prontamente reiniciados, até o ponto em que ocorre o crescimento do embrião (Nonogaki et al., 2007). Neste aspecto, a água é o principal agente do processo germinativo, afetando a porcentagem, a uniformidade e a velocidade da germinação. A absorção de água pela semente é variável entre as espécies, sendo diferente de acordo com as necessidades de cada espécie (Alvarado e Bradford, 2002). A hidratação das sementes em água, ou pré-hidratação, consiste na embebição gradual de água pelas sementes, sob temperatura e umidade relativa controladas. Este procedimento permite que as sementes ativem inúmeros eventos do processo germinativo, sem que ocorra a

protrusão da radícula (Varier et al., 2010). Assim, o teor de água das sementes pode ser um importante fator que afeta a absorção de água e subsequente resposta à germinação (Long et al., 2010).

Durante o processo de germinação, ocorrem alterações na composição química da semente e no consumo de substâncias de reservas, sendo as principais os carboidratos, lipídios e proteínas, as quais são hidrolisadas e fornecem energia para a síntese do protoplasma e de componentes estruturais e para o desenvolvimento do embrião (Buckeridge et al., 2004; Kerbauy, 2004). Os lipídios servem como fonte de carbono e energia para o desenvolvimento das plântulas (Leonova et al., 2010), enquanto os carboidratos pré-formados na semente são utilizados como substrato para a respiração durante o período pré-germinativo, e o amido serve como fonte de carbono reduzido para respiração e metabolismo das sementes (Bewley e Black, 1994). As proteínas são hidrolisadas a aminoácidos por enzimas proteolíticas e fornecem energia para síntese de novas enzimas e proteínas estruturais (Wang et al., 2007).

Considerando-se então a importância das espécies nativas tropicais quanto ao aspecto ecológico e o potencial de utilização de suas madeiras, além de outros produtos não madeiráveis (gomas, sementes, frutos, resinas, óleos, etc), é fundamental que se conheça com mais detalhes os mecanismos de propagação e o comportamento das sementes frente a diferentes condições de meio, em particular, a hidratação das sementes, uma vez que a água pode ser considerada fator fundamental para iniciar o processo germinativo, confirmar a produção de mudas e o estabelecimento das mesmas sob condições naturais ou em plantios florestais. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi investigar a alteração das reservas lipídios, carboidratos solúveis, amido e proteínas solúveis durante a hidratação em água de sementes de *Dalbergia nigra*, de forma a entender como se comportam tais reservas durante o processo de absorção de água pelas sementes.

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 setembro/2010 a julho/2011. As sementes de *Dalbergia nigra* utilizadas para as análises foram coletadas de árvores de duas diferentes procedências na região de Viçosa, Minas Gerais, as quais constituíram os lotes I e II. 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 dos lotes I e II foi determinado pelo método da estufa $105 \pm 3^\circ\text{C}$, 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).

Amostras de sementes dos dois lotes 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, em temperatura constante de 25°C, durante 12 dias. As sementes foram consideradas germinadas quando apresentaram emissão de radícula. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado de acordo com a fórmula apresentada por Maguire (1962). Do ponto de vista amostral foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes para cada lote avaliado.

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 em água destilada.

As sementes pertencentes aos dois lotes foram acondicionadas em sacos de náilon tipo filó (10 x 13 cm) e colocadas para embeber em dessecadores saturados (95-99% UR), até atingirem aproximadamente os níveis de hidratação de 10, 15, 20 e 25%, nas temperaturas de 15 e 25°C. O tempo de embebição necessário para as sementes adquirirem o teor de água desejado foi calculado utilizando-se o teor de água inicial das sementes e a massa de cada amostra, conforme a expressão abaixo, descrita por

Cromarty et al. (1990):

$$M = \frac{(100 - CA_1)}{(100 - CA_2)} \times Mi$$

Onde: M = massa no conteúdo de água desejada (g); Mi = massa no conteúdo de água original (g); CA₁ = conteúdo de água original (% base úmida); CA₂ = conteúdo de água desejado (% base úmida)

Após atingirem os níveis de hidratação desejados, amostras de cotilédones das sementes dos dois lotes foram secas em estufa a 45°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.

A determinação do teor de lipídios foi obtida a partir da extração dos óleos contidos nas sementes dos dois lotes, realizada em aparelho Soxhlet, seguida de estimativa do teor de óleos pela diferença de massa entre material de sementes triturado e o material desengordurado, segundo procedimentos descritos por Silva (1990). As amostras de sementes foram trituradas e colocadas em cartuchos de papel-filtro, pesadas e transferidas para o aparelho, sendo mantidas em refluxo, com hexano, durante 24 horas. Após, foram secadas a 45°C por 60 minutos e pesadas novamente, sendo o resultado expresso em percentagem de lipídios (óleos) extraídos.

Para a extração dos açúcares solúveis, as amostras desengorduradas foram mantidas em álcool 80% em banho-maria a 75°C durante 30 minutos e centrifugadas a 16000 xg 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 e a mistura foi centrifugada, retirando-se o sobrenadante, que foi usado na quantificação de açúcares 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 do amido com 1,0 mL de ácido perclórico 35% durante 15 minutos, sendo em seguida quantificado pelo método colorimétrico (Passos, 1996).

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 de acordo com Bradford (1976), utilizando-se a albumina de sêrum bovina (BSA) como padrão.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, obedecendo a experimento fatorial 4x2 dentro de cada lote (quatro níveis de hidratação e duas temperaturas), acrescido da testemunha (sementes sem hidratação) como tratamento adicional. Em seguida, foram realizadas análises de variância, sendo as

médias de germinação e IVG 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

Sementes de *Dalbergia nigra* apresentaram teor de água inicial de 7,92% no lote I e 8,98% no lote II (Tabela 1). As porcentagens de germinação das sementes do lote I e II foram de 80% e 33%, respectivamente. Para o IVG, o lote I também apresentou média superior ao lote II, com valores de 1,85 e 0,74, respectivamente. Dessa forma, foi possível classificar o lote I como de alto vigor e o II como de baixo vigor.

Tabela 1. Porcentagem de umidade (U), de germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Dalbergia nigra* pertencentes aos lotes I e II.

	U (%)	G (%)	IVG
Lote I	7,92	80 a	1,85 a
Lote II	8,98	33 b	0,74 b
Valor de F	-	34,5	36,7
CV (%)	-	21,1	21,0

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

As diferenças dos percentuais de germinação e do IVG entre os dois lotes, provavelmente, são devidas à origem destes, relacionadas principalmente à maturidade fisiológica no momento da colheita e às condições ambientais do local das plantas matrizes, haja vista que as sementes de todas as árvores foram colhidas na mesma época e submetidas ao mesmo tipo de manuseio. Os níveis de qualidade de sementes colhidas de diferentes árvores podem variar em função do seu histórico, desde a maturação fisiológica até o armazenamento, incluindo-se as condições às quais as sementes são expostas em campo, antes e durante a colheita, e aos métodos de colheita, secagem e beneficiamento (Popinigis, 1985; Almeida et al., 2007).

As sementes dos lotes I e II apresentaram rápida absorção de água nas primeiras 24 horas, caracterizando a fase I de embebição, com entrada de água em função da diferença de potencial hídrico entre as sementes e o substrato, independente do estado fisiológico do lote (Figura 1). Em seguida, a velocidade de absorção de água se tornou mais lenta e as sementes alcançaram ganho de peso de aproximadamente 100% em relação ao conteúdo inicial de água. Comparando-se o peso inicial das sementes de ambos os lotes com os respectivos ganhos percentuais de água durante a embebição, percebe-se que a fase II de absorção de água foi alcançada quando as sementes atingiram níveis de hidratação em torno de 20% de umidade.

No lote I, a protrusão da radícula em 50% das sementes ocorreu no intervalo de análise, com germinação em aproximadamente 216 horas após o início da embebição, enquanto as sementes pertencentes ao lote II não alcançaram essa porcentagem no período estudado, atingindo em torno de 30% de germinação. A umidade adequada para permitir o início da fase III e, conseqüentemente, a finalização da germinação foi cerca de 35% para o lote I. Este grau mínimo de umidade é variável entre as espécies e depende da composição química das sementes e da permeabilidade do tegumento (Borges e Rena, 1993; Carvalho e Nakagawa, 2000). Sementes de *Parkia multijuga* apresentaram germinação quando o conteúdo de umidade ultrapassou 60% (Calvi et al., 2008), enquanto em estudos com sementes de *Caesalpinia pyramidalis* verificou-se que a fase III somente foi iniciada quando o conteúdo de água das sementes era de aproximadamente 45% (Dantas et al., 2008a).

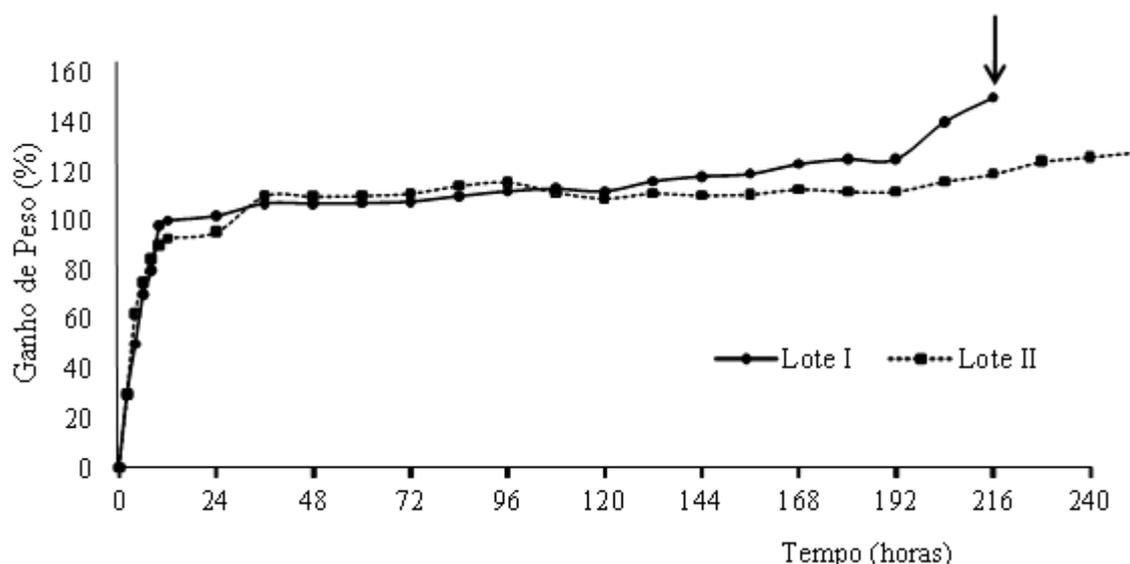


Figura 1. Curva de embebição de água das sementes de *Dalbergia nigra* pertencentes aos lotes I e II. A seta indica o início da fase III (emissão da radícula).

Com relação às mudanças na composição orgânica dos metabólitos primários, verificou-se que as porcentagens de lipídios não variaram significativamente durante o período de hidratação das sementes em ambos os lotes e nas temperaturas de hidratação avaliadas (Figura 2). Comparando-se os lotes I e II, foram observados valores ligeiramente superiores na porcentagem de lipídios nas sementes quiescentes do lote I, que apresentaram média de 25,2%, enquanto para o lote II a média foi de 23,9%, indicando que o lote de qualidade superior possui maior quantidade de reservas lipídicas, para contribuir como fornecimento energético durante as etapas de crescimento e desenvolvimento do embrião, podendo ter reflexos no estabelecimento

inicial das plântulas. Dentro de cada lote, foi observado comportamento similar nos teores de lipídios entre as temperaturas 15 e 25°C, de forma que tais temperaturas não influenciaram a mobilização de lipídios nos níveis de hidratação avaliados. Como nestes níveis de hidratação ainda não ocorreu a protrusão da raiz, a mobilização de lipídios nas sementes de *D. nigra* dos lotes I e II não ocorreu de forma expressiva, mantendo níveis estáveis.

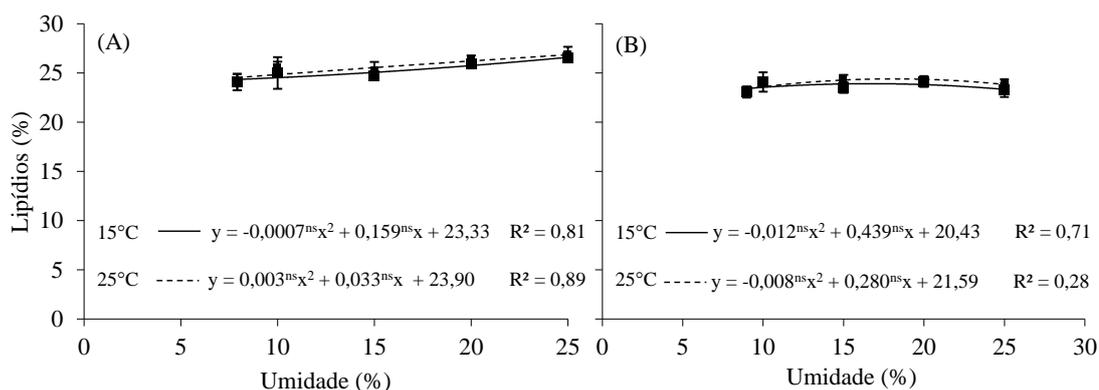


Figura 2. Concentração de lipídios (%) em sementes dos lotes I (A) e II (B) de *Dalbergia nigra* em diferentes níveis de hidratação (10, 15, 20 e 25% de umidade), hidratadas nas temperaturas de 15 e 25°C. * Valor significativo a 5% e ns valor não-significativo a 5%, pelo teste t.

Os lipídios são fontes de energia de relativa estabilidade, e funcionam como uma reserva importante na economia energética da célula (Campbell e Farrel, 2006), de modo que, sua hidrólise após a emergência da radícula é atribuída à relação fonte-dreno nas sementes, entre os cotilédones como órgãos de armazenamento e o eixo como dreno das reservas durante o início do crescimento e desenvolvimento das plântulas (Davies e Slack, 1981). Complementarmente, a atividade das lipases, enzimas responsáveis pela hidrólise dos triglicerídeos, aumenta rapidamente no período pós-germinativo, relacionadas à mobilização de lipídios nesta etapa (Abigor et al., 2002, Polizelli et al., 2008; Barros et al., 2010). Outro aspecto relevante que tem sido confirmado na literatura é que as reservas lipídicas representam a principal fonte até que a plântula se torne autotrófica (Voigt et al., 2009; Yang et al., 2009).

Os lipídios são acumulados nas sementes sob a forma de triglicerídeos, os quais são degradados em glicerol e ácidos graxos, que serão utilizados na síntese de sacarose, para fornecer energia e esqueletos de carbono para o crescimento da plântula em formação (Borges e Rena, 1993; Buckeridge et al., 2004). O teor de lipídios no

endosperma de sementes de *Jatropha curcas* também se manteve estável na fase de germinação, apresentando mudanças significativas apenas no período pós-germinativo, onde quase todo o óleo presente foi consumido após 96 horas de embebição (Yang et al., 2009). Em sementes de *Pangium edule*, o teor de lipídios decresceu de 46 para 18,5% durante a germinação, com degradação mais rápida após a emergência do hipocótilo (Andarwulan et al., 1999). De maneira semelhante, decréscimos significativos no conteúdo de lipídios foram verificados em cotilédones de sementes de *Dalbergia misculobium* apenas no último estágio avaliado, quando o eixo hipocótilo-radícula apresentava entre 20 a 50 mm (Silva et al., 1998).

Em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* foi observado decréscimo acentuado das reservas lipídicas até o vigésimo dia após a sementeira, mostrando consumo intenso dessa reserva pelas sementes, o que permite sugerir o envolvimento direto dos lipídios no suprimento energético para a germinação e estabelecimento das plântulas (Corte et al., 2006). No endosperma de sementes de *Avena sativa*, a mobilização de lipídios iniciou-se no segundo dia após a germinação, de forma que aos 10 dias havia apenas 20% do conteúdo inicial da reserva nas sementes (Leonova et al., 2010).

Os teores de carboidratos solúveis dos lotes I e II de sementes de *Dalbergia nigra* apresentaram comportamento semelhante nas duas temperaturas de hidratação, com aumento gradual até o nível de hidratação de 15% e tendência de decréscimo nas porcentagens de 20 e 25% de umidade (Figura 3). O aumento inicial de açúcares nos cotilédones pode ser acúmulo de sacarose provindas dos oligossacarídeos, os quais liberam moléculas que não são prontamente mobilizadas e, portanto, se acumulam, como observado em sementes de *Pisum sativum* (Monerri et al., 1986). Em cotilédones de sementes de *Vicia Faba* foram constatados aumentos nos teores de sacarose até o segundo dia após o início da embebição, decrescendo significativamente a partir deste, até o sétimo dia (Goyoaga et al., 2011).

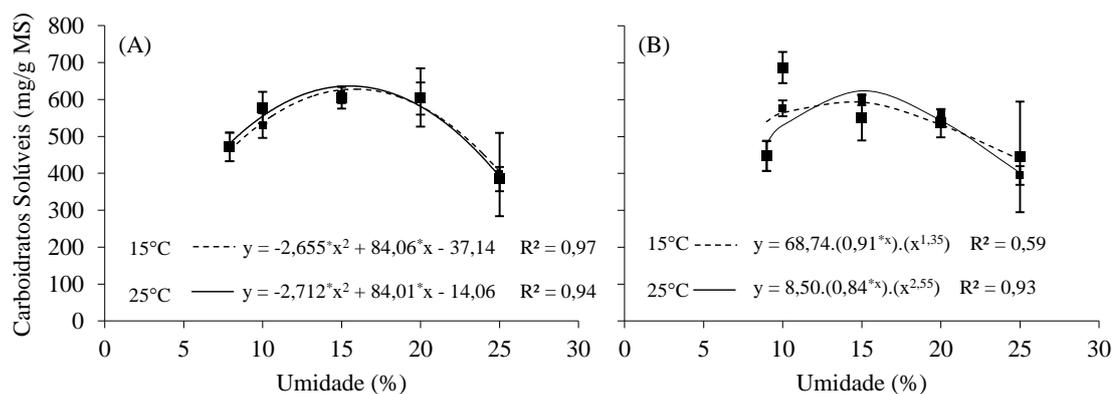


Figura 3. Concentração de carboidratos solúveis (mg/g MS) em sementes dos lotes I (A) e II (B) de *Dalbergia nigra* em diferentes níveis de hidratação (10, 15, 20 e 25% de umidade), hidratadas nas temperaturas de 15 e 25°C. * Valor significativo a 5% e ns valor não-significativo a 5%, pelo teste t.

As diminuições significativas nos conteúdos de açúcares solúveis a partir de 15% de umidade nos lotes I e II sugerem que estas reservas estariam sendo utilizadas durante o processo da germinação, servindo como fonte de energia, substrato para a respiração, para formação de paredes celulares e protoplasma (Buckeridge et al., 2004). Dessa forma, a absorção de água pelas sementes estimula o metabolismo, ativando enzimas preexistentes utilizadas na digestão hidrolítica das substâncias de reserva armazenadas na semente, as quais fornecem nutrientes para o embrião e crescimento das plântulas (Borges e Rena, 1993; Sana et al., 2009).

Os açúcares sacarose, maltose, estaquiose e rafinose atuam como substratos iniciais no processo de germinação, sendo os primeiros a serem utilizados como substratos de respiração após iniciada a hidratação das sementes (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989). A utilização de açúcares para a respiração foi evidenciada durante a germinação de sementes de *Schizolobium parahyba*, com nítida redução durante a fase inicial da embebição e posterior estabilização nos cotilédones entre o 2º e 8º dias (Magalhães et al., 2010). Durante a germinação de sementes de *Vicia Faba*, os níveis dos oligossacarídeos da série rafínosica (rafinose, estaquiose e verbascose) reduziram drasticamente em dois dias após o início da embebição, com cerca de 10% dos teores iniciais no terceiro dia (Goyoaga et al., 2011). Em sementes de *Euphorbia heterophylla*, o conteúdo de açúcares do endosperma permaneceu constante até 72 h após o início da embebição, declinando posteriormente, enquanto os teores no embrião aumentaram a partir de 36 h de embebição (Suda e Giorgini, 2000). Em estudo sobre mobilização de reservas em sementes de *Aniba rosaeodora* verificou-se que 30% dos açúcares solúveis

reduzidos no estágio em que a radícula apresentava comprimento de 2-5 cm, sendo essa mobilização associada à formação da primeira folha (Lima et al., 2008). Os teores de açúcares solúveis também diminuíram durante a embebição de sementes de *Senna macranthera* (Borges et al., 2002), *Apuleia leiocarpa* (Pontes et al., 2002) e *Caesalpinia peltophoroides* (Corte et al., 2006), indicando a mobilização de carboidratos para o desenvolvimento do processo germinativo.

As reservas armazenadas na forma de amido em sementes de *Dalbergia nigra* apresentaram variação significativa durante a hidratação às temperaturas de 15 e 25°C, para os lotes I e II (Figura 4). Os maiores valores de amido foram observados em 15% de umidade nas sementes, com tendência de decréscimo a partir deste, para ambos os lotes. Dessa forma, a partir da reativação do metabolismo com os níveis de hidratação 20 e 25%, o amido começa a ser mobilizado, ainda que com pequeno consumo. Os teores de amido nas sementes quiescentes dos lotes I e II de *D. nigra* foram de 114,5 e 121,5 mg/g MS, os quais são baixos em relação aos teores de açúcares solúveis nos dois lotes (471,2 e 447,6 mg/g MS, respectivamente), sendo, portanto, bastante provável que este não seja o principal carboidrato de reserva desta espécie, semelhante ao observado nas espécies leguminosas arbóreas *Dalbergia miscolobium*, *Caesalpinia peltophoroides* e *Caesalpinia pyramidalis* (Silva et al., 1998, Corte et al., 2006; Dantas et al., 2008a).

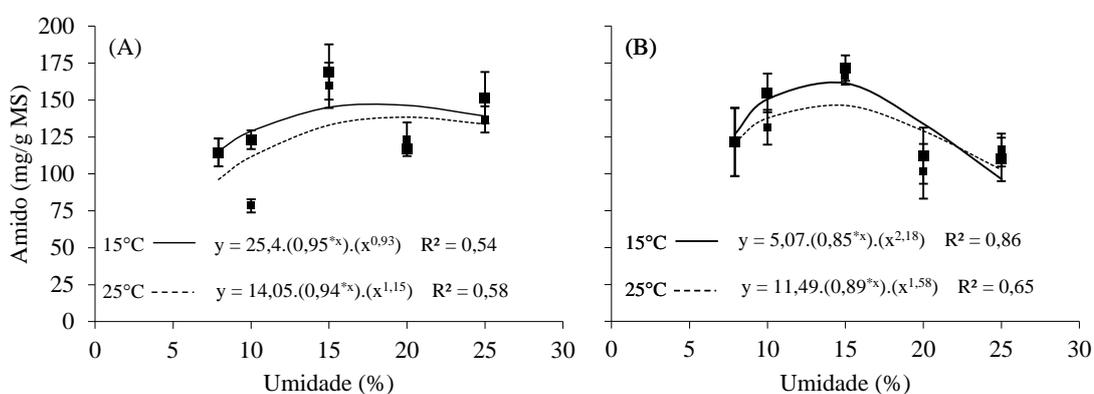


Figura 4. Concentração de amido (mg/g MS) em sementes dos lotes I (A) e II (B) de *Dalbergia nigra* em diferentes níveis de hidratação (10, 15, 20 e 25% de umidade), hidratadas nas temperaturas de 15 e 25°C. * Valor significativo a 5% e ns valor não-significativo a 5%, pelo teste t.

Durante o processo germinativo, os grânulos de amido são desmembrados em estruturas menores, como a maltose e a glicose, fornecendo sacarose e ATP às células, através da atuação das enzimas α -amilase, β -amilase e amido fosforilase (Yamasaki,

2003; Buckeridge et al., 2004). As menores taxas de mobilização do amido em relação aos açúcares solúveis podem ser devidas ao fato de que os açúcares solúveis são as primeiras reservas a serem utilizadas após a embebição (Ziegler, 1995). Com o fornecimento desses açúcares para a respiração durante o período germinativo das sementes (Tonini et al., 2010a), a hidrólise do amido em açúcares menores será realizada posteriormente, para fornecer energia e auxiliar na formação de estruturas da nova plântula. Neste contexto, verificou-se que as presenças de açúcares como sacarose e manitol inibem a mobilização de amido dos cotilédones para o eixo embrionário, resultando em diminuição da formação de glicose produto hidrólise do amido (Kaur et al., 2005).

Concentrações relativamente baixas nas reservas de amido foram encontradas em sementes de *Schinopsis brasiliensis*, com pequeno consumo após a fase II de absorção de água durante o período germinativo (Dantas et al, 2008b). Em *Caesalpinia peltophoroides*, o conteúdo de amido apresentou pequeno decréscimo durante o período germinativo e de crescimento das plântulas (Corte et al., 2006). Em sementes de *Euterpe edulis*, coletadas de plantas crescendo na várzea e em terra firme na Amazônia, observou-se diminuição em torno de 40% das reservas de amido nas sementes de terra firme, mas não houve diferença nos níveis desta reserva para sementes coletadas na área inundada (Gonçalves et al., 2010). Em cotilédones de sementes de *Phaseolus vulgaris* foram observados decréscimos na concentração de amido desde o início da embebição, associados a um aumento da atividade da enzima α -amilase (Sfaxi-Bousbih et al., 2010).

Os teores de proteínas solúveis nos cotilédones de sementes de *D. nigra* decresceram gradativamente em todo o período de hidratação, para os dois lotes avaliados (Figura 5). Entre as temperaturas 15 e 25°C foram observadas tendências semelhantes de mobilização das proteínas, dentro de cada lote. As sementes quiescentes apresentaram teores de proteínas solúveis de 11,04 e 10,85 mg/g MS para os lotes I e II, respectivamente. Após a hidratação até o nível de 25% de umidade, estes teores iniciais decresceram para valores médios de 7,35mg/g MS para o lote I e 7,70 mg/g MS para o lote II. Henning et al. (2010) observaram que sementes de *Glycine max* mais vigorosas possuíam maiores quantidades de proteínas solúveis quando comparadas às sementes de menor vigor, porém com variação máxima de 4 μ g/g de matéria seca entre os lotes de diferentes qualidades fisiológicas.

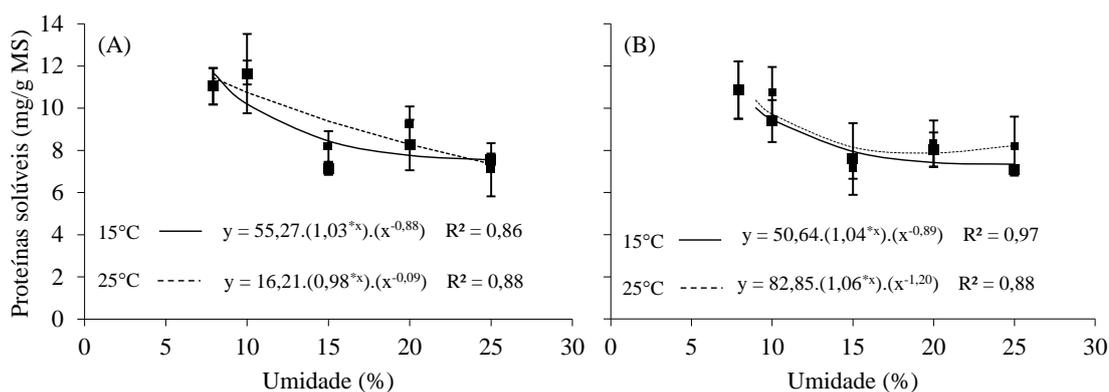


Figura 5. Concentração de proteínas solúveis (mg/g MS) em sementes dos lotes I (A) e II (B) de *Dalbergia nigra* em diferentes níveis de hidratação (10, 15, 20 e 25% de umidade), hidratadas nas temperaturas de 15 e 25°C. * Valor significativo a 5% e ns valor não-significativo a 5%, pelo teste t.

As variações encontradas nos teores de proteínas durante a hidratação das sementes de *D. nigra* indicam que estas moléculas estão sendo hidrolisadas, gerando seus aminoácidos constituintes, os quais serão utilizados para síntese de novas proteínas e enzimas ou para fornecer energia pela oxidação do esqueleto de carbono após a desaminação (Buckeridge et al., 2004). A mobilização de proteínas é necessária para atender à demanda de aminoácidos durante os estágios iniciais da germinação, sendo o nitrogênio o primeiro nutriente mineral a ser utilizado pelas sementes (Soriano et al., 2011). Ao longo do processo germinativo, o desenvolvimento do eixo embrionário e a síntese de novas proteínas também dependem do adequado fornecimento de aminoácidos derivados da quebra das proteínas de reserva (Bewley e Black, 1994; Kim et al., 2011).

As proteínas apresentam-se como os principais componentes químicos das sementes responsáveis pela embebição e aumento de tamanho, seguidos da celulose e substâncias pécicas, enquanto o amido e os lipídios apresentam interferência reduzida no processo (Copeland e McDonald, 1995). Em sementes de *Araucaria bidwillii*, a quantificação das proteínas indicou uma distribuição igual entre proteínas solúveis e insolúveis em sementes secas, de forma que durante a germinação as proteínas foram degradadas desde o início da embebição, com as proteínas solúveis apresentando decréscimo mais lento que as insolúveis (Capocchi et al., 2011). Os níveis de proteínas decresceram durante as primeiras 48 horas de embebição em cotilédones de *Prosopis juliflora*, sendo utilizadas na ativação de enzimas necessárias ao rompimento do tegumento durante a protrusão da radícula (Gallão et al., 2007). Enquanto o conteúdo de

proteínas solúveis decresceu, ocorreu aumento nos teores de aminoácidos livres em cotilédones de *Vicia faba* durante período de sete dias após o início da embebição (Kirmizi e Güleriyüz, 2006). Em diferentes cultivares de *Linum sitatissimum* foi observado decréscimo regular e significativo no conteúdo de proteínas total durante todo o tempo de avaliação das sementes em condições normais e sob estresse salino (Sebei et al., 2007). Em sementes de *Sesbania virgata*, o conteúdo protéico na testa e no endosperma das sementes decresceu a partir do terceiro dia após início da embebição (Tonini et al., 2010b), da mesma forma que em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Corte et al., 2006).

CONCLUSÕES

A combinação do vigor dos lotes de sementes de *Dalbergia nigra* com a hidratação gradual e o fator temperatura apresentou maiores evidências de efeito sobre as alterações das reservas orgânicas para os teores proteicos, que exibiram tendência gradativa de queda, desde a testemunha até o nível de 25% de umidade. Dessa forma, o metabolismo das proteínas pode estar controlando (inibindo) via limitação da síntese enzimática o metabolismo dos lipídios, que apresentaram pequena variação durante a hidratação das sementes. Os conteúdos de carboidratos solúveis e amido decresceram a partir do nível de hidratação de 15%, sugerindo mobilização durante a absorção de água pelas sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIGOR, R. D.; UADIA, P. O.; FOGLIA, T. A.; HAAS, M. J.; SCOTT, K.; SAVARY, B. J. Partial Purification and Properties of Lipase from Germinating Seeds of *Jatropha curcas* L. **JAOCS**, v. 79, n. 11, p. 1123-1126, 2002.

ALMEIDA, F. A. C.; ALVES, N. M. C.; GOMES, J. P.; SILVA, D. R. S. Determinação do teor de umidade limite de sementes de endro (*Anethum graveolens*) para criopreservação. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, p. 153-159, 2007.

ALVARADO, V.; BRADFORD, J. K. A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 9, p. 1061-1071, 2002.

ANDARWULAN, N.; FARDIAZ, D.; WATTIMENA, G. A.; SHETTY, K. Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of *Pangium edule* Reinw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3158-3163, 1999.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 01, p. 15-29, 2010.

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

BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; SOARES, C. P. B.; PEREZ, S. C. J. G. Crescimento e mobilização de carboidrato em embrião de sementes de fedegoso (*Senna macranthera* Irwin et Barneby) durante a germinação. **Revista Cerne**, v. 8, n. 1, p. 69-76, 2002.

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.

BORGES, E.E. L.; SILVA, L. F.; BORGES, R. C. G. Avaliação do osmocondicionamento na germinação de sementes de quaresminha (*Miconia condolleana* Trian). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 90-94, 1994.

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.

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, 2004. 324 p.

CALVI, G. O.; AUDD, F. F.; VIEIRA, G.; FERRAZ, I. D. K. Tratamentos de pré-embrição para aumento do desempenho da germinação de sementes de *Parkia multijuga* Benth. **Revista Forestal Latinoamericana**, v. 23, n. 2, p. 53-65. 2008.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Thomson, 2006. 845 p.

CAPOCCHI, A. MUCCILLI, V.; CASANI, S.; FOTI, S.; GALLESCHI, L.; FONTANINI, D. Proteolytic enzymes in storage protein mobilization and cell death of the megagametophyte of *Araucaria bidwillii* Hook. post-germinated seeds. **Planta**, v. 233, p. 817-830, 2011.

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

COPELAND, L. O.; McDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology**. 3. ed. New York: Chapman e Hall, 1995. 409p.

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.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **The design of seed storage facilities for genetic conservation**. Rome: International Board of Plant Genetic Resources, 1990. 109p.

DANTAS, B. F.; CORREIA, J. S.; MARINHO, L. B.; ARAGÃO, C. A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p.221-227, 2008a.

DANTAS, B. F.; SOARES, F. S. J.; LÚCIO, A. A.; ARAGÃO, C. A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 214-219, 2008b.

DAVIES, H. V.; SLACK, P. T. The control of food mobilization in seeds of dicotyledonous plants. **New Phytologist**, v. 88, p. 41-51, 1981.

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.

GALLÃO, M. I.; VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. O.; SOUZA, A. S. N.; BRITO, E. S. Reserve mobilisation in mesquite (*Prosopis juliflora*) seed (Leguminosae). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 2012-2018, 2007.

GONÇALVES, J. F. C.; LIMA, R. B. S.; FERNANDES, A. V.; BORGES, E. E. L.; BUCKERIDGE, M. S. Physiological and biochemical characterization of the assai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) during seed germination and seedling growth under aerobic and anaerobic conditions. **Revista Árvore**, v. 34, n. 6, p. 1045-1053, 2010.

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.

HENNING, F. A.; MERTZ, L. M.; JACOB JUNIOR, A.; MACHADO, R. D.; FISS, G.; ZIMMER, P. D. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 727-734, 2010.

IBAMA – **Lista Oficial de Flora ameaçada de extinção** – acesso em 02/05/2010. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/flora>.

KAUR, N.; KAUR, H.; GUPTA, A. K. Effect of exogenous sucrose on the enzymes of starch degradation and sucrose metabolism in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) seedlings. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 42, p. 295-300, 2005.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KIM, H. T.; CHOI, U. K.; RYU, H. S.; LEE, S. J.; KWON, O. S. Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1814, p. 1178-1187, 2011.

KIRMIZI, S.; GULERYUZ, G. Protein mobilization and proteolytic enzyme activities during seed germination of broad bean (*Vicia faba*L.). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 61, p. 222-226, 2006.

LEONOVA, S.; GRIMBERG, A.; MARTTILA, S.; STYMNE, S.; CARLSSON, A. S. Mobilization of lipid reserves during germination of oat (*Avena sativa* L.), a cereal rich in endosperm oil. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 11, p. 3089-3099, 2010.

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.

LONG, R. L.; WILKLIAMS, K.; GRIFFITHS, E. M.; FLEMATTI, G. R.; MERRITT, D. J.; STEVENS, J. C.; TURNER, S. R.; POWLES, S. B.; DIXON, K. W. Prior hydration of *Brassica tournefortii* seeds reduces the stimulatory effect of karrikinolide on germination and increases seed sensitivity to abscisic acid. **Annals of Botany**, v. 105, p. 1063-1070, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

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.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 2. ed. Oxford: Pergamon Press Ltda., 1975. 192p.

MONERRI, C.; GARCIA-LUIS, A.; GUARDIOLA, J. L. Sugar and starch changes in pea cotyledons during germination. **Physiologia Plantarum**, v. 67, p. 49-54, 1986.

NONOGAKI, H.; CHEN, F.; BRADFORD, K. J. Mechanisms and genes involved in germination *sensu stricto*. In: BRADFORD, K. J.; NONOGAKI, H. **Seed development, dormancy and germination**. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 264-304.

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

POLIZELLI, P. P.; FACCHINI, F. D. A.; CABRAL, H.; BONILLA-RODRIGUES, G. O. A new lipase isolated from oleaginous seeds from *Pachira aquatica* (Bombacaceae). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, p. 233-242, 2008.

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.

POPINIGIS, F. 1985. **Fisiologia de sementes**. 2a ed. Brasília, 289p.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Editora da USP, 1972. 294 p.

SANA, N. K.; SARKAR, B. C.; AZAD, M. A. K.; HUQUE, M. E.; SHAHA, R. K. Enzyme activities and mobilization of nutrients in brassica (*Brassica* spp.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds during germination. **Journal of Biosciences**, v. 17, p. 101-106, 2009.

SEBEI, K.; DEBEZ, A.; HERCHI, W.; BOUKHCHINA, S.; KALLEL, H. Germination kinetics and seed reserve mobilization in two flax (*Linum itatissimum* L.) cultivars under moderate salt stress. **Journal of Plant Biology**, v. 50, n. 4, p. 447-454, 2007.

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.

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 Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 2, p. 119-124, 1998.

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

SORIANO, D.; OROZCO-SEGOVIA, A.; MARQUEZ-GUZMA, J.; KITAJIMA, K.; BUEN, A. G.; HUANTE, P. Seed reserve composition in 19 tree species of a tropical deciduous forest in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. **Annals of Botany**, v. 107, p. 939-951, 2011.

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

SUDA, C. N. K.; GIORGINI, J. F.; Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 3, p. 226-245, 2000.

TONINI, P. P.; PURGATTO, E.; BUCKERIDGE, M. S. Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae). **Annals of Botany**, v. 106, p. 607-616, 2010a.

TONINI, P. P.; CARRARA, T. B.; BUCKERIDGE, M. S. Storage proteins and cell wall mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). **Trees**, v. 24, p. 675-684, 2010b.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, v. 99, n. 4, p. 450-456, 2010.

VOIGT, R. A.; CHAGAS, R. M.; PONTE, L. F. A.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Source–sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 80-89, 2009.

WANG, J.; LI, Y.; LO, S. W.; HILLMER, S.; SUN, S. S. M.; ROBINSON, D. G.; JIANG, L. Protein mobilization in germinating mung bean seeds involves vacuolar sorting receptors and multivesicular bodies. **Plant Physiology**, v. 143, p. 1628-1639, 2007.

YAMASAKI, Y. β -Amylase in germinating millet seeds. **Phytochemistry**, v. 64, p. 935-939, 2003.

YANG, M. F.; LIU, Y. J.; LIU, Y.; CHEN, H.; CHEN, F.; SHEN, S. Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and postgermination development of *Jatropha curcas*. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 1441-1451, 2009.

ZIEGLER, P. Carbohydrate degradation during germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Eds.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.447-474.

CAPÍTULO III

ATIVIDADES DE α -GALACTOSIDASE, β -MANANASE E POLIGALACTURONASE DURANTE A HIDRATAÇÃO DE SEMENTES DE *Dalbergia nigra* ((VELL.) FR. ALL. ex BENTH.)

RESUMO

A germinação é um processo que se inicia com a embebição das sementes, estimulando a síntese de enzimas ou a ativação daquelas pré-existentes. O objetivo deste trabalho foi estudar as variações nas reservas de monossacarídeos e nas atividades das enzimas α -galactosidase, β -mananase e poligalacturonase durante a hidratação de sementes de dois lotes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*). Para tanto, sementes coletadas em matrizes de duas diferentes procedências constituíram os lotes I e II, os quais foram colocados para hidratar em dessecadores com 95-99% de umidade relativa (UR) nas temperaturas de 15 e 25°C até atingirem os níveis de hidratação de 10, 15, 20 e 25% de umidade nas sementes. Os teores de monossacarídeos foram analisados nos cotilédones, enquanto as atividades das enzimas foram avaliadas nos cotilédones e nos eixos embrionários das sementes. Os lotes I e II foram classificados como de alto e baixo vigor, respectivamente. Os teores de ramnose e xilose apresentaram valores superiores na testemunha, com redução durante a hidratação até 15%, momento a partir do qual aumentaram novamente, em ambos os lotes. Amplas diferenças foram observadas nos conteúdos de glicose entre os lotes I e II, de forma que o lote I, de qualidade superior, possui maior síntese e degradação desse açúcar durante a hidratação das sementes. A enzima α -galactosidase mostrou ser pré-formada e possuiu maior atividade inicialmente no embrião, gerando substrato para a respiração e formação de estruturas de carbono para o crescimento. As atividades das enzimas β -mananase e poligalacturonase aumentaram com a embebição das sementes nos cotilédones, alcançando maiores valores que no eixo embrionário.

Palavras-chave: monossacarídeos, embebição, jacarandá-da-bahia.

CHAPTER III

ACTIVITIES OF α -GALACTOSIDASE, β -MANNANASE AND POLYGALACTURONASE DURING HYDRATION OF *Dalbergia nigra* ((Vell.) FR. ALL. Ex Benth.) SEEDS

ABSTRACT

Germination is a process that begins with soaking seeds, stimulating the synthesis of enzymes or activation of those pre-existing. The objective of this work was to study variations in reserves of monosaccharides and activities of the enzymes α -galactosidase, β -mannanase and polygalacturonase during hydration of seeds of two lots of jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*). To this end, seeds collected in arrays of two different origins were the lots I and II, which were placed in desiccators to hydrate with 95-99% relative humidity (RH) at temperatures of 15 and 25 ° C to reach levels hydration of 10, 15, 20 and 25%. The amounts of monosaccharides were analyzed in the cotyledons, while the activities of enzymes were assessed in cotyledons and embryonic axis of seeds. Lots I and II were classified as high and low vigor, respectively. The levels of rhamnose and xylose showed high values in the control and reduction during hydration up to 15%, from which time increased again in both lots. Large differences were observed in glucose content between the two lots, so that the lot I, with higher quality, showed higher synthesis and degradation of sugar during the hydration of seeds. The enzyme α -galactosidase is preformed and has greater activity initially in the embryo, generating substrate for respiration and formation of carbon structures for growth. The activities of enzymes β -mannanase and polygalacturonase increased with seed imbibition in cotyledons, reaching higher values than the embryonic axis.

Palavras-chave: monossacarídeos, imbibição, jacarandá-da-bahia.

INTRODUÇÃO

O processo de germinação é um complexo e ordenado conjunto de eventos fisiológicos e bioquímicos que se inicia com a retomada do crescimento pelo embrião, com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula (Nonogaki et al., 2007). A germinação é influenciada por fatores externos como luz, temperatura, disponibilidade de água e de oxigênio, assim como por fatores internos, como inibidores e promotores da germinação, que podem atuar por si só ou em interação com os demais. (Borges e Rena, 1993)

Para que ocorra a germinação, é necessária a hidratação das sementes, onde a entrada de água coincide com um aumento na atividade metabólica, estimulando a síntese de enzimas ou a ativação daquelas pré-existentes, resultando na mobilização de reservas e na digestão da parede celular, enfraquecendo-a e permitindo que a raiz rompa o tegumento (Baskin e Baskin, 1998). Durante o processo germinativo, diversas enzimas estão envolvidas em reações metabólicas de síntese e degradação de moléculas.

As enzimas hidrolíticas α -galactosidase e β -mananase atuam na mobilização de polissacarídeos constituintes de paredes celulares e nos oligossacarídeos da série rafínosica, sendo seus produtos de degradação usados para diferentes propósitos, tais como a geração de energia e a produção de matéria prima na germinação (Buckeridge et al., 2004). A atividade da enzima α -galactosidase aumentou durante a germinação de sementes de *Tachigali multijuga*, sendo relacionada à capacidade de hidrolisar oligossacarídeos como rafinose, estaquiose e polímeros de galactomanano, indicando papel especial durante a germinação (Fialho et al., 2008). Segundo Polowick et al. (2009), após superexpressão do gene de α -galactosidase em sementes de *Pisum sativum*, as linhagens demonstraram reduções significativas no conteúdo de oligossacarídeos, especificamente rafinose e estaquiose, e apresentaram taxas de germinação de 96%. Em sementes de *Coffea arabica*, a redução da resistência mecânica imposta pelo tegumento ao alongamento da radícula e conseqüente germinação, é controlada pela ação de enzimas específicas, como a β -mananase (Silva et al., 2004).

Dentre as enzimas que atuam no processo de degradação das substâncias pécnicas da parede celular, as poligalacturonases (PG) são consideradas as principais, por hidrolisarem as ligações α -1,4 glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico da cadeia de pectina (Mutlu et al., 1999). Sua atividade é correlacionada ao aumento de pectinas solúveis e amaciamento durante o amadurecimento de frutos (Ahrens e Huber, 1990). Em sementes, têm sido indicado o papel da enzima

poligalacturonase na degradação de pectinas durante a germinação, de forma a permitir o amolecimento do tegumento para a protrusão da radícula (Sitrit et al., 1999; Pontes, 2008).

Dalbergia nigra, conhecida popularmente como jacarandá-da-bahia, é uma espécie arbórea semi heliófita de ocorrência na Floresta Atlântica, e pertence à família Leguminosae Papilonoidea (Lorenzi, 1992). Em relação ao grupo sucessional, a espécie apresenta-se como secundária tardia a clímax, sendo considerada adequada para plantios mistos em terrenos degradados de preservação permanente (Donadio e Demattê, 2000). Possui a madeira moderadamente dura, pesada, decorativa e de longa durabilidade natural, podendo ser utilizada para confecção de instrumentos musicais, como o piano (Carvalho, 1994). Devido à valorização de sua madeira e à ampla exploração, a espécie encontra-se atualmente na lista brasileira de espécies ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (Ibama, 2008), sendo fundamental a elaboração de planos para sua conservação genética.

Considerando-se a importância da espécie nos aspectos ecológicos e econômicos e a necessidade de melhor entendimento dos fatores envolvidos na germinação de suas sementes, este trabalho teve como objetivo estudar as variações nas reservas de monossacarídeos e nas atividades das enzimas α -galactosidase, β -mananase e poligalacturonase durante a hidratação de dois lotes de sementes de *Dalbergia nigra*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas sementes colhidas em duas procedências de *Dalbergia nigra* na região de Viçosa, Minas Gerais, as quais constituíram os lotes I e II. 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 por dois meses.

Sementes pertencentes aos dois lotes foram colocadas para germinar sobre duas folhas de papel germitest em placas de petri umedecidas com 4,0 mL de água destilada, a 25°C, sob luz contínua proporcionada por quatro lâmpadas 40W tipo luz do dia, por 12 dias. O reumedecimento dos substratos foi feito sempre que se julgou necessário. A porcentagem de germinação foi calculada pela contagem diária das sementes que emitiram radícula e o índice de velocidade de germinação (IVG) pela fórmula proposta por Maguire (1962).

Para a hidratação, amostras de sementes dos lotes I e II foram mantidas em dessecadores com umidades relativas de 95-99%, nas temperaturas de 15 e 25°C, até atingirem aproximadamente quatro níveis de umidade nas sementes: 10, 15, 20 e 25%. A hidratação das sementes até a quantidade de água desejada foi calculada a partir do teor de água inicial de 7,92 e 8,98% para os lotes I e II, respectivamente, e de estabelecida a massa inicial das amostras de sementes, conforme a expressão abaixo (Cromarty et al., 1990):

$$M = \frac{(100 - CA_1) \times Mi}{(100 - CA_2)}$$

Onde: M = massa no conteúdo de água desejada (g); Mi = massa no conteúdo de água original (g); CA₁ = conteúdo de água original (porcentagem em base úmida); CA₂ = conteúdo de água desejado (porcentagem em base úmida)

. Os teores de água originais das sementes dos lotes foram determinados pelo método da estufa 105 ± 3°C (Brasil, 2009). Após atingirem os níveis de umidade desejados, correspondentes às fases I e II da germinação, as amostras foram retiradas para análise dos monossacarídeos e atividades enzimáticas.

Análise dos monossacarídeos

A extração dos monossacarídeos dos cotilédones foi feita conforme metodologia descrita por Black et al. (1996), com modificações: o material seco e moído foi homogeneizado com etanol 80% a 75°C, por 30 minutos, após o qual foi centrifugado por 10 minutos a 16000 xg. O sobrenadante contendo os açúcares foi separado e esta etapa de extração foi repetida por mais quatro vezes, pela homogeneização do precipitado com etanol 80%. Os sobrenadantes foram misturados, secados totalmente e ressuspendidos em 1,0 mL de água destilada. Em seguida, retirou-se alíquotas de 500 µL das amostras para preparo dos alditóis acetatos, que foram utilizados na análise dos monossacarídeos por cromatografia gasosa. Uma mistura contendo os açúcares glicose, galactose, manose, xilose, arabinose e ramnose também foi preparada, utilizando-se o mesmo procedimento, as quais serviram de padrões para comparação com a amostra.

A quantificação foi realizada conforme Englyst e Cummings (1984), utilizando-se cromatógrafo a gás Shimadzu GC14-A, equipado com detector de ionização de chama (FID), acoplado a um registrador e integrador C-R6A chromatopac. O fluxo de gás foi de 0,25 mL.min⁻¹, sendo as temperaturas do injetor, do detector e da coluna de 250, 220 e 275°C, respectivamente. Após a injeção dos padrões, foi injetado 1,0 µL de alditol acetato por amostra. Foram realizadas três repetições em cada extração e quantificação. Para a identificação e quantificação dos açúcares, a concentração de cada açúcar com base na área e no tempo de retenção correspondente ao açúcar padrão foi registrada pelo integrador e os resultados impressos em um cromatograma (Rodrigues et al., 2005).

Análise da atividade enzimática

Para as determinações das atividades das enzimas α -galactosidase, β -mananase e poligalacturonase, as sementes foram dissecadas em cotilédones e eixo embrionário. Os extratos enzimáticos foram obtidos pela maceração de 0,1 g de tecido vegetal em 1,5 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, utilizando-se almofariz de porcelana em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 24000 xg durante 20 minutos, a 4°C, e o sobrenadante límpido foi utilizado como fonte das enzimas, conforme descrito por Viana (2002).

Ensaio da enzima α -galactosidase

A atividade da enzima α -galactosidase foi determinada pela adição de 20 µL do extrato enzimático bruto a um meio de reação constituído de 730 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 250 µL de p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (p-NPGal)

2 mM. A reação foi conduzida por 15 minutos em banho-maria a 37°C, sendo interrompida pela adição de 1 mL de solução de carbonato de sódio 0,5 M. A leitura foi feita no comprimento de onda de 410 nm, sendo uma unidade da enzima definida como a quantidade de proteína necessária para produzir um μmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições do ensaio (Viana, 2002). Os valores de absorbância obtidos foram transformados em μmoles de p-nitrofenolato, utilizando uma curva padrão construída com 0-0,20 μmoles de p-nitrofenol (p-NP).

Ensaio da enzima β -mananase

A atividade da enzima β -mananase foi determinada pelo método do 3,5 dinitrossalicílico (DNS), conforme descrito por Miller et al. (1959), utilizando-se 100 μL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 800 μL de solução de goma guar 0,5% e 100 μL do extrato enzimático. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos, e em seguida adicionou-se 1,0 mL da solução DNS, sendo os tubos colocados para ferver por cinco minutos. Em seguida adicionou-se 2,0 mL de água destilada. A leitura foi feita a 540 nm, segundo Benech et al. (2007), sendo uma unidade da enzima calculada como a quantidade de açúcares redutores produzidos por mL por minuto, nas condições acima, sendo utilizada uma curva padrão construída com glicose.

Ensaio da enzima poligalacturonase

Para a atividade da enzima poligalacturonase o ensaio-padrão foi conduzido pela dosagem do açúcar redutor produzido, segundo o método do DNS (3,5 dinitrossalicílico), descrito por Miller (1959). Foi utilizado o ácido poligalacturônico de laranja 0,3% como substrato na avaliação da atividade da enzima. A mistura de reação foi constituída de 1500 μL de tampão de extração, 100 μL de extrato enzimático e 350 μL de substrato. Os tubos contendo a solução foram mantidos em banho-maria a 40°C por 60 minutos, sendo interrompida a reação pela adição de 1,0 mL da solução de DNS e colocado para ferver por cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL de água destilada. A leitura das absorbâncias foi feita no comprimento de onda de 540 nm, sendo uma unidade da enzima definida como a quantidade de proteína necessária para produzir um μmol equivalente de glicose por minuto.

Delineamento experimental e procedimento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), constituindo-se de um fatorial 2x4x2 (dois lotes, quatro níveis de hidratação e duas

temperaturas), com a testemunha como tratamento adicional. Os ensaios para as determinações das atividades enzimáticas foram realizados em triplicata, com três repetições por tratamento. Para as variáveis germinação e IVG foram realizadas análises de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Os teores de monossacarídeos foram analisados por meio de análises de regressão, sendo as significâncias testadas pelo teste t, ao nível de 5%. Foi utilizado o programa Statistica (Statsoft, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de germinação e índice de velocidade de germinação indicam a superioridade da qualidade fisiológica de sementes do lote I em relação ao lote II (Figura 1). O lote I apresentou porcentagem de germinação de 80%, estatisticamente superior ao lote II, que possuía 33% de germinação. Também foi possível verificar que nas sementes do lote I a velocidade de germinação foi superior ao lote II, com médias de IVG de 1,85 e 0,74, respectivamente. Assim, os lotes foram classificados em duas classes de vigor, sendo o lote I como de alto vigor e o lote II como de baixo vigor.

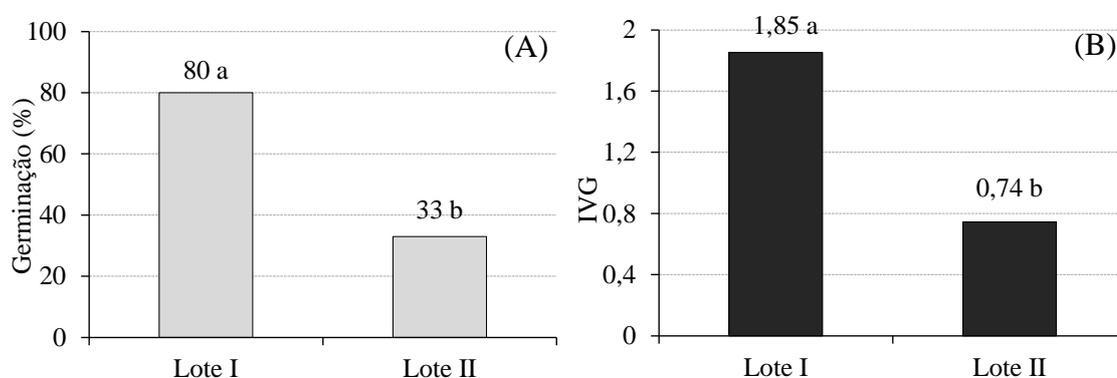


Figura 1. Porcentagem de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (IVG) (B) de sementes de *Dalbergia nigra* pertencentes aos lotes I e II. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, a 5%, pelo Teste Tukey.

A concentração dos monossacarídeos nos cotilédones de sementes de *Dalbergia nigra* foi afetada pelos diferentes níveis de umidade (Figura 2). Nas temperaturas de hidratação analisadas, 15 e 25°C, as curvas de tendência foram semelhantes, dentro de cada lote. Para o lote I, a concentração dos açúcares galactose e glicose aumentou até o nível de hidratação 15%, reduzindo-se após este período. Ramnose e xilose apresentaram comportamentos contrários, com valores superiores na testemunha e redução durante a hidratação até aproximadamente 15%, momento a partir do qual aumentaram novamente. No lote II, considerado de baixo vigor, a concentração dos açúcares galactose, ramnose e xilose foi similar ao lote I, enquanto os níveis de glicose foram diferentes entre os lotes, tanto na quantidade, quanto na tendência. As tendências apresentadas pelos açúcares ramnose e xilose nos lotes I e II em ambas as temperaturas indicam que estes podem estar sendo consumidos no metabolismo ou excretados para o

apoplasto ou para fora da semente até o nível de 20% de umidade, quando então começam a ser sintetizados novamente. Os teores de glicose no lote I atingiram valores em torno de 0,7 e 0,5 mg/g MS nas temperaturas de 15 e 25°C, respectivamente, ao passo que no lote II os valores máximos observados foram 0,2 mg/g MS nas duas temperaturas.

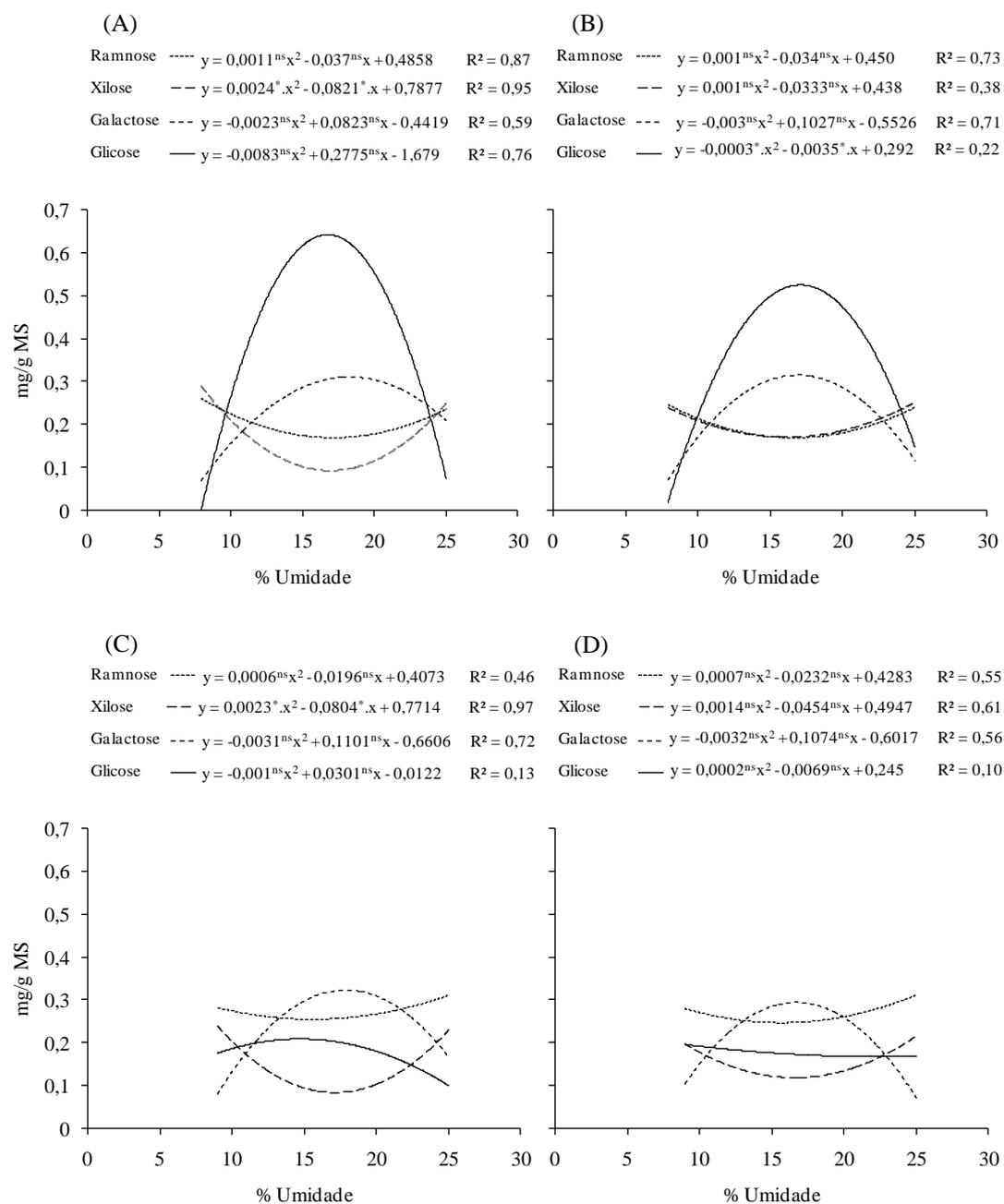


Figura 2. Concentração de monossacarídeos (mg/g de massa seca) em sementes de *Dalbergia nigra*, durante a hidratação nas temperaturas de 15 e 25°C. (A) Lote I - 15°C. (B) Lote I - 25°C. (C) Lote II - 15°C. (D) Lote II - 25°C. * Valor significativo a 5% e ns valor não-significativo a 5%, pelo teste t.

As tendências de aumento nas concentrações dos açúcares glicose e galactose até o nível de 15% de umidade podem estar relacionadas à degradação dos oligossacarídeos da série rafínosica, resultando em acúmulo transitório de ambos nos cotilédones. Os oligossacarídeos da família da rafinose são reservas de utilização rápida, sendo as primeiras a serem mobilizadas pelas plantas e utilizadas como fonte de energia durante a germinação (Buckeridge et al., 2000; Molle e Tiné, 2009). Analisando a mobilização de oligossacarídeos da série rafínosica, foram demonstrados acúmulos de sacarose e monossacarídeos livres durante a germinação de sementes de *Phaseolus aureus* (Kuo et al., 1988) e *Sesbania maginata* (Buckeridge e Dietrich, 1996).

As amplas diferenças observadas para a concentração de glicose entre os lotes de alto e de baixo vigor pode ser um indicador da qualidade fisiológica das sementes. O lote I, contendo sementes de qualidade superior, apresentou maior concentração de glicose. Provavelmente essas sementes apresentaram maior síntese e degradação desse açúcar durante a hidratação, indicando que o fluxo metabólico foi mais intenso e que a glicose pode ser utilizada como substrato para respiração e estrutura física durante o processo germinativo.

Ao comparar genótipos distintos de *Zea mays*, foi observado que os genótipos que possuíam maiores teores endógenos de glicose foram os que apresentaram maior germinação e desenvolvimento inicial das plântulas (Oliveira Júnior et al., 2009). Os autores ressaltaram que a glicose exerce forte influência durante o processo germinativo, reduzindo o efeito do ABA sobre a inibição da síntese de enzimas hidrolíticas, o que favorece a ativação da enzima α -amilase. Esta enzima promove a hidrólise do amido em glicose, no endosperma. A glicose liberada pode ser translocada para o embrião, fornecendo energia ou sendo prontamente utilizada como fonte de carbono. Entre os açúcares presentes em embriões e cotilédones de *Platymiscium pubescens*, a glicose foi o único açúcar detectado durante a embebição das sementes em PEG, supondo a utilização desse açúcar para a respiração e exercendo função osmótica, de forma a permitir maior absorção de água na fase inicial de embebição (Borges et al., 2002a). Adicionalmente, em embriões isolados de *Senna macranthera* foi observada alta concentração de glicose nas sementes secas, com aumento expressivo após 72 horas de embebição, sendo tal aumento creditado ao metabolismo de outras reservas, como lipídios ou proteínas (Borges et al., 2002b).

A atividade da enzima α -galactosidase detectada durante a hidratação de sementes de *Dalbergia nigra* dos lotes I e II encontra-se na Figura 3. Entre as temperaturas de hidratação, 15 e 25°C, não foram verificadas diferenças para a atividade desta enzima. A atividade de α -galactosidase foi detectada nas sementes antes mesmo da embebição, sugerindo que esta enzima está presente nas sementes maduras. Em ambos os lotes, foram observadas maiores atividades no eixo embrionário, quando comparado aos cotilédones. A atividade da enzima apresenta pequeno aumento no embrião em 15% de teor de água, em ambas as temperaturas no lote I, e constante no lote II nas mesmas condições, diminuindo em seguida. No nível de hidratação de 20% foram observados os menores valores de atividade da enzima no eixo embrionário dos dois lotes, seguido de aumentos em 25%. Nos cotilédones, as atividades da enzima em ambas as temperaturas nos lotes I e II permanecem aproximadamente constantes, com pequeno decréscimo em 20% de umidade para o lote II. Esses resultados sugerem que em sementes de *Dalbergia nigra* a mobilização de reservas ligadas à galactomanano ocorre preferencialmente no embrião, gerando substrato para a respiração e formação de estruturas de carbono para o crescimento.

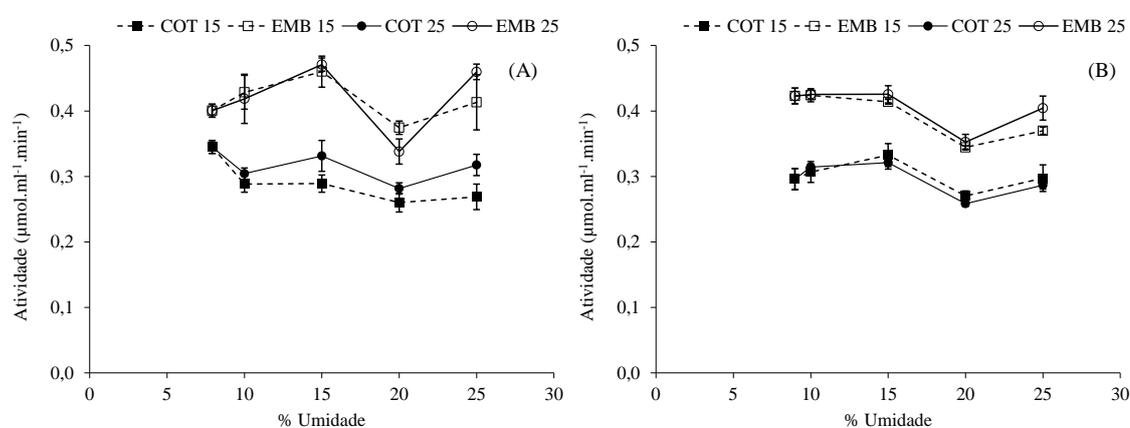


Figura 3. Atividade da enzima α -galactosidase em embriões (EMB) e cotilédones (COT) de sementes de *Dalbergia nigra* pertencentes aos lotes I (A) e II (B) durante a hidratação nas temperaturas de 15 e 25°C.

Ao comparar os dados de atividade da enzima α -galactosidase nos cotilédones com os teores crescentes de galactose (Figura 2), que é um dos produtos da ação dessa enzima, verifica-se que embora maior concentração de galactose livre tenha sido detectada nas sementes com 15 e 20% de hidratação, somente em 15% de umidade a atividade da enzima foi superior às demais, indicando que a enzima pode estar atuando na mobilização dos oligossacarídeos da série refinósica nos estádios iniciais de

embebição, liberando monossacarídeos livres. A atividade da enzima α -galactosidase aumentou durante a germinação de sementes de *Tachigali multijuga*, associada ao decréscimo nos conteúdos de rafinose e estaquiose, de forma que a hidratação das sementes durante a embebição possivelmente induziu a atividade de α -galactosidase, levando a uma quebra nos oligossacarídeos, que fornecem a energia germinativa (Fialho et al., 2008). A aplicação de α -galactosidase parcialmente purificada reduziu significativamente os teores de rafinose, estaquiose e verbascose em torno de 71-85%, em função da quebra das ligações 1,6-galactosídicas nos oligossacarídeos rafínosicos em sementes de *Canavalia ensiformis* e *Canavalia gladiata* (Pugalethi et al., 2006).

A análise da atividade da enzima α -galactosidase em embriões de sementes de *Dalbergia nigra* durante a germinação indicou um pico aos seis dias após início da embebição, coincidindo com o momento em que se verificou 50% de germinação das sementes, enquanto nos cotilédones a atividade da enzima foi maior nos dois primeiros dias do período germinativo (Pontes, 2008). Comparando-se aos resultados deste trabalho, percebe-se que durante a hidratação a atividade permanece constante, com aumento no período que antecede a protrusão da radícula. Em sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens*, a atividade da enzima α -galactosidase se manifesta mais claramente em 120 horas de embebição, possivelmente associada à hidratação mais lenta quando as sementes foram submetidas ao estresse hídrico (Borges et al., 2002a).

A atividade da enzima β -mananase nas sementes de *Dalbergia nigra* durante a hidratação apresentou valores superiores nos cotilédones, quando comparados aos embriões nos lotes I e II (Figura 4). A atividade nos cotilédones do lote I aumentou até o nível de 15% de umidade, com superioridade dos valores na temperatura de hidratação de 25°C, decrescendo em 20% e em seguida mostrando nova elevação no nível de 25% de umidade. Para o lote II, tendência semelhante foi observada na temperatura de 15°C. Neste lote, de vigor inferior, a temperatura mais alta pode resultar em danos na atividade da enzima nos cotilédones, levando possivelmente à expressão de uma isoenzima para baixas temperaturas, para compensar a perda de atividade daquela que atua a 25°C. A atividade da enzima β -mananase nos cotilédones em diferentes níveis de hidratação foram superiores às observadas para as testemunhas (sementes com 7,91 e 8,98% de umidade para os lotes I e II), de forma que a absorção de água estimulou a atividade da enzima. No nível de hidratação 15%, onde foi determinada alta atividade da enzima em cotilédones de ambos os lotes, também foram observadas quantidades superiores de galactose (Figura 2). Este resultado sugere, como descrito por Buckeridge

(2010), que a mobilização de galactomananos ocorre por meio de hidrólise, sendo este polímero degradado até seus monossacarídeos constituintes, manose e galactose. Dessa forma, a galactose livre pode ter como uma das fontes a galactomanana, embora não tenha sido constatada presença de manose nos cotilédones de *D. nigra* durante a hidratação.

A atividade da enzima β -mananase mantém-se constante nos embriões dos lotes I e II, apresentando menores valores a 20% de umidade às temperaturas de 15°C no lote I e 25°C no lote II. Para o lote II, valores inferiores de atividade da enzima foram detectados nos embriões das sementes no início da hidratação (testemunha), enquanto no lote I a enzima está presente no embrião antes e durante a embebição das sementes.

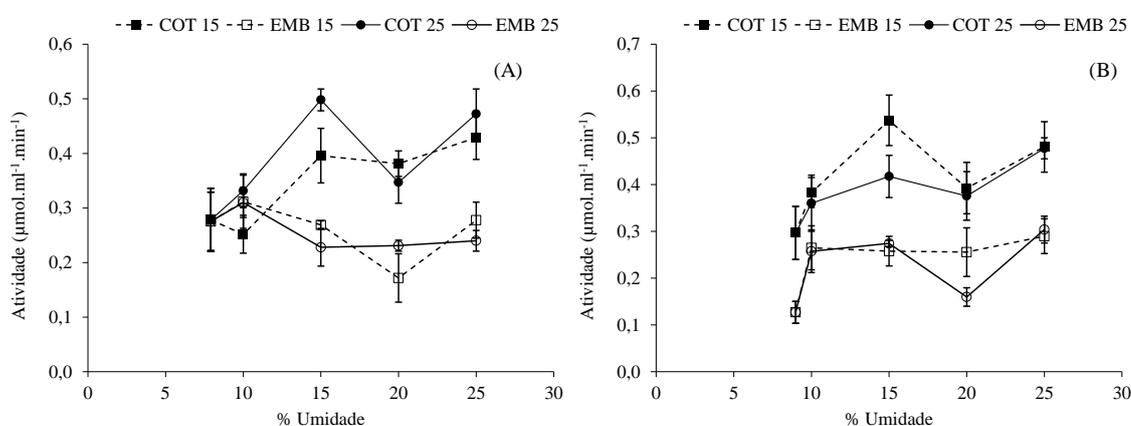


Figura 4. Atividade da enzima β -mananase em embriões (EMB) e cotilédones (COT) de sementes de *Dalbergia nigra* pertencentes aos lotes I (A) e II (B) durante a hidratação nas temperaturas de 15 e 25°C.

Downie et al. (1997) observaram a presença da enzima β -mananase no embrião, no megagametófito e na nucela de sementes de *Picea glauca* anteriormente ao início da embebição, com a intensificação da atividade após a absorção de água pelas sementes. Por outro lado, foram detectados níveis baixos de atividade da enzima β -mananase em sementes secas de *Arabidopsis thaliana* (Iglesias-Fernández et al., 2011). Segundo os autores, as expressões de atividades das enzimas no cotilédone e no embrião desaparecem após a emergência da radícula. Em sementes de *Eremanthus erythropappus*, a atividade da enzima β -mananase ocorreu após 12h de embebição, com aumento coincidindo com a germinação de 50% das sementes (Davide et al., 2008). Sanchez e Miguel (1997) mostraram que a enzima β -mananase, envolvida na degradação de manose na região da micrópila em sementes de *Datura ferox*, aumentou bastante antes da protrusão da radícula.

Em espécies leguminosas, a hidrólise dos galactomananos até seus monossacarídeos constituintes pela ação da β -mananase tem sido observada nos períodos pós-germinativos (Buckeridge et al., 2000; Ren et al., 2008). Assim, em níveis posteriores de hidratação das sementes de *Dalbergia nigra*, mais próximos à protrusão da radícula ou até mesmo em períodos pós-germinativos a atividade da β -mananase pode ser intensificada, de modo a permitir o decréscimo na força necessária para romper o tecido envoltório das sementes e favorecer a germinação.

A atividade da enzima poligalacturonase detectada durante a hidratação de sementes de *Dalbergia nigra* apresentou maiores valores nos cotilédones, quando comparados ao embrião, nos dois lotes avaliados (Figura 5). No lote I a atividade da enzima nos embriões flutuou entre os valores de 15 e 25% de umidade, a 25°C, após decréscimos nos teores de 10 e 15%. Na temperatura de 15°C ocorreu aumento gradual na atividade da enzima, após pequeno decréscimo inicial em 10% de teor de água, com novo decréscimo acentuado em 25%. Nos cotilédones, nas duas temperaturas, foi observado decréscimo na atividade da enzima até 10% de umidade, com maior intensidade em 15°C, seguido de aumento contínuo nos demais teores de água. Não se observa correspondência entre as atividades da enzima, em qualquer uma das temperaturas, com os valores de galactose (Figura 2) nos diferentes níveis de hidratação, podendo-se supor que a poligalacturonase esteja atuando na perda de coesão entre as células e dissolução das paredes celulares, devido à remoção do ácido poligalacturônico, o que facilita a expansão celular. Para o lote II, a atividade da enzima se mantém constante nos embriões até o nível de hidratação de 15%, com tendência de aumento em 20% de umidade, sendo este mais pronunciado na temperatura de 15°C. Nos cotilédones, foi observado aumento contínuo na atividade da enzima poligalacturonase ao longo do período de hidratação. No nível de 25% de umidade, a atividade da enzima nos cotilédones do lote I foi superior aos valores apresentados pelo lote II, o que favorece a redução dos açúcares componentes da parede celular para a germinação das sementes de vigor superior.

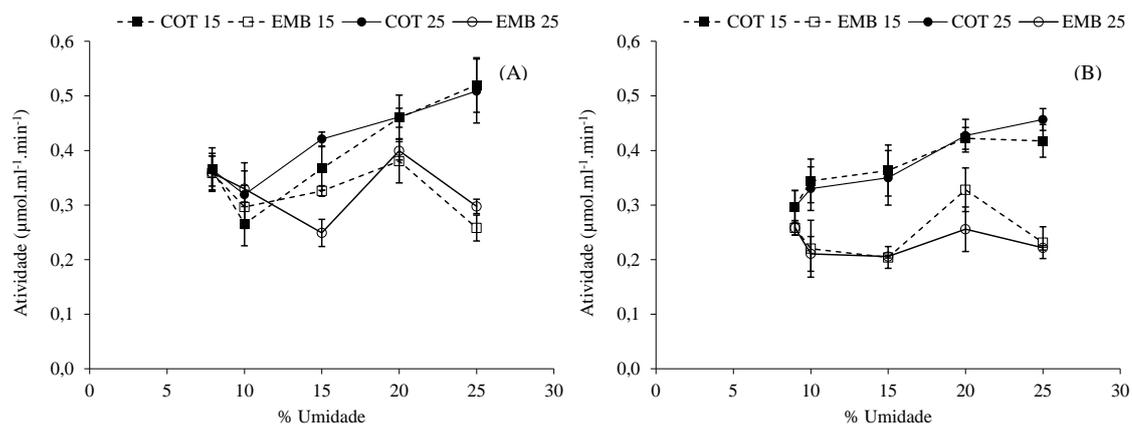


Figura 5. Atividade da enzima poligalacturonase em embriões (EMB) e cotilédones (COT) de sementes de *Dalbergia nigra* pertencentes aos lotes I (A) e II (B) durante a hidratação nas temperaturas de 15 e 25°C.

Em sementes de *Schizolobium paniculatum*, foi observado que esta enzima está ativa mesmo antes da embebição, ocorrendo um aumento da atividade no eixo embrionário e nos cotilédones próximo à germinação (6 a 8 dias), de modo a favorecer a expansão celular, tanto pela redução da resistência da parede celular à entrada de água como pela divisão celular (Magalhães et al., 2009). A atividade da enzima também aumentou no decorrer da embebição de sementes de *Lycopersicon esculentum*, sendo elevada no momento em que as sementes completaram a germinação (Sitrit et al., 1999). Os autores atribuíram à enzima como responsável pelo enfraquecimento mecânico do endosperma micropilar.

A atividade da enzima poligalacturonase na parede celular e na fração péctica dos tegumentos das sementes de *Dalbergia nigra* durante a embebição foi observada desde o primeiro dia de embebição, contribuindo assim para a redução do teor dos açúcares componentes da parede celular e da fração péctica ao longo do período de embebição (Pontes, 2008). Por outro lado, não foi detectada a atividade da enzima poligalacturonase no endosperma de sementes de *Euphorbia heterophylla* durante a germinação (Suda, 2001).

CONCLUSÕES

As sementes de *Dalbergia nigra* pertencentes ao lote de vigor superior apresentaram maior síntese e degradação de glicose durante a hidratação das sementes, indicando fluxo metabólico mais intenso em relação às sementes de menor vigor.

Dentre as enzimas analisadas, a α -galactosidase provavelmente atua na degradação dos oligossacarídeos da série rafínósica nos períodos iniciais de embebição das sementes de *D. nigra*, enquanto a β -mananase está relacionada à hidrólise dos galactomananos. Após início da absorção de água pelas sementes, ocorre aumento na atividade da enzima poligalacturonase, atuando na dissolução e perda de coesão das paredes celulares, o que facilita a expansão celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRENS, M. J.; HUBER, D. J. Physiology and firmness determination of ripening tomato fruit. **Physiologia Plantarum**, v. 78, p. 8-14, 1990.

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

BENECH, R. O.; LI, X.; PATTON, D.; POWLOWSKI, J.; STORMS, R.; BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.; TSANG, A. Recombinant expression, characterization, and pulp prebleaching property of a *Phanerochaete chrysosporium* endo- β -1,4-mannanase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 740-747, 2007.

BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GRZESIK, M.; GUY, P.; CO[^]ME, D. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 161-169, 1996.

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.

BORGES, E. E. L.; PEREZ, S. C. J. G. A.; BORGES, R. C. G.; REZENDE, S. T.; GARCIA, S. R. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (tamboril-da-mata). **Revista Árvore**, v.26, n.5, p.603-613, 2002a.

BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; SOARES, C. P. B.; PEREZ, S. C. J. G. A.; Crescimento e mobilização de carboidrato em embrião de sementes de fedegoso (*Senna macranthera* Irwin et Barneby) durante a germinação. **Cerne**, v. 8, n .1, p. 69-76, 2002b.

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

BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1017-1023, 2010.

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.

BUCKERIDGE, S., M.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, função e aspectosecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 137-162, jul., 2000.

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, 2004. 324 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações, silviculturas, potencialidades e uso da madeira. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília: Embrapa-SPI, p. 638p, 1994.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **The design of seed storage facilities for genetic conservation**. Rome: International Board of Plant Genetic Resources, 1990. 109p.

DAVIDE, A. C.; SILVA, C. S. J.; SILVA, E. A. A.; PINTO, V. A.; FARIA, J. M. R. Estudos morfo-anatômicos, bioquímicos e fisiológicos durante a germinação de sementes de candeia (*Eremanthus erythropappus*) (DC.) MacLeish. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 171-176, 2008.

DONADIO, N. M. M.; DEMATTÊ, M. E. S. P. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) e jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex Benth.) – Fabaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 1, p. 64-73, 2000.

DOWNIE, B.; HILHORST, W. M.; BEWLEY, J. D. Endo- β -mannanase activity during dormancy alleviation and germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 405-415, 1997.

ENGLYST, H. N.; CUMMINGS, J. H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatograph of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, v. 109, p. 973-942, 1984.

FIALHO, L. S.; GUIMARÃES, V. M.; CALLEGARI, C. M.; REIS, A. P.; BARBOSA, D. S.; BORGES, E. E. L.; MOREIRA, M. A.; REZENDE, S. T. Characterization and biotechnological application of an acid α -galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2579-2585, 2008.

GIORGINI, J. F.; COMOLI, E. Effect of embryo and exogenous GA3 on endospermic endo- β -mannase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 1, p. 43-49, 1996.

IBAMA – **Lista Oficial de Flora ameaçada de extinção** – acesso em 02/05/2010. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm>.

IGLESIAS-FERNÁNDEZ, R.; RODRÍGUEZ-GACIO, M. C.; BARRERO-SICILIA, C.; CARBONERO, P.; MATILLA, A. Three endo- β -mannanase genes expressed in the micropylar endosperm and in the radicle influence germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. **Planta**, v. 233, p. 25-36, 2011.

KUO, T. M.; VANMIDDLESWORTH, J. F.; WOLF, W. J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p. 32-36, 1988.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MAGALHÃES, S. M.; BORGES, E. E. L.; BERGER, A. P. Alterações nas atividades das enzimas alfa-galactosidade e poligalacturonase e nas reservas de carboidratos de

- sementes de *Schizolobium parahyba* (Well) Blake (guapuruvú) durante a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 253-261, 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.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOLLE, F. R. D.; TINÉ, M. A. S. Catabolismo de sacarose durante a mobilização do galactomanano e sua importância na estratégia de sobrevivência de plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Hoehnea**, v. 36, n. 2, p. 259-268, 2009.
- MUTLU, M.; SARIOGLU, K.; DEMIR, N.; ERCAN, M. T.; ACAR, J.; The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. **Journal of Food Engineering**, v. 41, p. 147-150, 1999.
- NONOGAKI, H.; CHEN, F.; BRADFORD, K. J. Mechanisms and genes involved in germination *sensu stricto*. In: BRADFORD, K. J.; NONOGAKI, H. **Seed development, dormancy and germination**. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 264-304.
- OLIVEIRA JÚNIOR, L. F. G.; BRESSAN-SMITH, R.; OLIVEIRA, A. E. A.; PEREIRA, M. G.; SILVA, L. B.; VIANA, L. H.; VIEIRA, H. D. Insulina e glicose como moduladores do desenvolvimento de plântulas de milho doce (Su1). **Acta Botanica Brasílica**, v. 23, n. 3, p. 751-755, 2009.
- POLOWICK, P. L.; BALISKI, D. S.; BOCK, C.; RAY, H.; GEORGES, F. Over-expression of α -galactosidase in pea seeds to reduce raffinose oligosaccharide content. **Botany**, v. 87, p.526-532, 2009.
- PONTES, C.A. **Influência das enzimas α -galactosidase e poligalacturonase na germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Leguminosae-Papilionoidea)**. 2008. 55p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

PUGALENTI, M.; SIDDHURAJU, P.; VADIVEL, V. Effect of soaking followed by cooking and the addition of α -galactosidase on oligosaccharides levels in diferente *Canavalia* accessions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 512-517, 2006.

REN, Y.; BEWLEY, D.; WANG, X. Protein and gene expression patterns of endo-b-mannanase following germination of rice. **Seed Science Research**, v. 18, p. 139-149, 2008.

RODRIGUES, A. C.; HERTER, F. G.; VERÍSSIMO, V.; CHAVARRIA, G.; GARDIN, J. P. P.; CAMPOS, A. D. Determinação por cromatografia gasosa de açúcares em frutíferas de clima temperado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 173-174, 2005.

SANCHEZ, R. A.; MIGUEL, L. Phytochrome promotion of mannan-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds requires the presence of the embryo and gibberellin synthesis. **Seed Science Research**, v. 7, p. 27-34, 1997.

SILVA, E. A. A.; TOOROP E. P.; VAN AELST, A. C.; HILHORST, H. W. M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Planta**, v. 220, n. 2, p. 251-261, 2004.

SITRIT, Y.; HADFIELD, K. A.; BENNETT, A. B.; BRADFORD, K. J.; DOWNIE, A. B. Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. **Plant Physiology**, v. 121, p. 419-428, 1999.

STATSOFT, Inc. **Statistic** (data analysis sot ware system), Version 7. www.statsoft.com.

SUDA, C. N. K. **Hidrolases da parede celular em sementes de *Euphorbia heterophylla* L. durante a germinação e desenvolvimento inicial da plântula**. 2001. 130p. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

VIANA, S.F. Caracterização de alfa galactosidase de soja para hidrólise de oligossacarídeos de rafinose. 2002. 65p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

A hidratação das sementes em água favoreceu a germinação e o vigor das sementes de jacarandá-da-bahia de lotes de diferentes qualidades fisiológicas, porém efeitos mais expressivos foram observados no lote de menor vigor. A manutenção das sementes em hidratação até 15% de umidade foi a mais indicada para incremento na qualidade das sementes de ambos os lotes.

Durante a hidratação, ocorreu pequena variação nos teores de lipídios, enquanto os conteúdos de carboidratos solúveis e amido apresentaram decréscimo a partir do nível de hidratação de 15% e proteínas solúveis exibiram tendência gradativa de queda, desde a testemunha (sementes secas) até o nível de 25% de umidade.

A enzima α -galactosidade é pré-formada e possui maior atividade inicialmente no embrião, gerando substrato para a respiração e formação de estruturas de carbono para o crescimento. As atividades das enzimas β -mananase e poligalacturonase aumentam com a embebição das sementes e são diferentes entre cotilédones e embrião, alcançando maiores valores nos cotilédones que no eixo embrionário.