

VIVIANA BORGES CORTE

**ESTUDOS HISTOQUÍMICOS, BIOQUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS EM SEMENTES DE *CAESALPINIA
PELTOPHOROIDES* BENTH. DURANTE A
GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DAS
PLÂNTULAS**

Tese 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 – MG
Brasil
2005

VIVIANA BORGES CORTE

**ESTUDOS HISTOQUÍMICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS EM SEMENTES
DE *CAESALPINIA PELTOPHOROIDES* BENTH. DURANTE A GERMINAÇÃO E
CRESCIMENTO INICIAL DAS PLÂNTULAS**

Tese 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 2005.

Profa. Idalina Tereza de Almeida Leite
(Conselheira)

Profa. Marília Contin Ventrella
(Conselheira)

Prof. João Marcos Araújo

Profa. Débora Leonardo dos Santos

Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges
(Orientador)

Aos meus pais Valdir e Santana.
Aos meus Avós Luiz, Cremilda, Argeu
(*in memorian*) e Ana Maria (*in
memorian*).
Ao meu namorado Sandro.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa por possibilitar a realização deste trabalho e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Eduardo Borges, pela confiança depositada, amizade, e eficiente orientação.

Às professoras Marília Ventrella e Idalina Tereza Leite pelas orientações, estímulo e amizade.

Aos meus pais Valdir e Santina, pela vida e incansável dedicação e incentivos.

Aos meus Avós Luiz, Cremilda, Argeu (*in memorian*) e Ana Maria (*in memorian*) pelo carinho.

Ao meu namorado Sandro pelo amor e companheirismo em todas as etapas da realização deste trabalho.

Aos professores João Marcos Araújo, Juraci Alves Oliveira e Fernando Pires pela boa vontade e auxílio na interpretação dos resultados. Ao amigo Aderlan pelo auxílio estatístico.

Aos laboratoristas Mauro e Leacir (Silvicultura) e Vânia (Anatomia) pelo auxílio durante o desenvolvimento dos trabalhos, ao Chico, Machado, Neco e todos os funcionários da silvicultura pelo apoio logístico aos experimentos.

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

Aos amigos Claudinha pela força, amizade e agradável convívio.

Aos amigos da Pós Dani, Pati Baliza, Pati Goulard, Fabiana, Elisa, Rogerinho, Rodrigo, cujo companheirismo contribuiu muito para a conclusão desta etapa.

Aos amigos de Vitória Dani, Aglaé, Nay, Carol, Rodrigo, Nelson pelo apoio e incentivos constantes.

A todos os amigos e familiares que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Finalmente, e mais importante, a Deus por ter conduzido meus passos e por colocar pessoas tão especiais em meu caminho.

BIOGRAFIA

Viviana Borges Corte, filha de Valdir Corte e Santina Soeiro Borges, nasceu em Vitória, Espírito Santo, em 25 de junho de 1981.

Realizou seus estudos básicos em Vitória, Espírito Santo.

Em setembro de 1999, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Espírito Santo, concluindo-o em novembro de 2003.

Ingressou no Programa de Pós Graduação em Ciências Florestais em nível de Mestrado na Universidade Federal de Viçosa, em março de 2004, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, em julho de 2005, com defesa da dissertação.

CONTEÚDO

RESUMO GERAL.....	Vi
GENERAL ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	06
CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DE COTILÉDONES DE <i>CAESALPINIA PELTOPHOROIDES</i> BENTH. (LEGUMINOSAE- CAESALPINOIDEAE).....	09
RESUMO.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4. CONCLUSÕES.....	19
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO II - ASPECTOS HISTOQUÍMICOS DA MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS EM <i>CAESALPINIA PELTOPHOROIDES</i> BENTH. (LEGUMINOSAE) DURANTE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DAS PLÂNTULAS.....	28
RESUMO.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4. CONCLUSÕES.....	37
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
CAPÍTULO III - MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE <i>CAESALPINIA</i> <i>PELTOPHOROIDES</i> BENTH. (LEGUMINOSAE- CAESALPINOIDEAE).....	47
RESUMO.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4. CONCLUSÕES.....	64
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
CONCLUSÕES GERAIS.....	69

RESUMO

CORTE, Viviana Borges, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2005. **Estudos histoquímicos, bioquímicos e fisiológicos de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.** Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Conselheiras: Idalina Tereza de Almeida Leite e Marília Contin Ventrella.

Este trabalho teve como objetivo estudar a composição química do cotilédone de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae - Caesalpinoideae) e a mobilização de reservas durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. As análises foram feitas a cada cinco dias, desde a semeadura até a completa abscisão dos cotilédones, aos 35 dias. Foram realizados testes histoquímicos, em cotilédones de sementes frescas, fixadas em FAA₅₀ e incluídas em glicol-metacrilato. Os testes utilizados foram: PAS para carboidratos neutros, vermelho de rutênio para pectinas, azul de astra/ fucsina básica para paredes celulósicas e compostos fenólicos, Lugol para amido, azul de alciano para mucopolissacarídeos ácidos, azul de bromofenol e xylydine Ponceau para proteínas, sudan III, black B e escarlate para lipídios totais, sulfato azul do Nilo para lipídios ácidos e neutros, ácido rubeânico para ácidos graxos, tetróxido de ósmio para lipídios insaturados, cloreto férrico para compostos fenólicos totais, vanilina clorídrica para taninos, reagente de Wagner, de Dittmar e de Draggendorf para alcalóides, reagente de Nadi, tricloreto de antimônio, ácido sulfúrico e 2,4-dinitrofenilhidrazina para terpenóides e, para cristais, ácido clorídrico e nítrico. O azul de toluidina foi utilizado para metacromasia e contracoloração com Lugol, e a luz polarizada para evidenciar substâncias anisotrópicas. Testes bioquímicos foram utilizados para determinação quantitativa de lipídios totais, proteínas solúveis, carboidratos solúveis, e amido, com 5 repetições de 20 cotilédones cada. As sementes contêm lipídios (50%) como principal reserva nos cotilédones, seguido de carboidratos solúveis (32%), proteínas solúveis (7,7%) e amido (6,8%). Drusas de oxalato de cálcio

estão presentes apenas na face adaxial dos cotilédones, enquanto compostos fenólicos, alcalóides e terpenóides estão ausentes no mesofilo cotiledonar. Grandes cavidades secretoras, distribuídas por todo o cotilédone, são ricas em compostos fenólicos. Resultados bioquímicos e histoquímicos concordaram que tanto lipídios quanto proteínas foram consumidos gradativamente até os 25 dias após a semeadura (DAS). Os grãos de amido, presentes em pequena quantidade e distribuídos uniformemente em todo cotilédone apresentaram leve aumento aos 10 DAS, seguindo-se de contínuo consumo e desaparecendo 30 DAS. Nesse caso, a quantificação bioquímica não detectou o aumento sutil visualizado *in situ* pela histoquímica. Cristais de oxalato de cálcio não foram consumidos, mas mudaram seu padrão de distribuição nas células durante o período estudado.

ABSTRACT

CORTE, Viviana Borges, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2005.
Histochemical, biochemical and physiological studies of *Caesalpinia peltophoroides* Benth. during germination and early growth of the seedlings.
Adviser: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Committee members : Idalina Tereza de Almeida Leite and Marília Contin Ventrella.

The aim of this work was to study the chemical composition of the cotyledon from seeds of *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae – Caesalpinioideae) and the mobilization of the reserves during germination and initial growth of the seedlings. The analyses were done every five days, from the sowing to the complete fall of the cotyledons, at the day 35. Histochemical tests were carried out in cotyledons from fresh seeds, fixed in FAA₅₀ and included in glycol-metacrilate. The tests used were: PAS for neutral carbohydrates, red of ruthenium for pectins, astra blue/ basic fucsin to the cellulosic walls and phenolic compounds, Lugol for starch, alcian blue for acid mucus polysaccharides, blue of bromophenol and xyloidine Ponceau for the proteins, Sudan III, black B and scarlet for the total lipids, blue sulphate from Nile for the acid and neutral lipids, rubeanic acid for the fatty acid, ferric chloride for the total phenolic compounds, hydrochloric vanillin for the tannins, Wagner , Dittmar and Draggendorf reagents for the alkaloids, Nadi reagent, antimony thichloride , sulphuric acid and 2,4-dinitrofenilhidrazine for the terpenoids, and for the crystals, chloride and nitric acid . The toluidine blue was used for metacromasie and counter-coloration with Lugol, and polarized light to evince the anisotropic substances. Biochemical tests were used for the quantitative determination of the total lipids, soluble proteins, soluble carbohydrates, and starch with 5 repetitions of 20 cotyledons each. The seeds have lipids (50%) was the main storage in the cotyledons, followed by soluble carbohydrates (32%), soluble proteins (7.7%) and starch (6.8%). Druses of calcium oxalate are present only in the adaxial face of the cotyledons, while phenolic compounds, alkaloids and terpenoids are absent in the cotyledonal mesophyll. Big secretor cavities, spread all over the

cotyledon, are rich in phenolic compounds. Biochemical and histochemical results have agreed that that both lipids and proteins were gradually consumed until 25 days after sowing (DAS). The starch grains, present in a small quantity and evenly distributed for all over the cotyledon showed a slight increase on the 10 DAS, followed by a continue consumption and disappearing on 30 DAS. In this case, the biochemistry quantification didn't detect the subtle increase visualized *in situ* through the histochemistry. Crystals of calcium oxalate weren't consumed, but they changed their standard of distribution in the cells during the studied period.

INTRODUÇÃO GERAL

As espécies arbóreas nativas possuem uma grande diversidade de sementes que variam bastante em seus aspectos morfológicos e fisiológicos (SCALON *et al.*, 2003). As características das sementes no que diz respeito às propriedades fisiológicas de sua latência, viabilidade e germinação, refletem a natureza do ambiente em que ocorre o estabelecimento das plantas que as produzem, de modo que estas características tendem a assegurar sua sobrevivência pelo condicionamento da germinação ao momento mais propício ao seu estabelecimento (PIÑA-RODRIGUES *et al.*, 1990).

O estabelecimento de uma dada espécie na regeneração está ligado à capacidade de suas sementes germinarem rápido e uniformemente, a fim de vencer a concorrência com outras espécies presentes no local ou pela capacidade de se manterem viáveis por períodos mais longos, até que as condições ambientais sejam propícias ao desenvolvimento das plântulas. Para tanto, cada espécie lança mão de adaptações, como a mobilização de determinadas reservas que serão úteis para formação de estruturas físicas, como parede celular ou para respiração ou, ainda, sintetizando intermediários metabólicos com finalidades diversas (BORGES, 2003).

Essencialmente, a germinação é o retorno do eixo embrionário de um estado de quiescência ou dormência para um estado metabolicamente dinâmico, envolvendo eventos anatômicos ou morfológicos, genéticos, metabólicos e hormonais (JANN & AMEN, 1977; BORGES & RENA, 1993).

A germinação, ainda segundo BORGES (2003), inicia com embebição das sementes, estimulando a síntese de enzimas ou a ativação daquelas já pré-formadas, resultando na mobilização de reservas ou na digestão de parede celular, enfraquecendo-a e permitindo que a raiz rompa o tegumento.

As substâncias de reserva armazenadas no cotilédone, endosperma ou perisperma como os carboidratos, lipídios e proteínas encontram-se principalmente na

forma insolúvel. A proporção da composição pode variar de espécie para espécie e até entre espécies de uma mesma família (BORGES & RENA, 1993; BEWLEY & BLACK, 1994). As reservas são utilizadas pelo embrião como fonte de energia e substrato para estruturas celulares (PONTES *et al.*, 2002). A utilização dessas substâncias para promover o crescimento do eixo embrionário depende da embebição e da ação de enzimas, algumas delas presentes nas células desidratadas da semente e necessitam ser reativadas, ao passo que outras são sintetizadas durante o processo de germinação (BEWLEY & BLACK, 1994; BEWLEY, 1997; KOZLOWISKI & PALLARDY, 1997; CARVALHO & NAKAGAWA, 2000; BASKIN & BASKIN, 2001).

Embora esta degradação constitua um importante passo na disponibilização de substratos para manutenção do crescimento de plântulas (TO *et al.*, 2002; BORGES, 2003), até que elas se tornem suficientemente autotróficas (PRITCHARD *et al.*, 2002), os mecanismos de transporte ainda não foram bem determinados (STONE & GIFFORD, 1997).

As sementes têm sido estudadas mais intensamente quanto à composição química de suas reservas. O interesse não se dá apenas por seu teor nutritivo, mas por apresentarem propriedades físico-químicas especiais, formando soluções altamente viscosas, sendo, por isso, úteis como aditivos na confecção de alimentos industrializados (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). O conhecimento da composição química é do interesse prático em tecnologia de sementes, porque tanto o vigor quanto o potencial de armazenamento de sementes são influenciados pelo teor dos compostos presentes. Outro aspecto importante diz respeito à influência da composição química no gasto das plantas em energia para produzi-las (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

Segundo BEWLEY & BLACK (1994), carboidratos pré-formados nas sementes servem como substrato da respiração durante o período pré-germinativo. Além disso, os açúcares são substâncias consideradas eficientes em estabilizar estruturas de membranas durante a maturação (OBENDORF, 1997) e favorecem a formação de um estado vitrificado (“glassy”) no citoplasma.

Os carboidratos podem ser armazenados na forma de amido, que é o principal material de reserva nas sementes cultivadas ou selvagens (GUIMARÃES, 1999). A utilização do amido ou açúcares solúveis é variável, dependendo da espécie, podendo ocorrer durante a germinação ou no estágio de plântula (PONTES *et al.*, 2002). Segundo OLIVEIRA (2002), em sementes de *Platymiscium pubescens* a estaquiase e a sacarose foram os primeiros oligossacarídeos a serem degradados durante a protusão da radícula.

A forma e o tamanho dos grãos de amido são variáveis entre as espécies, sendo que a proporção entre os conteúdos de amilose e amilopectina determina a forma do grão. Maior quantidade de amilopectina torna o grão mais elíptico enquanto maior quantidade de amilose mais esférico e regular. Quando exposta ao iodo, a amilose adquire coloração azul e a amilopectina torna-se vermelha (GUIMARÃES, 1999). A quantidade de amido é geralmente espécie-específica, podendo variar de alguns grãos, até dezenas (BEWLEY & BLACK, 1983; BUCKERIDGE, *et al.*, 2004).

O estudo dos carboidratos de reserva armazenados em sementes tem sido aplicado como ferramenta na classificação taxonômica de espécies de leguminosas (HEGNAUER & GPAYER-BARKMEIJER, 1993). Segundo os mesmos autores, muitas Papilionoideae, armazenam grandes quantidades de amido em suas sementes. A reserva de grãos de amido em Caesalpinioideae constitui uma exceção. Em Mimosoideae, a situação é similar, entretanto, reserva de pequenos grãos de amido nas sementes ocorre, ligeiramente, em maior frequência.

As proteínas ocorrem e, provavelmente, são essenciais em todas as sementes (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). Entretanto, segundo GUIMARÃES (1999), estas, de maneira geral, ocorrem em menor proporção que os carboidratos e lipídios, exceção feita à semente de soja.

As proteínas de reserva são geralmente classificadas em função de sua solubilidade. Em leguminosas, as globulinas representam a maior parcela das proteínas de reserva. A principal função dessas proteínas é fornecer aminoácidos ou nitrogênio para as plântulas (GUIMARÃES, 1999).

As proteínas de reserva encontram-se depositadas em corpúsculos celulares denominadas corpos protéicos (DALLING & BHALLA, 1984; GUIMARÃES, 1999; MÜNTZ *et al.*, 2001; BUCKERIDGE *et al.*, 2004) e, em sementes de dicotiledôneas, os cotilédones são os principais órgãos de reserva (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

BORGES (2003) observou que o teor de proteína decresce, continuamente, no eixo embrionário de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* a partir de 24 horas de embebição, enquanto se manteve estável nos cotilédones. Resultados semelhantes foram encontrados por SCHLERETH *et al.* (2000) para sementes de *Vicia sativa*, cuja mobilização das reservas de proteína nos cotilédones só começou após 48 horas de embebição.

Em sementes de *Pinus taeda*, a maior parte das reservas de proteínas está contida no megagametófito e sua degradação ocorre após a emergência da radícula

(KING & GIFFORD, 1997). Esses resultados confirmam que a germinação da semente é iniciada graças às reservas próprias do embrião e mantida com a degradação dos componentes dos tecidos de reserva, pela atividade enzimática e fluxo dos componentes solúveis às regiões de crescimento onde há rápido consumo (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

YAMAGUCHI *et al.* (1996) observaram que em sementes de *Cucumis sativus* a degradação das reservas de proteínas inicia-se aos três dias após a germinação. BUCKERIDGE *et al.* (2004) também evidenciam a mobilização das reservas de proteínas para a estruturação dos processos que conferem capacidade de absorver nutriente e de realizar fotossíntese.

Os lipídios em sementes encontram-se na forma de triacilgliceróis (BEWLEY & BLACK, 1994). A fase inicial da hidrólise é catalisada pelas lipases presentes nos corpos lipídicos, originando gliceróis e ácidos graxos. Após a hidrólise, estes tornam-se disponíveis para o desenvolvimento da plântula, como fonte de carbono (BEEVERS, 1979).

Em *C. sativus*, a degradação dos lipídios inicia-se no segundo dia após a germinação, restando 3% do total inicial aos seis dias após a germinação. Essa rápida degradação se inicia com o aparecimento da radícula e termina com a completa expansão dos cotilédones (MATSUI *et al.*, 1999). Entretanto, em *Arabidopsis thaliana*, a mobilização das reservas de lipídio são fortemente reduzidas na presença de açúcares solúveis, tais como glicose e sacarose, em geral provindos do metabolismo do amido (To *et al.*, 2002).

Não só as mudanças bioquímicas, mas também as alterações estruturais e anatômicas relacionadas ao metabolismo das reservas armazenadas em sementes têm sido descritas por muitos autores (STONE & GIFFORD, 1997; SILVA, *et al.*, 1997; SILVA, *et al.*, 1998). Tem-se observado significativo decréscimo dos corpos protéicos e corpos oleaginosos durante a germinação e crescimento inicial (SILVA, *et al.*, 1998; MATSUI *et al.*, 1999; SUDA & GIORGINI, 2000), os quais são convertidos em aminoácidos e carboidratos solúveis, que serão transportados para a plântula (KING & GIFFORD, 1997).

Muito embora haja estudos diversos a respeito da germinação de sementes para algumas espécies florestais nativas, observa-se que há poucas informações disponíveis quando se trata das modificações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas que ocorrem durante este período, e o subsequente crescimento das plântulas.

Conhecida popularmente como sibipiruna ou falso pau-brasil, *Caesalpinia peltophoroides* Benth. é uma espécie ornamental com potencial madeireiro, com grande distribuição no Brasil ocorrendo principalmente na região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro, sul da Bahia, São Paulo, Espírito Santo e no Pantanal Mato-grossense (LORENZI 2002).

Sua madeira é pesada, dura e de média durabilidade, sendo utilizada na construção civil, na produção de móveis em geral, em plantios mistos para recuperação de áreas degradadas e, principalmente, no paisagismo. A espécie é pouco exigente com relação ao tipo de solo. A árvore é semidecídua, heliófila produzindo anualmente grande quantidade de sementes viáveis. O florescimento ocorre a partir do mês de agosto, prolongando-se até meados de novembro. Os frutos podem ser colhidos de julho a meados de setembro (LORENZI, 2002).

Nesse contexto, usando-se de ferramentas bioquímicas e anatômicas, o presente trabalho objetivou estudar os padrões temporais e espaciais relacionados à mobilização dos compostos de reserva armazenados nos cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. durante a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M.. **Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination**. Academic Press, 666 p., 2001.
- BEEVERS, H. Microbodies in higher plants. **Annu Rev Plant Physiol** v.30, p.159–193, 1979.
- BEWLEY, J.D.. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, 9, 1055-1066, 1997.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M.. **Seeds: Physiology of development and germination**, 2nd. New York: Plenum, 1994.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and Biochemistry of seeds: Development, germination and growth**. Vol.1, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1983.
- BORGES, E.E.L. **Comportamento bioquímico e fisiológico de sementes florestais nativas durante a embebição**. Tese de doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 100 p., 2003.
- BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. **Germinação de sementes**. In: AGUIAR, I.B.; PIÑARODRIGUES, F.C.M; FIGLIOLIA, M.B. Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES, 350 p., 1993.
- BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S.. Mobilização de Reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- CARVALHO, J.E.U.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Funep, p.588, 2000.
- DALLING, M.J.; BHALLA, P. Mobilization of nitrogen and phosphorus from endosperm. In: Murray, D.R. **Seed Physiology: Germination and reserve mobilization**. vol. 2, 295 p., 1984.
- GUIMARÃES, R.M. **Fisiologia de sementes**. Ed. UFLA/FAEPE, 79p., 1999.
- JANN, R.C.; AMEN, R.D. In: Khan, A.A. ed. **The physiology and biochemistry of the seed dormancy and germination**. Elsevier, North-Holland Biomedical Press. P. 7-28, 1977.

- HEGNAUER, R.; GPAYER-BARKMEIJER, R.J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, vol. 34, n.1, p.3-16, 1993.
- KING, J.E.; GIFFORD D.J.. Amino Acid Utilization in Seeds of Loblolly Pine during Germination and Early Seedling Growth. 1. Arginine and Arginase Activity. **Plant Physiol.**, 113 p.1125-1135, 1997.
- KOZLOWISKI, L.L.; PALLARDY, S.G.. **Growth Control in Wood Plants**. San Diego, Academic press, 641 p., 1997.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, p.352, 2002.
- MATSUI, K.; HIJIYA, K.; TABUCHI, Y.; KAJIWARA, T. Cucumber Cotyledon Lipooxygenase during Postgerminative Growth. Its Expression and Action on Lipid Bodies. **Plant Physiology**, Vol. 119, pp. 1279–1287, 1999.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciênc. Cult.** 30, p.665-676, 1978.
- MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.362, p.1741-1752, 2001.
- OBENDORF, R.L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitol in seed desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wellingfort, v.7, p.63-67, 1997.
- OLIVEIRA, G. **Purificação parcial e caracterização bioquímica-cinética de alfa-galactosidase de sementes de tamboril da mata (*Platymiscium pubecens*)**. Viçosa: UFV, 2002, (tese de mestrado).
- PIÑA-RODRIGUES, F. C., COSTA, L. C. REIS, A. **Estratégias de estabelecimento de espécies arbóreas e o manejo de florestas tropicais**. In: Congresso Florestal Brasileiro, 6, Campos do Jordão, 1990. Anais, Campos do Jordão: SSB, 679-684p, 1990.
- PRITCHARD, S.L.; CHARLTON, W.L.; BAKER, A.; GRAHAM, L.A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis. **The Plant Journal**. Vol. 31, n.5, p. 639-647, 2002.
- PONTES, A. P.; 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.

- SCHLERETH, A.; BECKER, C.; HORSTMANN, C.; TIEDEMANN, J.; MÜNTZ, K.. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedlings growing of vetch (*Vicia sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.349, p.1423-1433, 2000.
- STONE, S.L.; GIFFORD, D.J. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early-seedling grown. I. Storage protein reserves. **International Journal of Plant Science**. V.158, n.6, p.727-737, 1997.
- SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; ALMEIDA, K. A.; RIGONI, M. R. Efeito do álcool e substrato na germinação de sementes de sibipiruna (*Caesalpinia pelthophoroides* Benth.) colhidas no chão e retiradas da vagem. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.2, p.389-392, 2003.
- SILVA, T.R.G.; CORTELAZZO, A.L.; DIETRICH, S.M.C. Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. **Ciência e Cultura**.V.49, n.3, 1997.
- 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**. Vol.10, n.2, p. 119-124, 1998.
- SUDA, C.N.K.; GIORGINI, J.F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Rev. Bras. Fisiologia Vegetal**. Vol.12, n.3, p.226-245, 2000.
- TO, J.P.C.; REITER, W.; GIBSON, S.I.. Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. **BMC Plant Biology**, 2:4, 2002.
- YAMAGUCHI, Y.; SUGIMOTO, T.; SUEYOSHI, K.; OJI, Y. Emergence of proteases in germinating cucumber cotyledons and their roles in the two-step degradation of storage protein. **Plant Cell Physiol** v.37, p.279–284, 1996.

CAPÍTULO I

**CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DE COTILÉDONES DE SEMENTES
DE *CAESALPINIA PELTOPHOROIDES* BENTH. (LEGUMINOSAE-
CAESALPINOIDEAE)**

RESUMO

O trabalho teve como objetivo a caracterização histoquímica do cotilédone de sementes de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.). Seções transversais foram obtidas em micrótomo de mesa ou micrótomo rotativo. Os testes histoquímicos utilizados foram: PAS para polissacarídeos neutros, vermelho de rutênio para pectinas, azul de astra/ fucsina para paredes celulósicas, Lugol para amido, azul de alciano para mucopolissacarídeos ácidos, azul de bromofenol e xylidine Ponceau para proteínas totais, sudan III, black B e escarlata para lipídios totais, sulfato azul do Nilo para lipídios ácidos e neutros, acetato de cobre/ácido rubeânico para ácidos graxos, cloreto férrico para compostos fenólicos, vanilina clorídrica para taninos, reagente de Wagner, de Dittmar e de Dragendorff para alcalóides, para terpenóides, reagente de Nadi, tricloreto de antimônio, ácido sulfúrico e 2,4-dinitrofenilhidrazina, e para cristais, ácido clorídrico e nítrico. O azul de toluidina foi utilizado para detecção de radicais aniônicos, e a luz polarizada para evidenciar substâncias anisotrópicas. Todas as colorações e testes histoquímicos propostos foram utilizados em material fresco e fixado (sem inclusão) e, quando possível, também em material incluído em glicol-metacrilato. Corpos oleaginosos (lipídios neutros) são abundantes em todo o mesofilo cotiledonar, especialmente na face abaxial, assim como os copos protéicos, mais volumosos na face adaxial. O amido distribuí-se por todo o mesofilo cotiledonar, em pequenos amiloplastos, e drusas de oxalato de cálcio localizam-se apenas na face adaxial do cotilédone. As cavidades secretoras, distribuídas por todo o cotilédone, contêm compostos fenólicos.

Palavras-chave – composição química, semente, histoquímica, *Caesalpinia peltophoroides*.

1. INTRODUÇÃO

Caesalpinia peltophoroides Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae), conhecida popularmente como sibipiruna ou falso pau-brasil é espécie ornamental e com potencial madeireiro. No Brasil tem grande distribuição, ocorrendo principalmente na região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro, sul da Bahia, São Paulo, Espírito Santo e no Pantanal Mato-grossense (LORENZI, 2002).

As espécies arbóreas nativas possuem uma grande diversidade de sementes que variam bastante em seus aspectos morfológicos e fisiológicos (SCALON *et al.*, 2003). O conhecimento acerca da biologia de sementes é essencial para se compreender processos de comunidades vegetais, tais como o estabelecimento das plantas, a sucessão e sua regeneração natural (VÁZQUEZ-YANES & OROZCO-SEGOVIA, 1993). Nesse contexto, as sementes têm sido estudadas quanto à composição química não só por seu teor nutritivo, mas por apresentarem propriedades úteis à indústria (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). Além disso, o conhecimento da composição química é do interesse prático da tecnologia de sementes, porque, tanto o vigor como o potencial de armazenamento de sementes é influenciado pelo teor dos compostos presentes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Sabe-se também, que a constituição bioquímica das sementes tem papel decisivo na determinação de características ecologicamente importantes, tais como a germinação e crescimento inicial das plântulas (LEVIN, 1974; SNELL, 1976).

Para o estudo da composição química em sementes tem-se adotado, em geral, técnicas bioquímicas (BALERONI *et al.*, 1997; PONTES *et al.*, 2002; PRITCHARD *et al.*, 2002; BORGES *et al.*, 2002; BORGES, 2003). Todavia, esta pode ser detectada *in situ* por meio de técnicas histoquímicas específicas, as quais permitem informações mais detalhadas sobre a organização e distribuição dos compostos no tecido.

Tendo em vista que pouco se conhece a respeito da composição química de sementes de espécies florestais nativas, este trabalho teve por objetivo caracterizar histoquimicamente os cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Caesalpinoideae-Leguminosae), colhidas na região de Viçosa, Minas Gerais, provenientes de um mínimo de 10 árvores. Durante o beneficiamento, foram eliminadas as sementes imaturas, deterioradas ou danificadas. Para o estudo histoquímico, um lote de 50 sementes foi conservado em geladeira, a 4°C, e outro lote de 50 sementes, fixadas em FAA₅₀, por 72 horas, e estocado em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). A região mediana do cotilédone de algumas sementes fixadas foi incluída em glicol-metacrilato (Historesin-Leica), segundo as recomendações do fabricante e de CARMELLO-GUERREIRO (1995). A região mediana do cotilédone de sementes frescas e fixadas foi seccionada transversalmente em micrótomo de mesa, enquanto que o material incluído em glicol-metacrilato foi seccionado transversalmente em micrótomo rotativo, com 7µm de espessura.

Os testes histoquímicos utilizados foram: PAS para polissacarídeos neutros (FEDER & O'BRIEN, 1968), azul de astra e fuccina básica para paredes celulósicas e compostos fenólicos (ROESER, 1972, modificado por LUQUE *et al.*, 1996), vermelho de rutênio para pectinas (JOHANSEN, 1940), Lugol para amido (JOHANSEN, 1940), azul alciano para mucopolissacarídeos ácidos (PEARSE, 1980), azul mercúrio de bromofenol (MAZIA *et al.*, 1953) e xylidine Ponceau (VIDAL, 1977) para proteínas totais, sudan III, black B e escarlate para lipídios totais (JOHANSEN, 1940), sulfato azul do Nilo para lipídios ácidos e neutros (CAIN, 1947), ácido rubeânico para ácidos graxos (GANTER & JOLLÉS, 1970), tetróxido de ósmio para lipídios insaturados (GANTER & JOLLÉS, 1970), cloreto férrico para compostos fenólicos totais (JOHANSEN, 1940), vanilina clorídrica para taninos (MACE & HOWELL, 1974), floroglucinol ácido para lignina (JOHANSEN, 1940), reagente de Wagner (FURR & MAHLBERG, 1981), de Dittmar (FURR & MAHLBERG, 1981) e de Dragendorff (SVENDSEN & VERPOORTE, 1983) para alcalóides, reagente de Nadi para óleos essenciais e óleo-resinas (DAVID & CARDE, 1964), tricloreto de antimônio para esteróides (MACE *et al.*, 1974), ácido sulfúrico (GEISSMEN & GRIFFIN, 1971) e reação de Abraham (CANIATO *et al.*, 1989) para lactonas sesquiterpênicas, 2,4-dinitrofenilhidrazina para terpenóides (GANTER & JOLLÉS, 1970), e ácido clorídrico e ácido nítrico para cristais de oxalato de cálcio (CHAMBERLAIN, 1932). O azul de

toluidina foi utilizado para metacromasia (O'BRIEN *et al.*, 1964) e contracoloração com Lugol, e a luz polarizada usada para evidenciar a presença de substâncias anisotrópicas, em especial, cristais e amido (PEARSE, 1972; GAHAN, 1984).

Para a comparação dos resultados foram utilizados os controles. O branco (material sem aplicação de corantes ou reagentes) foi utilizado para determinação de possível pigmentação natural de compostos que poderiam interferir na coloração com os reagentes, de acordo com as recomendações de ASCENÇÃO (2004).

Todos os testes histoquímicos propostos foram utilizados em material fresco e em material fixado, para a observação da possível atividade extratora ou modificadora do fixador/ solução de estoque sobre os diferentes compostos e, quando possível, também em material incluído em metacrilato, visando a melhor observação de compostos presentes em pequena quantidade como também para a comparação dos resultados obtidos.

Foram obtidas imagens das seções transversais dos cotilédones em microscópio de luz (Olympus AX-70), equipado com filtros de polarização, sistema fotográfico U-photo, câmera e microcomputador com o software Spot-Basic.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* apresentam estrutura dorsiventral típica de Leguminosas, com duas a três camadas de células alongadas e justapostas na face adaxial, e várias camadas de células isodiamétricas e com arranjo compacto na face abaxial. IRVING (1984) relata a mesma organização para outras leguminosas. A protoderme se encontra bastante evidente, bem como os cordões procambiais, dispostos ao longo da região mediana de cada cotilédone. Entre os cordões procambiais, destacam-se grandes cavidades secretoras, bastante diferenciadas na semente madura.

As paredes celulares, em todos os tecidos cotiledonares, são delgadas e pectocelulósicas, apresentando pectinas com o teste com vermelho de rutênio, como também pela coloração azul-arroxeadada do azul de toluidina. Apenas as paredes periclinais externas das células protodérmicas apresentam mucopolissacarídeos ácidos, constatado pelo teste com azul de alciano (Tabela 1), o que indica um maior grau de hidrofiliabilidade a essa região.

Os cotilédones corados pelo PAS também evidenciaram as paredes celulares e presença de grãos de amido (Tabela 1). Através do método do PAS, pode-se evidenciar além da parede celular e grãos de amido, outros polissacarídeos neutros, uma vez que o ácido periódico oxida hidroxilas de carbonos vicinais, rompendo a ligação entre os mesmos, e produzindo dois radicais carbonila no local (PEARSE, 1961). Esses radicais se ligarão ao reagente de Schiff através de ligações covalentes (MELLO & VIDAL, 1978).

O mesofilo cotiledonar apresenta-se rico em lipídios e proteínas, com reação positiva para esses dois compostos em todos os testes utilizados (Tabela 1). Lipídios totais são evidenciados com os testes com sudões (III, black B e vermelho escarlate) como grandes corpos oleaginosos, que variam de 15 a 30µm de diâmetro, em todo o mesofilo cotiledonar e na protoderme, sendo predominantes na face abaxial dos cotilédones (Figura 1A-C).

Em sementes, os lipídios armazenados são frequentemente referidos como esferossomos (SOROKIN, 1967; GUIMARÃES, 1999), oleossomos (BEWLEY & BLACK, 1983), vesículas lipídicas (MOLLENHAUER & TOTTEN, 1971), corpos lipídicos (TRELEAVE & DOMAN, 1984; FEUSSNER *et al.*, 1995; BUCKERIDGE *et al.*, 2004), ou corpos oleaginosos (BEWLEY & BLACK, 1983; MURPHY, 1990; HUANG, 1992; TZEN, *et al.*, 1993). A controvérsia acerca da nomenclatura tem sido discutida por diversos

autores (SOROKIN, 1967; BEWLEY & BLACK, 1983; MURPHY, 1990; HUANG, 1992), porém, observa-se, uma tendência à adoção do termo “corpo lipídico” ou “corpo oleaginoso”. De acordo com as definições de VOET *et al.* (2000), sugere-se como mais adequado, para sementes, cujo conteúdo armazenado constitui comumente apenas triacilgliceróis, o termo corpo oleaginoso, pois o termo corpo lipídico, mais generalista, se adequaria melhor a organelas cujo conteúdo de moléculas biológicas hidrofóbicas não seja tão bem definido.

Entretanto, há um consenso de que os corpos oleaginosos são formados por lipídios neutros, os triacilgliceróis, limitados com membrana única constituída de fosfolipídios e proteínas específicas (oleosinas) que conferem estabilidade ao envoltório, prevenindo sua coalescência (TRELESE & DOMAN, 1984; MURPHY, 1990; HUANG, 1992; TZEN *et al.*, 1993; FEUSSNER *et al.*, 1995; BUCKERIDGE *et al.*, 2004, TAIZ & ZEIGER, 2004).

Os corpos oleaginosos são organelas geralmente esféricas, pequenas, com diâmetro uniforme, que em geral varia de 0,2 a 6µm, conforme a espécie (BEWLEY & BLACK, 1983; TZEN, *et al.*, 1993; GUIMARÃES, 1999; BUCKERIDGE *et al.*, 2004). Em *C. peltophoroides*, os corpos oleaginosos visualizados são muito maiores. Esse maior diâmetro pode ser devido a uma menor concentração de proteínas na superfície de tais corpos oleaginosos e uma conseqüente tendência a coalescência em corpos maiores (MURPHY, 1990) ou poderiam ser resultado da fusão de inúmeros corpos menores, causada pelo seccionamento dos cotilédones com navalha durante o processo de preparo das lâminas. Segundo SOROKIN (1976), pequenas mudanças nas condições do meio, como aplicação de corantes, poderiam causar a coalescência dos corpos oleaginosos. Entretanto, neste estudo, observando-se o branco (Figura 1A), onde não há uso de corantes ou reagentes sobre o material seccionado, e os testes para lipídios (Figuras 1B-F), nota-se que o padrão dos corpos oleaginosos não mudou após os testes, mas talvez com o seccionamento.

A composição dos corpos oleaginosos é, predominantemente, de lipídios neutros, evidenciados pela coloração rosada conferida pelo sulfato azul do Nilo (Figura 1D), o que confirma o conteúdo de triacilgliceróis no interior dos corpos oleaginosos (TRELESE & DOMAN, 1984; MURPHY, 1990; HUANG, 1992; TZEN, *et al.*, 1993; FEUSSNER *et al.*, 1995). O teste com ácido rubeânico, mostra ausência de ácidos graxos livres nos lipídios de reserva, dentro dos corpos oleaginosos (Figura 1E), mas estes aparecem intensamente corados fora dos corpos oleaginosos, no citosol. O padrão de

coloração do ácido rubeânico coincide com a coloração azul conferida pelo sulfato azul do Nilo (Figura 1E), indicando que os ácidos graxos poderiam estar compondo os chamados lipídios ácidos, indicados pelo sulfato azul do Nilo na cor azul.

O teste com tetróxido de ósmio marca lipídios insaturados presentes dentro dos corpos oleaginosos (Figura 1F). Na presença de lipídios insaturados (compostos por ácidos graxos que contenham duplas ligações), o tetróxido de ósmio é reduzido formando um composto negro (ASCENÇÃO, 2004).

No material incluído em glicol-metacrilato, que manteria maior integridade da estrutura celular, o lipídio não pode ser evidenciado por nenhum teste histoquímico, pela provável extração desse grupo de compostos durante a inclusão.

As proteínas totais foram melhor evidenciadas pelo teste com xylydine Ponceau (Figura 2A), onde aparecem como estruturas globosas, com 5 a 10µm de diâmetro, denominadas por vários autores como corpos protéicos (TROMBS, 1967; DALLING & BHALLA, 1984; VIDAL & PIMENTEL, 1985; RENA, 1987; GUIMARÃES, 1999; MÜNTZ *et al.*, 2001; BUCKERIDGE *et al.*, 2004), ou vacúolos protéicos (STONE & GIFFORD, 1997). Os corpos protéicos, termo mais aceito por ser generalista, são estruturas vacuolares que acumulam proteína de reserva, mas que também podem conter outras substâncias em menor proporção (TROMBS, 1967; VIDAL & PIMENTEL, 1985; BUCKERIDGE *et al.*, 2004). As proteínas foram bem evidenciadas em cotilédones frescos, fixados e incluídos em glicol-metacrilato, aparecendo em maior quantidade e com maior definição na face adaxial dos cotilédones.

Ainda em relação às reservas de lipídios e proteínas, evidencia-se alguma compartimentalização no mesofilo cotiledonar. Apesar de ambos compostos estarem presentes em todo mesofilo, nota-se maior concentração protéica na face adaxial e predomínio de lipídios na face abaxial dos cotilédones. Essa compartimentalização das reservas, segundo BEWLEY E BLACK (1994), pode estar relacionada com a degradação que se apresenta como um processo ordenado espacialmente, sendo que o início tende a ser sempre nas células próximas aos feixes vasculares.

O amido, corado com Lugol (Figuras 2B), encontra-se distribuído por todo o mesofilo cotiledonar, em pequenos amiloplastos com um número variado de grãos de amido (1 a 4µm de diâmetro), de forma semelhante ao relatado para outras leguminosas (IRVING, 1984; HEGNAUER & GPAYER-BARKMEIJER, 1993; SILVA *et al.*, 1998). Sabe-se que este material de reserva é estocado de forma que as diversas moléculas de amilose e amilopectina se disponham circularmente a partir de um centro de nucleação. Essa

disposição faz com que esses grânulos sejam birrefringentes e apresentem um aspecto característico em forma de uma figura de interferência, “cruz de malta”, normalmente observado neste tipo de reserva (GAHAN, 1984; VIDAL, 1987). Entretanto, devido as suas pequenas dimensões, os grãos de amido deste material apresentam baixa birrefringência sob luz polarizada e só podem ser bem evidenciados em material incluído em glicol-metacrilato. O mesmo resultado também foi relatado para sementes de amendoim (IRVING, 1984).

Com algumas exceções, sementes de leguminosas com baixo teor de lipídio, acumulam mais amido. Dessa forma, observa-se que grande parte das sementes com baixos teores de amido apresentam altos teores de lipídio e/ou proteínas (WOLFF & KWOLEK, 1971; BEEVERS, 1976; IRVING, 1984; SILVA, 1995). Essa afirmação confirma-se neste trabalho para sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

Nesse contexto, o estudo dos carboidratos de reserva armazenados em sementes tem sido aplicado como ferramenta na classificação taxonômica de espécies de leguminosas. Muitas Papilionoideae armazenam grandes quantidades de amido em suas sementes, e isto inclui a maioria das Phaseoleae, Viciae, Cicereae e Swartzieae. Em outras tribos dessa subfamília, a ocorrência do amido é pequena ou ausente, e nas Caesalpinioideae, a reserva de grãos de amido constitui uma exceção. Em Mimosoideae, a situação é similar, entretanto, ocorre reserva de pequenos grãos de amido, em frequência um pouco maior (HEGNAUER & GPAYER-BARKMEIJER, 1993).

Com distribuição restrita à face adaxial dos cotilédones e, principalmente, próximos aos cordões procambiais, cristais de oxalato de cálcio são evidenciados com o uso da luz polarizada (Figuras 2C e D), e sua natureza química confirmada pelos testes com ácido clorídrico e ácido nítrico. Os cristais são do tipo drusa, com estrutura compacta e tamanho reduzido (1 a 8µm de diâmetro), os quais, sob luz polarizada, apresentam uma figura de interferência, a “cruz de malta”, semelhante à encontrada em grãos de amido sob essa condição. A forte birrefringência de inclusões de oxalato de cálcio tem sido descrita devida ao arranjo atômico anisotrópico regular (GAHAN, 1984). SOARES *et al.* (2002), utilizando apenas luz polarizada para detecção de amido em sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, provavelmente tomaram os cristais de oxalato de cálcio por grãos de amido, uma vez que descrevem a distribuição dos amiloplastos como restrita à face adaxial dos cotilédones e não descrevem uso de testes específicos para amido e para oxalato de cálcio.

No presente trabalho, tanto o material fresco, como o material fixado e o incluído em glicol-metacrilato mostraram-se adequados à observação dos cristais sob luz polarizada.

Os testes utilizados para a detecção de compostos fenólicos, alcalóides e terpenóides foram negativos em todo o mesofilo cotiledonar, mas as cavidades secretoras revelaram presença de compostos fenólicos (Tabela 1). Assim, os testes para alcalóides e terpenóides não foram repetidos em material fixado ou incluído, apenas os testes para verificação de compostos fenólicos, que apresentaram resultados equivalentes aos obtidos em material fresco (Figura 3).

Nas cavidades secretoras, os compostos fenólicos constituem o principal produto secretado (Tabela 1), evidenciado pelo teste com cloreto férrico e pela coloração esverdeada do azul de toluidina (Figura 3B-C), embora o teste com vanilina clorídrica indique ausência de taninos (Tabela 1).

Segundo CASTRO & MACHADO (2004), dificilmente se consegue fazer uma distinção rígida quanto à natureza do material secretado, porque as secreções são, de modo geral, complexas e constituídas por inúmeros compostos. Entretanto, apesar de haver mistura, há predominância de um composto ou grupo de compostos, como no caso de *C. peltophoroides*, o que sugere especificidade na atividade das células secretoras.

Em função da composição química da secreção, sugere-se que as cavidades presentes abundantemente nos cotilédones de *C. peltophoroides* tenham um papel ecológico mais relacionado à deterrência à herbivoria ou ao ataque de patógenos, assegurando a reprodução da espécie, que apresenta tegumento relativamente frágil e muito hidrofílico, e grande quantidade de reservas.

O epitélio dessas cavidades apresenta-se rico em lipídios, proteínas e amido, reagindo positivamente aos testes específicos para essas substâncias (Tabela 1; Figura 3C). Isso, provavelmente, se deve à alta atividade metabólica destas células, que estariam envolvidas na síntese da secreção destas cavidades. Segundo CASTRO & MACHADO (2004), estas células são diferenciadas para secretar e possuem numerosas características, tais como alta razão núcleo/citoplasma, numerosos vacúolos, grande quantidade de mitocôndrias, presença de protuberâncias da parede celular para o interior do lume da célula (projeções labirínticas), acompanhadas do equivalente aumento da membrana celular e plasmodesmas em grande número.

Os compostos do metabolismo primário (lipídios, proteínas e amido), descritos para esta semente, são compartimentalizados como materiais de reserva para posterior consumo durante a germinação, de maneira a prover o crescimento do embrião, servindo como fonte de energia para organização de novas estruturas celulares, constituindo um importante passo na disponibilização de substratos para manutenção do crescimento de plântulas (BORGES, 2003).

Embora a recomendação usual para as análises histoquímicas seja o uso de material fresco, a fixação do material em FAA₅₀ não modificou qualitativa ou quantitativamente os materiais de reserva como lipídio, proteína e amido, ou mesmo cristais e compostos fenólicos, quando observados sob microscopia de luz. Para uma avaliação mais detalhada sobre a compartimentalização desses compostos nas células, as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão seriam mais adequadas. A inclusão de material em glicol-metacrilato apenas não se mostrou adequada à análise de lipídios, portanto, foi mais conclusiva na observação dos amiloplastos e cristais, que neste material apresentam pequenas dimensões.

4. CONCLUSÃO

A análise histoquímica indica que as sementes de *Caesalpinia peltophoroides* têm reservas predominantemente lipídicas, com presença de proteínas e, em menor quantidade, de amido. Ocorrem também cristais e, em cavidades secretoras, compostos fenólicos.

Pode-se recomendar o uso de material fresco ou fixado para a identificação dos principais materiais de reserva em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* - amido, proteína e lipídio - sendo que apenas os testes para lipídios não são viáveis em material incluído em glicol-metacrilato.

Tabela 1 – Testes histoquímicos aplicados em cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (+ presença; - ausência; o número de sinais expressa a intensidade da reação).

COMPOSTOS	TESTE	COTILÉDONE		CAVIDADE	
		Adaxial	Abaxial	Epitélio	Secreção
LIPÍDIOS					
Lipídios totais	Sudan III	++	+++	+	-
	Vermelho escarlate	++	+++	+	-
	Sudan black	++	+++	+	-
Lipídios ácidos e neutros	Sulfato azul do Nilo	++	+++	+	-
Ácidos graxos	Acetato de cobre/ácido rubeânico	++	+++	+	-
PROTEÍNAS					
Proteínas totais	Azul mercúrio de bromofenol	+++	++	+	-
	Xylidine Ponceau	+++	++	+	-
CARBOIDRATOS					
Polissacarídeos neutros	PAS	+*	+*	-	-
Amido	Lugol	++	++	++	-
Pectinas	Vermelho de rutênio	-	-	-	-
Mucopolissacarídeos ácidos	Azul de alciano	-	-	-	-
COMPOSTOS FENÓLICOS					
Compostos Fenólicos gerais	Cloreto de ferro III	-	-	+	+++
	Azul de toluidina	-	-	+	+++
	Azul de astra/fuccina	-	-	+	+++
Taninos	Vanilina clorídrica	-	-	-	-
Ligninas	Floroglucinol	-	-	-	-
ALCALÓIDES					
Alcalóides gerais	Reagente de Wagner	-	-	-	-
	Reagente de Dittmar	-	-	-	-
	Reagente de Dragendorff	-	-	-	-
TERPENÓIDES					
Óleos Essenciais	Reagente de Nadi	-	-	-	-
Esteróides	Tricloreto de antimônio	-	-	-	-
Lactonas Sesquiterpênicas	Ácido sulfúrico	-	-	-	-
	Reação de Abraham	-	-	-	-
Terpenóides	2,4-dinitrofenilhidrazina	-	-	-	-

*somente paredes celulares

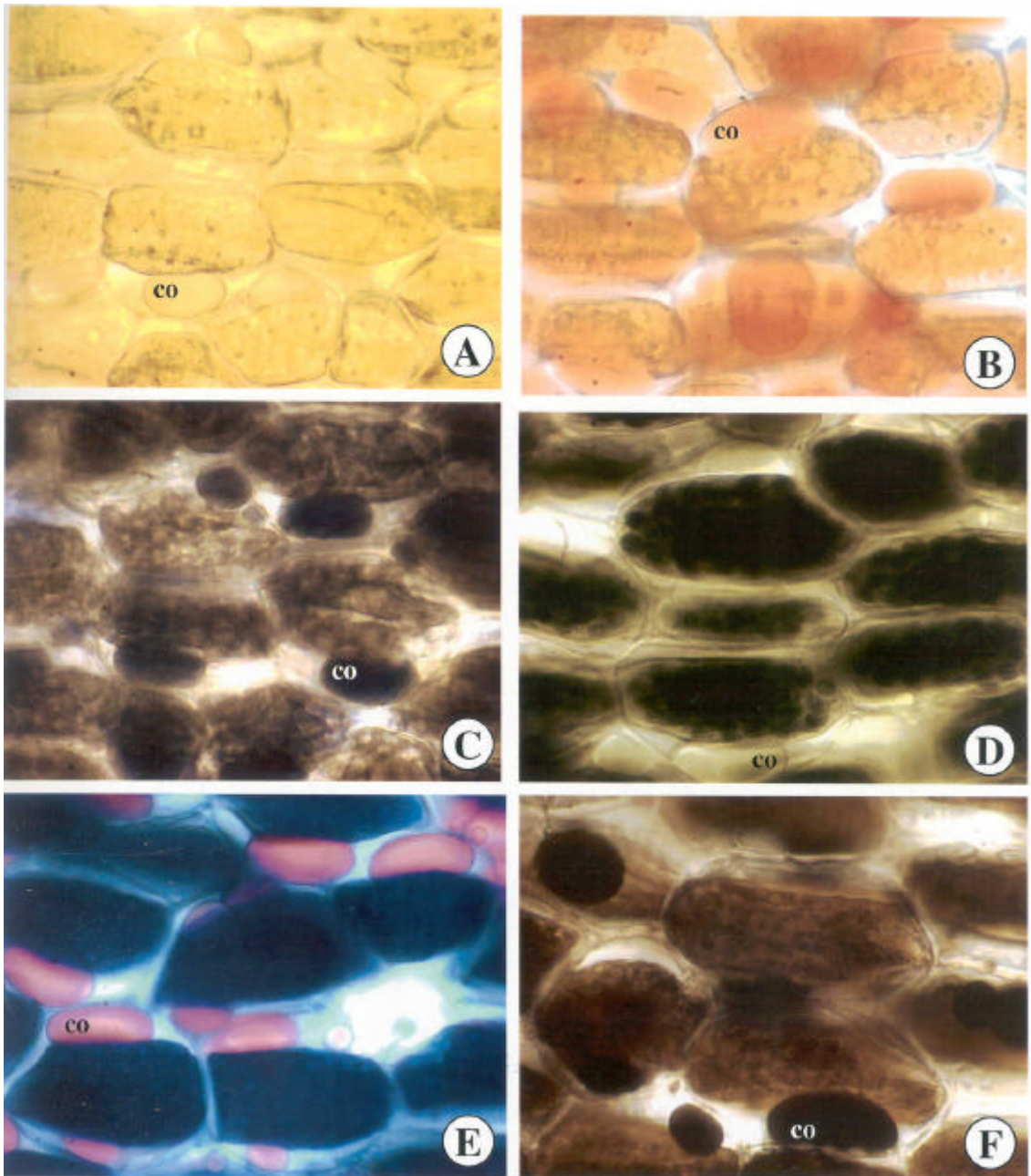


Figura 1: Seções transversais de cotilédone de *Caesalpinia peltophoroides* submetidas a diferentes corantes e reagentes. A: branco; B: sudan III (cor laranja: lipídeos totais); C: sudan black B (cor preta-azulada: lipídeos totais); D: ácido rubeânico (cor verde escura: ácidos graxos); E: sulfato azul do Nilo (cor rosa: lipídeos básicos, cor azul lipídeos ácidos); F: tetróxido de ósmio (cor preta: lipídeos insaturados); co: corpos oleaginosos.

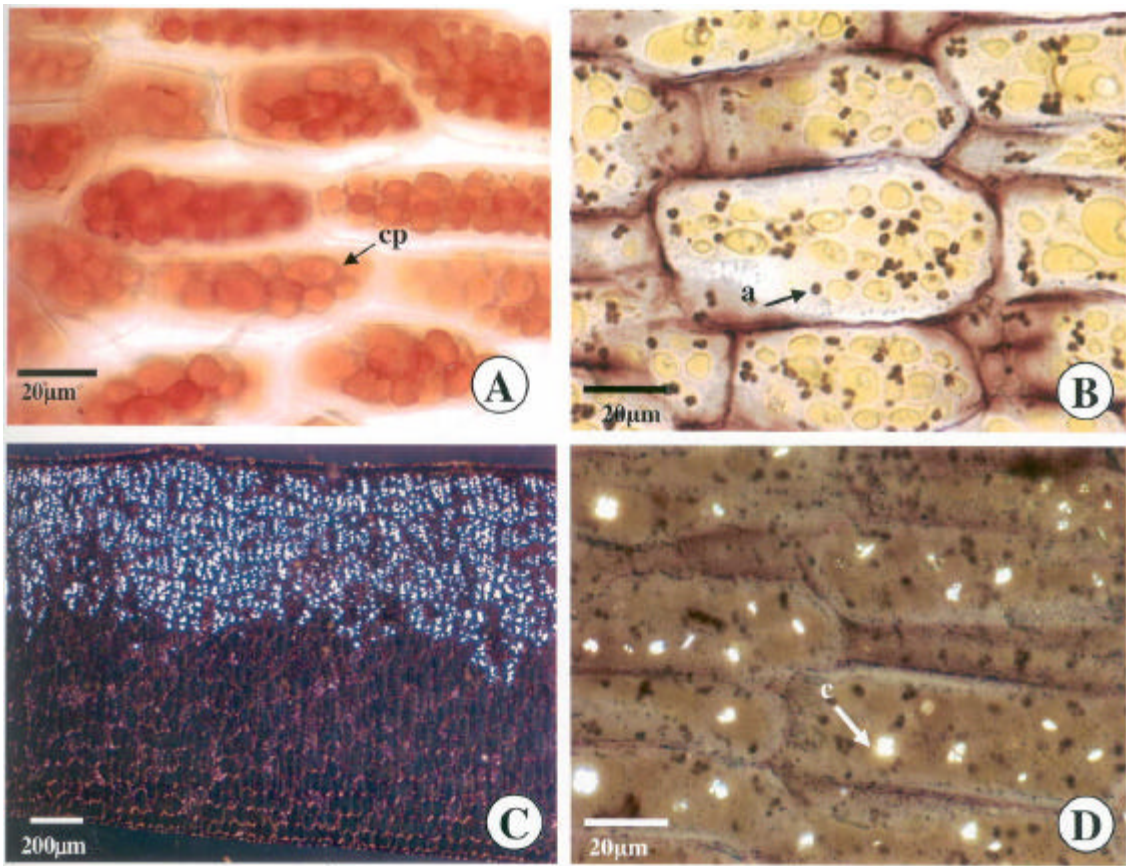


Figura 2: Seções transversais de cotilédone de *Caesalpinia peltophoroides* A: xylydine Ponceau (cor vermelha: corpos protéicos); B: azul de toluidina e lugol (cor preta: amido); C e D: sob luz polarizada. cp: corpos protéicos; a: amido; c: cristal.

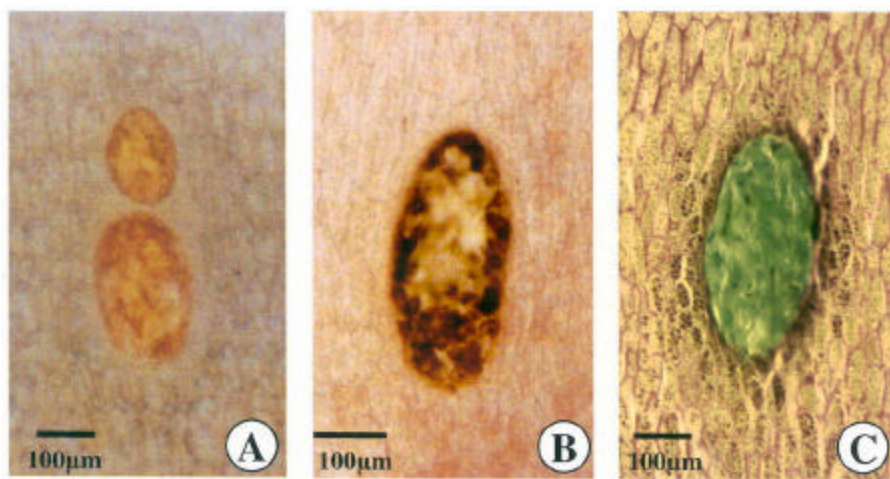


Figura 3: Detalhe das cavidades secretoras em seções transversais de cotilédone de *Caesalpinia peltophoroides* submetidas a diferentes corantes e reagentes. A: branco; B: cloreto férrico (cor preta: compostos fenólicos); C: azul de toluidina e lugol (cor verde: compostos fenólicos, cor preta no epitélio: amido).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASCENSÃO, L. Métodos histoquímicos em vegetais. In: TÓPICOS ESPECIAIS EM HISTOQUÍMICA VEGETAL, 1, 2004, Viçosa. **Apostila**. Viçosa:UFV, 2004. 22p.
- BALERONI, C.R.S.; FERRARESE, M.L.L.; COSTA, S.C.; SOUZA, N.E.; FERRARESE-FILHO, O. Isocitrate lyase activity and mobilization of lipids and carbohydrates in cotyledons of canola. **Rev. Bras. Fisol. Veg.**, v.9, n.3, p.189-192, 1997.
- BEEVERS, H. Microbodies in higher plants. **Annu Rev Plant Physiol** v.30, p.159–193, 1979.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. Vol.1, New York, 1983.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M.. **Seeds: Physiology of development and germination**, 2nd. New York: Plenum, 1994.
- 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. **Revista Cerne**, vol.8, n.1, p.69-76, 2002.
- BORGES, E.E.L. **Comportamento bioquímico e fisiológico de sementes florestais nativas durante a embebição**. Tese de doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 100 p., 2003.
- BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S.. Acúmulo de Reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- CAIN, A.J. The use of Nile Blue in the examination of lipids. **Quarter. J. Microsc. Sci.**, v.88, p.111-116, 1991.
- CANIATO, R.; FILIPPINI, R.; CAPPELLETTI, E.M.; APPENDINO, G. Detection of peroxides in intact plant material. **Fitoterapia LX**, p.549-551, 1989.
- CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Técnica de inclusão de material vegetal em historresina. In: ENCONTRO REGIONAL DE ANATOMISTAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1, 1995, Rio Claro. **Apostila**. Rio Claro: UNESP, 1995. 7p.

- CARVALHO, J.E.U.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Funep, p.588, 2000.
- CASTRO, M.M; MACHADO, S.R. Células e tecidos secretores. In: Appezato-da-Glória, B.; Carmello-Guerreiro, S.M. **Anatomia Vegetal**. Editora UFV, 179-204, 2004.
- CHAMBERLAIN, C.J. **Methods in plant histology**. 5^a ed. Chicago, The University of Chicago Press, 416 p., 1932.
- DALLING, M.J.; BHALLA, P. Mobilization of nitrogen and phosphorus from endosperm. In: Murray, D.R. **Seed Physiology: Germination and reserve mobilization**. vol. 2, 295 p., 1984.
- DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. **C. R. Acad. Sci. Paris**, 258, p.1338-1340, 1964.
- FEDER, N., OBRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **Amer. J. Bot.**, v.55, n.1, p.123-142, 1968.
- FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C.; KINDL, H.;KÜHN, H. Lipoxygenase-catalysed oxygenation of storadge lipids is implicated in lipid mobilization during germination. **Plant Biology**, v.2, p.11849-11853, 1995.
- FURR, M., MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **J. Nat. Prod.**, v.44, p.153-159, 1981.
- GAHAN, P.B. **Plant histochemistry and citochemistry. An introduction**. Academic Press, p.101-145, 1984.
- GANTER, P., JOLLÉS, G. Histologie normale et pathologique. v.1 e 2. Paris: Gauthier-Villars, 1969,1970.
- GEISSMAN T.A.; GRIFFIN, T.S. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. **Phytochemistry**, v.10, p.2475-2485, 1971.
- GUIMARÃES, R.M. **Fisiologia de sementes**. Lavras:UFLA/ FAEPE, 79 p., 1999.
- HEGNAUER, R.; GPAYER-BARKMEIJER, R.J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**. Vol.34, n.1, pag. 3-16, 1993.
- HUANG, A.H.C. Oil bodies and oleosins in seeds. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** v.43, p.177–200, 1992.

- IRVING, D.W. Seed structure and histochemistry of *Prosopis velutina* (Leguminosae). **Botanical Gazette**, 145(3), pag. 340-345, 1984.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 423p.
- LEVIN, D.A. The oil content of seeds: an ecological perspective. **The American Naturalist**, vp. 108, n.960, p. 193-206, 1974.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, p.352, 2002.
- MACE, M.E.; BELL, A.A.; STIPANOVIC, R.D. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. **Phytopathol.**, v.64, p. 1297-1302, 1974.
- MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Can. J. Bot.** v.52, p.2423-2426, 1974.
- MAZIA D., BREWER, P.A., ALFERT, M. The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. **Biol. Bull.**, v.104, p.57-67, 1953.
- MOLLENHAUER, H.H; TOTTEN, C. Studies on seeds. I. Origin and degradation of vesicles in pea and bean cotyledons. **The Journal of Cell Biology**, v.48, p.395-405, 1971.
- MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.362, p.1741-1752, 2001.
- MURPHY, D.J. Storage lipid bodies in plants and other organisms. **Progress in Lipid Research**, v.29, n.4, p.299-324, 1990.
- O'BRIEN, T. P., FEDER, N., McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p.368-373, 1964.
- O'BRIEN, T. P., McCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne : Termarcaphy PTY Ltd., 1981.
- ROESER, 1972. In: Kraus, J.E.; Arduin, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, RJ: EDUR, 1997, 198 p.

- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applied**. v.2. 4.ed. Longman Group Limited, 1980.
- PIZZOLATO, T.D.; LILIE, R.D. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *J. Histochem. Cytochem.*, v.21, p.56-64, 1973.
- PONTES, A. P.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; SOARES, C. P. B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v.26, n.5, p.593-601, 2002.
- PRITCHARD, S.L.; CHARLTON, W.L.; BAKER, A.; GRAHAM, L.A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis. **The Plant Journal**. Vol. 31, n.5, p. 639-647, 2002.
- SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; ALMEIDA, K. A.; RIGONI, M. R. Efeito do álcool e substrato na germinação de sementes de sibipiruna (*Caesalpinia pelthophoroides* Benth.) colhidas no chão e retiradas da vagem. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.2, p.389-392, 2003.
- SILVA, T.R.G. **Compostos de reserva em sementes de *Dalbergia miscolobium* Benth.: caracterização histo e bioquímica e variação durante a germinação**. (Tese de Doutorado) Universidade Estadual de Campinas: Campinas, 1995.
- SILVA, T.R.G.; CORTELAZZO, A.L.; DIETRICH, S.M.C. Variations in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. **Revista Bras. Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p.119-124, 1998.
- SNELL, T.W. Effects of density on seed size and biochemical composition. **American Midland Naturalist**, vol.95, n.2, p.499-507, 1976.
- SOROKIN, H.P. The spherosomes and the reserve fat in plant cells. **Amer. Journal Botany**, v.54, n.8, p.1008-1016, 1967.
- STONE, S.L.; GIFFORD, D.J. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early-seedling growth. I. Storage protein reserves. **International Journal Plant Science**, v.158, n.6, p.727-737, 1997.
- SVENDSEN, A. B., VERPOORTE, R. **Chromatography of alkaloids**, New York: Elsevier Scientific Publishing Company, 1983.
- SOARES, M.G.; ROSSIGNATTI, F.; YAMAUCHI, M.; CORTELAZZO, A.L.; SILVA, T.R.G. Padronização de sementes e análise topoquímica das reservas de

- Caesalpinia peltophoroides Benth e Clitoria fairchildiana Howard. **In. Resumos XIV Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo**, 2002.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.
- TRELEASE, R.N.; DOMAN, D.C. Mobilization of oil and wax reserves. In: Murray (ed.), D.R. **Seed physiology: germination and reserve mobilization**. Academic Press, v.2, p. 201-245, 1984.
- TROMBS, M.P. Protein bodies of the soybean. **Plant Physiology**, n.42, p.797-813, 1967.
- TZEN, J.T.C.; CAO, Y.; LAURENT, P.; RATNAYAKE, C.; HUANG, A.H.C. Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. **Plant Physiology**, v.101, p.267-276, 1993.
- VÁZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, n.24, p.69-87, 1993.
- VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Mol. Biol.**, v.22, p.45-64, 1977.
- VIDAL, B.C.; PIMENTEL, E.R. Caracterização bioquímica, topoquímica e estrutural dos corpos protéicos do feijão macuco ou jacatupé (*Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng). **Revista Brasileira de Botânica**, n.8, p.223-229, 1985.
- VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Fundamentos de bioquímica. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- WOLFF, I.A.; KWOLEK, W.F. Lipids of the leguminosae. In: Harborne, J.B.; Boulter, D.; Turner, B.L. (ed.). **Chemotaxonomy of leguminosae**. London, London Academic, p.231-255, 1971.

CAPÍTULO II

**ASPECTOS HISTOQUÍMICOS DA MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS EM
SEMENTES DE *CAESALPINIA PELTOPHOROIDES* (BENTH.) -
LEGUMINOSAE – DURANTE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO
INICIAL DAS PLÂNTULAS**

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o estudo da mobilização de reservas de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. As variações nesses compostos foram analisadas desde o período pré-germinativo (0 a 5 dias após a semeadura - DAS) até a total senescência e abscisão dos cotilédones, aos 35 DAS. Para isso, foram realizados testes histoquímicos em cotilédones fixados em FAA₅₀ ou incluídos em glicol-metacrilato. Para acompanhamento da mobilização dos principais compostos de reserva, foram usados o sudan III para detecção de lipídios totais, xylidine Ponceau para proteínas totais, Lugol para amido e luz polarizada para visualização dos cristais. Os lipídios, presentes em maior quantidade nos cotilédones, apresentam gradativo decréscimo no período estudado. No 10º DAS, observa-se maior quantidade de amido que nos períodos anteriores, sendo totalmente consumido até os 30 DAS. O padrão de distribuição e a morfologia do material protéico modificaram-se bastante até os 10 DAS, período em que foi intensamente consumido, restando apenas fragmentos parietalmente distribuídos, que praticamente desaparecem após 25 DAS. As drusas de oxalato de cálcio não foram consumidas durante o período estudado, apenas houve aglutinação dos cristais.

Palavras-chave – mobilização de reserva, sementes, carboidratos, lipídios, proteínas, oxalato de Ca.

1. INTRODUÇÃO

Caesalpinia peltophoroides Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae), espécie conhecida popularmente como sibipiruna ou falso pau-brasil, possui potencial ornamental e madeireiro e está amplamente distribuída no Brasil, principalmente na região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro, sul da Bahia, São Paulo, Espírito Santo e no Pantanal Mato-grossense (LORENZI, 2002).

As características das sementes no que diz respeito às propriedades fisiológicas de sua latência, viabilidade e germinação, refletem a natureza do ambiente em que ocorre o estabelecimento das plantas que as produzem, de modo que estas características tendem a assegurar sua sobrevivência pelo condicionamento da germinação ao momento mais propício ao seu estabelecimento (PIÑA-RODRIGUES *et al.*, 1990). A germinação é o retorno do eixo embrionário de um estado quiescente ou dormente para um estado metabolicamente dinâmico, envolvendo eventos anatômicos ou morfológicos, genéticos, metabólicos e hormonais (JANN & AMEN, 1977; BORGES & RENA, 1993). Os substratos para essa rápida alteração metabólica são os compostos de reserva armazenados nas sementes (MANSFIELD & BRIARTY, 1996), que serão mobilizados para prover o crescimento do embrião (BUCKERIDGE *et al.*, 2000; PONTES *et al.*, 2002; BORGES, 2003).

As reservas armazenadas nas sementes consistem de moléculas complexas de carboidratos, proteínas e lipídios (BEWLEY & BLACK, 1994). A proporção dessa composição pode variar de espécie para espécie e até entre espécies de uma mesma família (BORGES & RENA, 1993). Essas substâncias de reserva são degradadas durante a germinação e crescimento pós-germinativo, provendo energia que servirá como combustível para as plântulas até que estas sejam suficientemente autotróficas (SILVA *et al.*, 1998; PRITCHARD *et al.*, 2002).

As sementes têm sido muito estudadas quanto à composição química de suas reservas e tal interesse não se dá apenas por seu teor nutritivo, mas por serem úteis na confecção de produtos industrializados (BUCKERIDGE *et al.*, 2004), entre diversos fins. Além disso, o conhecimento da composição química é do interesse prático da tecnologia de sementes, porque, tanto o vigor como o potencial de armazenamento de sementes são influenciados pelo teor dos compostos presentes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

A mobilização das reservas tem sido mostrada seguindo-se à germinação e acompanhando o subsequente crescimento do eixo embrionário (DAVIES & SLACK, 1981). Assim, a hidrólise das proteínas nos órgãos de reserva de *Arachis hypogaea* (TZEN *et al.*, 1993 e BAGLEY *et al.*, 1963), *Glycine max* (TROMBS, 1967), *Pachyrhizus tuberosus* (VIDAL & PIMENTEL, 1985), *Prosopis velutina* (IRVING, 1984), *Pinus taeda* (STONE & GIFFORD, 1997), *Myrsine laetevirens* (OTEGUI *et al.*, 1998) e *Erythrina velutina* (OLIVEIRA *et al.*, 1998), é seguida da transmissão dos produtos proteolíticos para o eixo embrionário. Similarmente, a degradação das reservas de lipídio é correlacionada ao crescimento do eixo em várias espécies, tais como *Phaseolus sp.* (MOLLENHAUER & TOTTEN, 1971), *Impatiens balsamina*, *I. capensis*, *I. ballida* (NOZZOLILLO & THIE, 1984), *Gossypium hirsutum*, *Brassica juncea*, *Zea mays* e *Sesamum indicum* (TZEN *et al.*, 1993), *Cucumis sativus* e *Nicotiana tabacum* (FEUSSNER *et al.*, 1995), *Brassica napus* (TZEN *et al.*, 1993 e BALERONI *et al.*, 1997) e *Dalbergia miscolobium* (SILVA, *et al.*, 1997 e 1998). Carboidratos também são transferidos dos cotilédones para o crescimento do eixo embrionário como em *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* (CORTELAZZO, 1992), *Euphorbia heterophylla* (SUDA & GIORGINI, 2000) e *Senna macranthera* (BORGES *et al.*, 2002).

Recentemente, estudos acerca da fisiologia da germinação de sementes de *C. peltophoroides* têm sido desenvolvidos (PONTES *et al.*, 2002; BORGES, 2003). Entretanto, os principais compostos envolvidos na germinação e crescimento inicial dessa espécie ainda são pouco conhecidos.

Mudanças morfológicas nas sementes, durante a germinação são normalmente acompanhadas por mudanças fisiológicas (SILVA *et al.*, 1997), e algumas dessas alterações metabólicas nos compostos de reserva podem ser detectadas *in situ* por meio de técnicas histoquímicas específicas (SILVA *et al.*, 1998). Algumas mudanças estruturais relacionadas à degradação das reservas em sementes têm sido descritas (STONE & GIFFORD, 1997). Em soja, mudanças nos compostos de reserva foram detectadas *in situ* nos cotilédones durante a germinação (CORTELAZZO & VIDAL, 1991). Em jacarandá, resultados histoquímicos sugerem similar padrão de degradação das reservas de lipídios e proteínas durante a germinação e estabelecimento das plântulas (SILVA *et al.*, 1997). Assim sendo, as análises histoquímicas constituem uma ferramenta relevante para a avaliação do consumo de reservas da semente durante a germinação.

No presente estudo, tais técnicas foram aplicadas às sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, com o objetivo de caracterizar o processo de mobilização das reservas durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Caesalpinoideae-Leguminosae), colhidas na região de Viçosa, Minas Gerais, provenientes de um mínimo de 10 árvores. Durante o beneficiamento, foram eliminadas as sementes imaturas, deterioradas ou danificadas. As sementes foram tratadas com solução de Captan 0,5% por 60 segundos e colocadas para germinar em sementeira, com areia previamente esterilizada com brometo de metila (20cc. m⁻²).

Os cotilédones das sementes e plântulas foram coletadas a cada cinco dias, a partir da sementeura até a abscisão dos cotilédones, aos 35 dias, em cinco repetições, com 10 indivíduos cada (Figura 1). Desta forma, os tempos de coleta compreendem: T0 (semente quiescente), T5 (5 dias após a sementeura), T10 (10 dias após a sementeura), T15 (15 dias após a sementeura), T20 (20 dias após a sementeura), T25 (25 dias após a sementeura), T30 (30 dias após a sementeura) e T35 (35 dias após a sementeura).

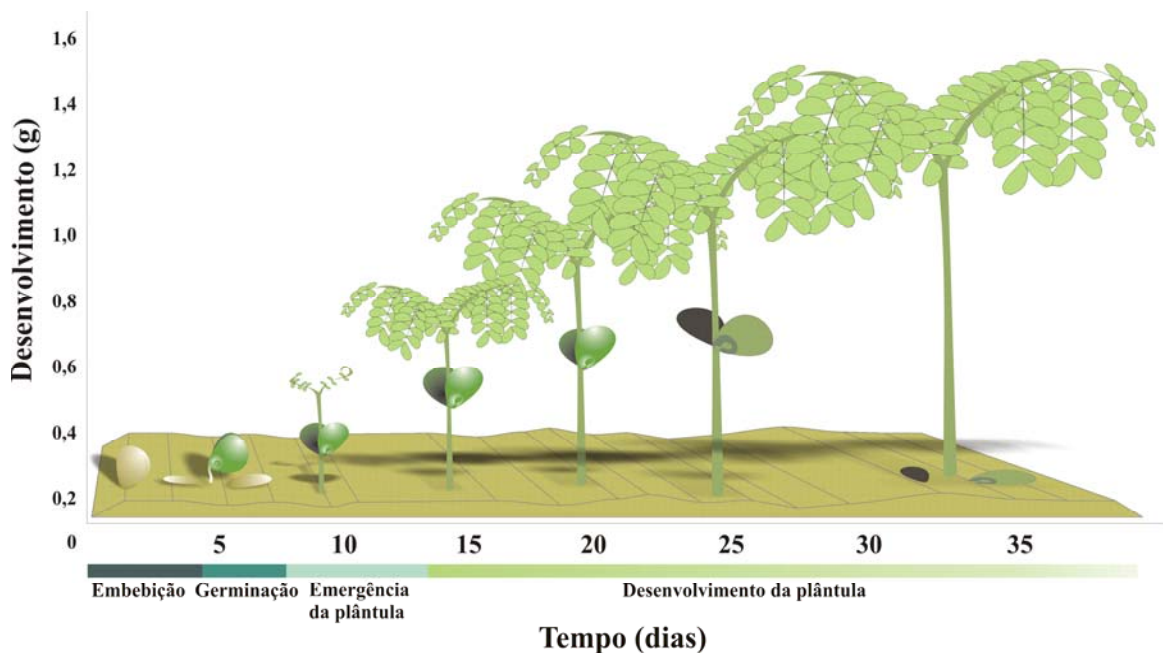


Figura 1 – Modelo esquemático das coletas dos cotilédones de *C. peltophoroides* durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.

Os cotilédones foram retirados das sementes e plântulas e fixados em FAA₅₀ por 48 horas, e estocados em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Para os estudos histoquímicos, foi selecionada a região mediana dos cotilédones, a qual foi seccionada em micrótomo de mesa, sem meio de inclusão, e também incluída em glicol-metacrilato (Historesin-Leica), conforme recomendação do fabricante e de CARMELLO-GUERREIRO (1995), e seccionada transversalmente em micrótomo rotativo com 7µm de espessura. Os cortes obtidos de material fixado (sem meio de inclusão) foram submetidos aos testes histoquímicos com sudan III para identificação de lipídios totais (JOHANSEN, 1940) e xylidine Ponceau (XP) para identificação de proteínas totais (VIDAL, 1977), sempre montados com gelatina glicerinada, e também submetidos ao teste com ácido acético e ácido nítrico para verificação da natureza química de cristais (CHAMBERLAIN, 1932). As lâminas obtidas a partir de material incluído em glicol-metacrilato foram coradas com azul de toluidina e submetidas ao teste com o reagente de Lugol para a detecção de amido (JOHANSEN, 1940), montadas em resina sintética (Permout), e também analisadas sob luz polarizada para a observação de cristais. Optou-se pela utilização de material incluído em glicol-metacrilato para a detecção de amido e cristais devido ao tamanho diminuto dos grãos de amido neste material, e também pela maior integridade das estruturas conferida pelo meio de inclusão, que também permite cortes mais finos, com maior qualidade de imagem ao microscópio de luz.

Foram obtidas imagens das seções transversais dos cotilédones, com os diferentes testes aplicados, em microscópio de luz (Olympus AX-70) equipado com filtros de polarização, sistema fotográfico U-photo, câmera e microcomputador com o software Spot-Basic.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cortes corados com Sudan III revelam grande quantidade de material lipídico nas células dos cotilédones das sementes de *C. peltophoroides* em T0 (Figura 2A). Em outras leguminosas, como *Dalbergia miscolobium* (SILVA *et al.*, 1997), *Arachis hypogaea* (TZEN, *et al.*, 1993) e *Helianthus annuus* (SOROKIN, 1967) as reservas lipídicas também foram encontradas em grande quantidade nas sementes.

Sementes armazenam triacilgliceróis como reservas nutricionais para a germinação e crescimento pós-germinativo das plântulas (MURPHY, 1990; HUANG, 1992; BUCKERIDGE *et al.*, 2004). Estes triacilgliceróis estão presentes em pequenos corpúsculos celulares, delimitadas por membrana de fosfolipídios e oleosinas (proteínas associadas), chamadas de corpos oleaginosos (TRELEAVE & DOMAN, 1984; HUANG, 1992; TZEN, *et al.*, 1993; FEUSSNER *et al.*, 1995; BUCKERIDGE *et al.*, 2004), ou gotas lipídicas (SOROKIN, 1976).

Observou-se redução gradativa nas reservas de lipídios até o 20º DAS (Figura 2), período no qual a plântula já se encontra com o primeiro par de folhas expandidas e cotilédones já senescêntes. A partir de então, a quantidade de lipídio remanescente no cotilédone torna-se insignificante, não sendo mais detectável. Isso mostra um consumo intenso dessa reserva pelas sementes, e permite sugerir o envolvimento direto do lipídio no suprimento energético para a germinação e estabelecimento das plântulas em sementes de *C. peltophoroides*.

No interior das células do mesofilo cotiledonar observa-se a presença de inúmeros corpúsculos globulares, intensamente corados com XP (Figura 3). Esses corpúsculos XP-positivos são estruturas vacuolares que acumulam proteína de reserva nas sementes e são denominados por vários autores como corpos protéicos (TROMBS, 1967; DALLING & BHALLA, 1984; VIDAL & PIMENTEL, 1985; SILVA *et al.*, 1997; MÜNTZ *et al.*, 2001; BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

Em T0 (Figura 3A), os cotilédones das sementes de *C. peltophoroides* apresentam muitos corpos protéicos. No entanto, a morfologia do material corado muda significativamente após o período de embebição (T5) (Figura 3B). Nessa fase, o

envoltório do corpo protéico expande-se, formando cavidades internas e o material XP-positivo dentro desse corpúsculo se restringe à cerca de $\frac{1}{3}$ de seu volume interno. Em seguida, em T10 (Figura 3C), verifica-se um acentuado desarranjo no padrão globular observado nos tempos anteriores. Nessa etapa, o material protéico encontra-se fragmentado pela degradação dos corpúsculos e deslocado parietalmente. A partir de então, restam apenas vestígios parietais de material protéico que serão digeridos e desaparecerão (Figuras 3D a H).

Resultados semelhantes foram relatados por BAGLEY *et al.* (1963) com sementes de amendoim, nas quais, ocorre a degradação das reservas de proteína dos cotilédones logo após a germinação. De forma semelhante ao que ocorre em *C. peltophoroides*, as maiores mudanças nas reservas de proteínas nas sementes de amendoim foram reveladas pela análise histoquímica entre 4 e 9 dias de germinação e, aos 15 dias, as células parenquimáticas mostravam ausência dos corpos protéicos ou fragmentos destes. Esse padrão de degradação protéica tem sido comumente observado em várias sementes oleaginosas (BAGLEY *et al.*, 1963; TROMBS, 1967; MANSFIELD & BRIARTY, 1996).

Sementes de *Euphorbia heterophylla* também apresentaram corpos protéicos em abundância, cuja fragmentação foi observada em apenas 24 horas após a embebição, e seu desaparecimento ocorreu gradualmente até o quarto dia (SUDA & GIORGINI, 2000).

Os corpos protéicos são formados principalmente por proteínas, mas exibem inclusões (globóides ou cristalóides), ácido fítico, enzimas hidrolíticas (proteases e fitases), radicais catiônicos e ácido ribonucléico (PERNOLLET, 1978). A presença de inclusão globular característica dos corpos protéicos correspondem à fitina, a principal reserva de fósforo, além, eventualmente, de outras inclusões (DALLING & BHALLA, 1984). Resultados histoquímicos descritos por IRVING (1984) e OTEGUI *et al.* (1998) caracterizaram a presença de inclusões do complexo fitina em corpos protéicos. Os autores sugerem que os corpos protéicos, ricos em fitina, teriam função associada com reserva de minerais (P, K, Mg, Ca). A fitina é um complexo insolúvel de ácido fítico com radical catiônico (DALLING & BHALLA, 1984). Aliado a isso, a coloração através do XP atua na detecção de radicais catiônicos totais (VIDAL, 1987). Assim, esse padrão de inclusão, característico nos corpos protéicos, poderia superestimar a composição protéica do tecido.

Sementes de *C. peltophoroides* apresentaram grãos de amido muito pequenos e em pequena quantidade, distribuídos uniformemente nos cotilédones de sementes em T0

(Figura 4A), semelhante ao que ocorre em outras leguminosas (BAGLEY, *et al.*, 1963; IRVING, 1984; HEGNAUER & GPAYER-BARKMEIJER, 1993; SILVA *et al.*, 1998).

Observações *in situ* destes grãos mostraram aumento entre o T5 e T15 (Figura 4B a D), estágio no qual a plântula já está estabelecida. Este período coincide com a fase de intensa degradação das reservas lipídicas (figura 2B-D), o que pode ter contribuído para esse aumento temporário das reservas de amido, uma vez que a rota bioquímica de degradação dos lipídios, que envolvem a β -oxidação e o ciclo do glioxilato, levam à síntese de sacarose, via gliconeogênese, e esta, quando presente em altas concentrações no citosol, pode ser temporariamente armazenada como amido (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). O mesmo resultado também foi observado para sementes de *Dalbergia miscolobium* (SILVA *et al.*, 1998) e *Arabidopsis thaliana* (MANSFIELD & BRIARTY, 1996).

A partir de T10 (Figura 4C), observa-se clara organização parietal dos grãos de amido nas células cotiledonares. Esta organização permanece até a completa degradação dos grãos de amido, que geralmente ocorre até T25 (Figura 4F). Resultados semelhantes foram observados por CORTELAZZO (1992), em sementes de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata*, em que a quantidade e o tamanho dos grãos de amido diminuíram após a embebição, com esgotamento quase total por volta dos 20 e 30 dias, respectivamente. Essa diminuição no conteúdo de amido pode estar relacionada à sua degradação para produção de glicose como fonte de energia para as diversas reações metabólicas em curso durante a germinação e crescimento inicial das plântulas, bem como fonte de glicose para biossíntese de celulose (SILVA *et al.*, 1998).

Outro aspecto característico observado em sementes de *C. peltophoroides*, é uma evidente organização no processo de mobilização das reservas de amido. Estas são consumidas preferencialmente da face abaxial dos cotilédones em direção a face adaxial. Observa-se que em T20 (Figura 4E) a face abaxial já não apresenta mais grãos de amido, enquanto que na face adaxial a completa exaustão só acontece em T30 (Figura 4G).

Pequenos cristais de oxalato de cálcio, do tipo drusa, aparecem sempre próximos aos corpos protéicos. Esses cristais são evidenciados por sua birrefringência característica com o uso da luz polarizada, e sua natureza química confirmada pelos testes com ácido clorídrico e ácido nítrico. Não foi observado consumo dos cristais de oxalato de cálcio ao longo de todo o período de germinação e estabelecimento inicial das plântulas (Figura 5), entretanto, a partir de T10, houve um agrupamento das drusas

presentes em cada célula, que assim permaneceram até o último período de avaliação (Figura 6). Isto indica que o acúmulo de cálcio nos cotilédones de *C. peltophoroides*, na forma de cristais de oxalato de cálcio, não teriam função de reserva, uma vez que não são consumidos. A função dos cristais de oxalato de cálcio ainda é motivo de controvérsia, pois estudos recentes também mostram ser possível a dissolução destes cristais em condições de deficiência de cálcio (VOLK *et al.*, 2002). Entretanto, deve-se considerar a baixa mobilidade do cálcio no floema, o que reduz a possibilidade de transporte deste íon para locais distantes (MARSCHNER, 1986).

4. CONCLUSÃO

A partir da embebição das sementes (T5) há grande alteração dos materiais de reserva quando comparados com a semente não germinada (T0). Nota-se um consumo intenso de proteínas e lipídios e a partir do T5 e T10, respectivamente. Esse rápido consumo de lipídios foi correlacionado ao aumento temporário da reserva de amido, período também marcado pela emergência da plântula.

Os cristais de oxalato de cálcio presentes nos cotilédones de *Caesalpinia peltophoroides* não apresentam função de reserva, pois não foram consumidos durante o período estudado.

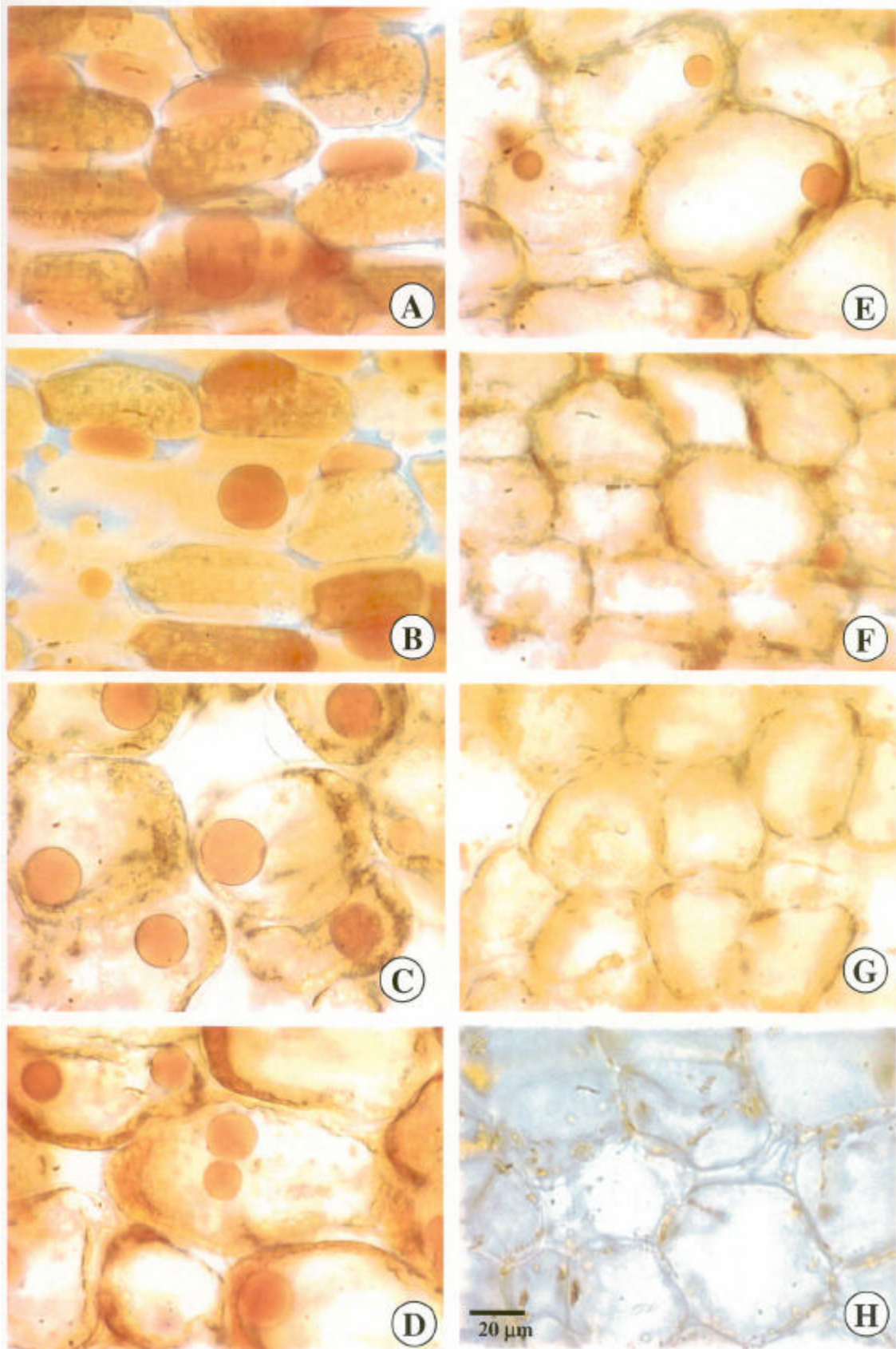


Figura 2: Seções transversais de cotilédone de *Caesalpinia peltophoroides* submetidas a teste com Sudan III para identificação de lipídios totais. T0 (A); T5 (B); T10 (C); T15 (D); T20 (E); T25 (F); T30 (G); T35 (H).

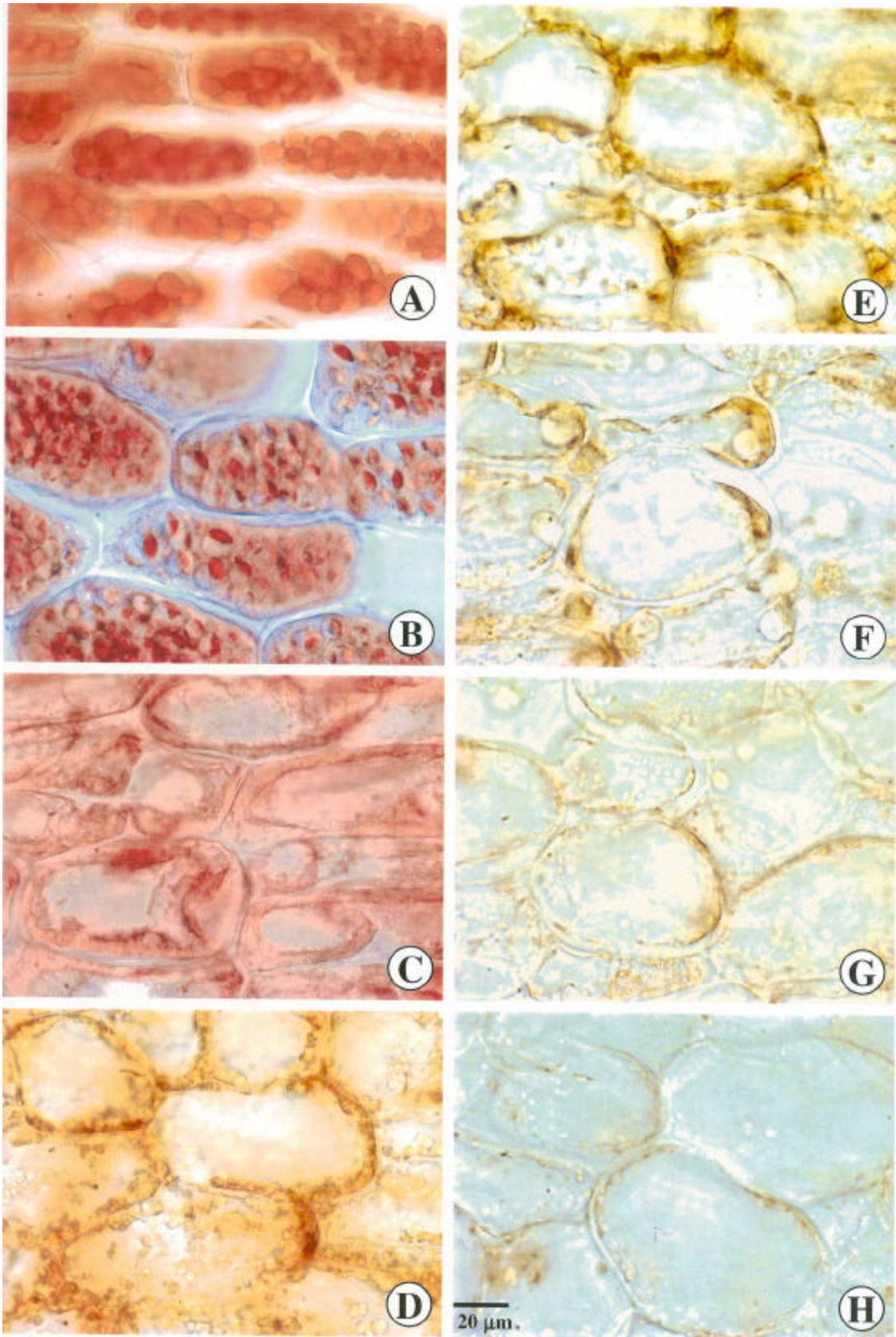


Figura 3: Seções transversais de cotilédone de *Caesalpinia peltophoroides* submetidas a teste com xylydine Ponceau para identificação de proteínas totais. T0 (A); T5 (B); T10 (C); T15 (D); T20 (E); T25 (F); T30 (G); T35 (H).

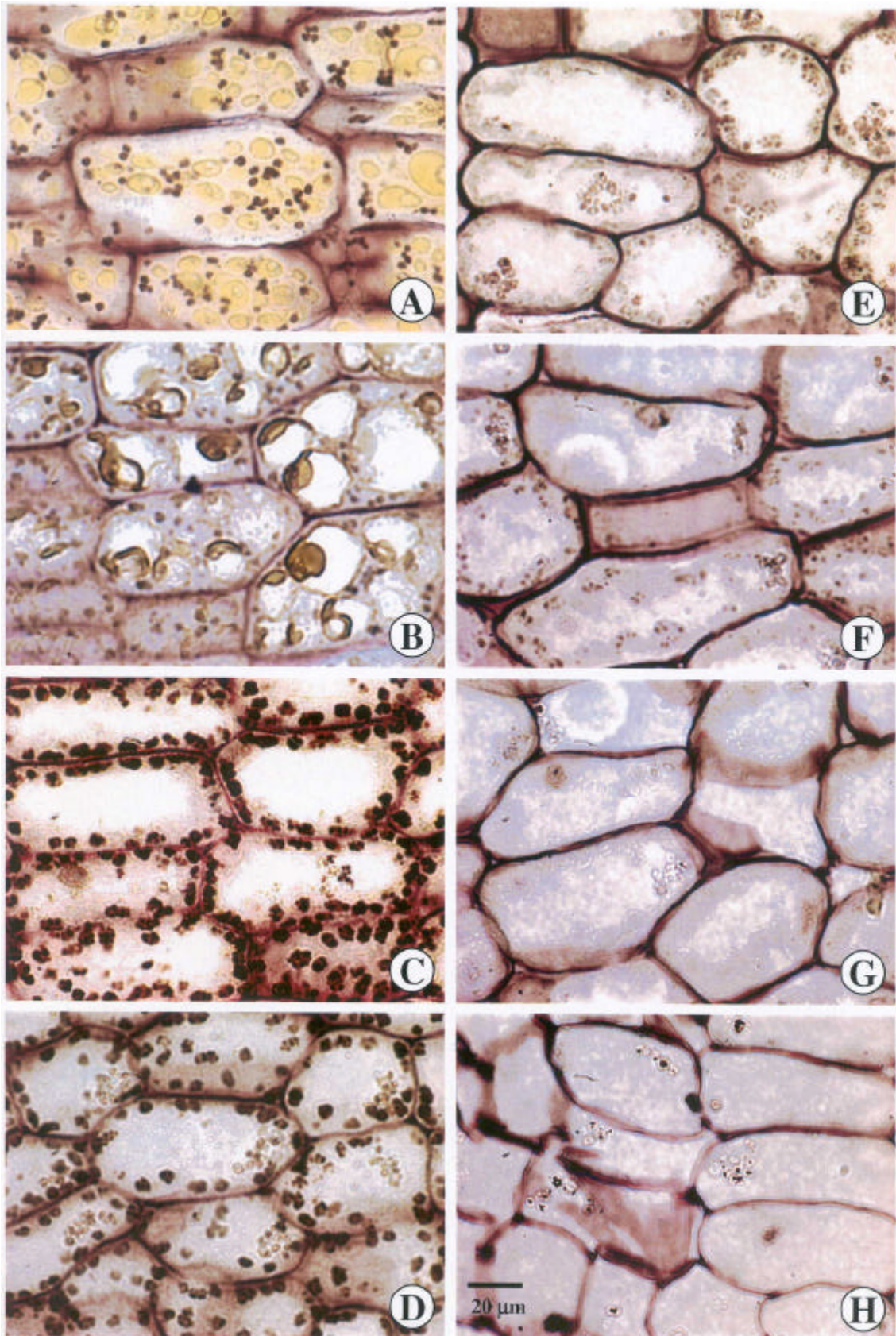


Figura 4: Seções transversais de cotilédone de *Caesalpinia peltophoroides* submetidas a teste com lugol para identificação de amido. T0 (A); T5 (B); T10 (C); T15 (D); T20 (E); T25 (F); T30 (G); T35 (H).

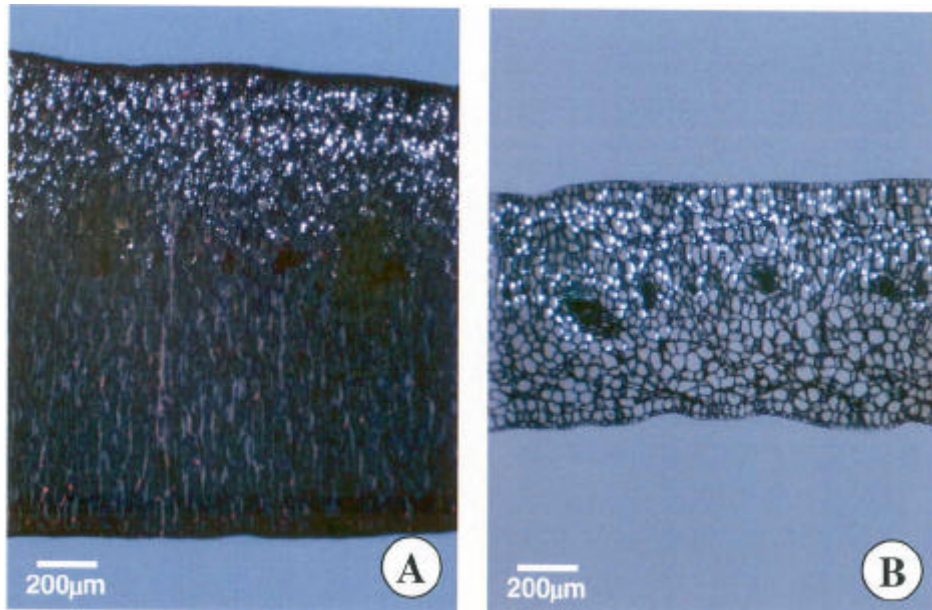


Figura 5: Seção transversal de cotilédone de *Caesalpinia peltophoroides*. Cristais de oxalato de Ca localizados na face adaxial dos cotilédones em T0 (A) e T35 (B).

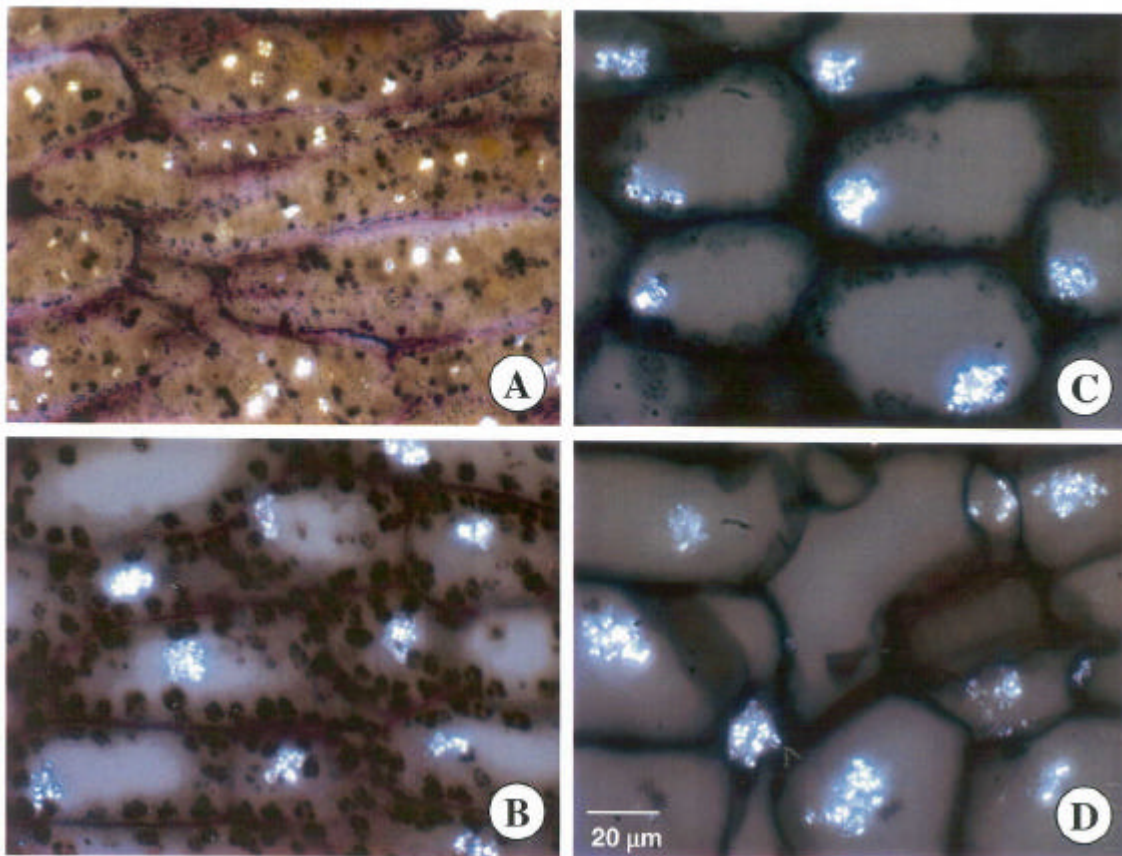


Figura 6: A-D: Seções transversais de cotilédones de *Caesalpinia peltophoroides* sob luz polarizada. T0 (A); T10 (B); T20 (C); T30 (D).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGLEY, B.W.; CHERRY, J.H.; ROLLINS, M.L.; ALTSCHUL, A.M. A study of protein during germination of peanut (*Arachis hypogaea*) seed. **Amer. Journal of Botany**, 50(6), pag.523-532, 1963.
- BALERONI, C.R.S.; FERRARESE, M.L.L.; COSTA, S.C.; SOUZA, N.E.; FERRARESE-FILHO, O. Isocitrate lyase activity and mobilization of lipids and carbohydrates in cotyledons of canola. **Rev. Bras. Fisol. Veg.**, v.9, n.3, p.189-192, 1997.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M.. **Seeds: Physiology of development and germination**, 2nd. New York: Plenum, 1994.
- 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. **Revista Cerne**, vol.8, n.1, p.69-76, 2002.
- BORGES, E.E.L. **Comportamento bioquímico e fisiológico de sementes florestais nativas durante a embebição**. Tese de doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 100 p., 2003.
- BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. **Germinação de sementes**. In: AGUIAR, I.B.; PIÑARODRIGUES, F.C.M; FIGLIOLIA, M.B. Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES, 350 p., 1993.
- BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S.. Acúmulo de Reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Técnica de inclusão de material vegetal em historresina. In: ENCONTRO REGIONAL DE ANATOMISTAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1, 1995, Rio Claro. **Apostila**. Rio Claro: UNESP, 1995. 7p.
- CARVALHO, J.E.U.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Funep, p.588, 2000.
- CHAMBERLAIN, C.J. **Methods in plant histology**. 5^a ed. Chicago, The University of Chicago Press, 416 p., 1932.

- CORTELAZZO, A.L. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. **Revista Brasileira de Botânica**, v.15, n.2, p.157-162, 1992.
- CORTELAZZO, A.L.; VIDAL, B.C. Soybean seed proteins: Detection in situ and mobilization during germination. **Rev. Bras. Bot.** vol. 14, p. 27-33, 1991.
- DALLING, M.J.; BHALLA, P.L. Mobilization of nitrogen and phosphorus from endosperm. In: Murray, D.R. **Seed Physiology: germination and reseve mobilization**. v.2, Academic Press Australia, 1984.
- DAVIES, H.V.; SLACK, P.T. The control of food mobilization in seeds of dicotyledonous plants. **New Phytol.** v.88, p.41-51, 1981.
- FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C.; KINDL, H.;KÜHN, H. Lipoxygenase-catalysed oxygenation of storadge lipids is implicated in lipid mobilization during germination. **Plant Biology**, v.2, p.11849-11853, 1995.
- HEGNAUER, R.; GPAYER-BARKMEIJER, R.J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**. Vol.34, n.1, pag. 3-16, 1993.
- HUANG, A.H.C. Oil bodies and oleosins in seeds. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** v.43, p.177–200, 1992.
- IRVING, D.W. Seed structure and histochemistry of *Prosopis velutina* (Leguminosae). **Botanical Gazete**, 145(3), pag. 340-345, 1984.
- JANN, R.C.; AMEN, R.D. In: Khan, A.A. ed. **The physiology and biochemistry of the seed dormancy and germination**. Elsevier, North-Holland Biomedical Press. P. 7-28, 1977.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 423p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, p.352, 2002.
- MANSFIELD, S.G.; BRIARTY, L.G. The dynamics of seedling and cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve mobilization. **Int. Journal Plant Science**, v.157, n.3, p.280-295, 1996.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press: New York, 1986.

- MOLLENHAUER, H.H; TOTTEN, C. Studies on seeds. I. Origin and degradation of vesicles in pea and bean cotyledons. **The Journal of Cell Biology**, v.48, p.395-405, 1971.
- MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.362, p.1741-1752, 2001.
- MURPHY, D.J. Storage lipid bodies in plants and other organisms. **Progress in Lipid Research**, v.29, n.4, p.299-324, 1990.
- NOZZOLILLO, C.; THIE, I. A comparative study of mobilization of lipid and carbohydrate reserves during germination of seeds of three species of *Impatiens* (Balsaminaceae): *I. balsamina* L., *I. capensis* Meerb. and *I. ballida* Nutt. **Torrey Botanical Club**, vol. 111, n.2, p.200-208, 1984.
- OLIVEIRA, J.T.A.; MORAES, S.M.D.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; VASONCELOS, I.M. Protein and lecithin mobilization during *Erythrina velutina* forma *Aurantiaca* seed germination and seedling growth in the dark. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, vol.10, n.1, p.25-30, 1998.
- OTEGUI, M.; LIMA, C.; MALDONADO,S.; LEDERKREMER, R.M. Histological and chemical characterization of *Myrsine laetevirens* seed. **International Journal Plant Science**. 159(5), pag. 762-772, 1998.
- PERNOLLET, J.C. Protein bodies of seeds: ultrastructure biochemistry, biosynthesis and degradation. **Phytochemistry**, v.17, p.1473-1480, 1978.
- PIÑA-RODRIGUES, F. C., COSTA, L. C. REIS,A. **Estratégias de estabelecimento de espécies arbóreas e o manejo de florestas tropicais**. In: Congresso Florestal Brasileiro, 6, Campos do Jordão, 1990. Anais, Campos do Jordão: SSB, 679-684p, 1990.
- PRITCHARD, S.L.; CHARLTON, W.L.; BAKER, A.; GRAHAM, L.A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis. **The Plant Journal**. Vol. 31, n.5, p. 639-647, 2002.
- PONTES, A. P.; 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.

- SILVA, T.R.G.; CORTELAZZO, A.L.; DIETRICH, S.M.C. Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**. Vol.49, n.3, pag. 219-222, 1997.
- SILVA, T.R.G.; CORTELAZZO, A.L.; DIETRICH, S.M.C. Variations in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. **Revista Bras. Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p.119-124, 1998.
- SOROKIN, H.P. The spherosomes and the reserve fat in plant cells. **Amer. Journal Botany**, v.54, n.8, p.1008-1016, 1967.
- STONE, S.L.; GIFFORD, D.J. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early-seedling growth. I. Storage protein reserves. **International Journal Plant Science**, v.158, n.6, p.727-737, 1997.
- SUDA, C.N.K.; GIORGINI, J.F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Rev. Bras. Fisiologia Vegetal**. Vol.12, n.3, p.226-245, 2000.
- TRELEASE, R.N.; DOMAN, D.C. Mobilization of oil and wax reserves. In: Murray (ed.), D.R. **Seed physiology: germination and reserve mobilization**. Academic Press, v.2, p. 201-245, 1984.
- TROMBS, M.P. Protein bodies of the soybean. **Plant Physiology**, n.42, p.797-813, 1967.
- TZEN, J.T.C.; CAO, Y.; LAURENT, P.; RATNAYAKE, C.; HUANG, A.H.C. Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. **Plant Physiology**, v.101, p.267-276, 1993.
- VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Mol. Biol.**, v.22, p.45-64, 1977.
- VIDAL, B.C. Métodos em biologia celular. In: Vidal, B.C. e Mello, M.L.S. ed. **Biologia Celular**. RJ: Atheneu, p. 5-39, 1987.
- VIDAL, B.C.; PIMENTEL, E.R. Caracterização bioquímica, topoquímica e estrutural dos corpos protéicos do feijão macuco ou jacatupé (*Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng). **Revista Brasileira de Botânica**, n.8, p.223-229, 1985.

VOLK, G.M.; LYNCH-HOLM, V.J.; KOSTMAN, T.A.; GOSS, L.G. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. **Plant Biology**, vol.4, n.1, p.34-45, 2002.

CAPÍTULO III

**MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A GERMINAÇÃO DAS
SEMENTES E CRESCIMENTO DAS PLÂNTULAS DE *CAESALPINIA
PELTOPHOROIDES* BENTH. (LEGUMINOSAE-CAESALPINOIDEAE)**

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar bioquimicamente a mobilização de reservas de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. As variações nesses compostos foram analisadas desde o período pré-germinativo (0 a 5 dias após a semeadura - DAS) até a total senescência e abscisão dos cotilédones, aos 35 DAS, por meio de testes bioquímicos nos cotilédones das sementes. Os resultados mostraram que os lipídios constituem o principal composto de reserva nos cotilédones, contribuindo com cerca de 50% do seu peso de massa seca. Carboidratos solúveis representaram 32%, as proteínas solúveis 7,7 % e amido 6,8% do peso de massa seca dos cotilédones. Os lipídios apresentaram marcante decréscimo entre 5 e 10 DAS, período no qual observou-se surto de crescimento em que a semente, no início da germinação, se transforma numa plântula. Carboidratos e proteínas solúveis apresentaram tendência gradativa de queda, enquanto o amido, esta quase não foi detectável. A redução do peso de massa seca dos cotilédones foi bem correlacionada ao aumento na produção de biomassa no corpo vegetativo da plântula.

Palavras-chave – *Caesalpinia peltophoroides*, sementes, mobilização de reservas, carboidratos, lipídio, proteínas.

1. INTRODUÇÃO

O estabelecimento de uma dada espécie na regeneração está ligado à capacidade de suas sementes germinarem rápida e uniformemente, a fim de vencer a concorrência com outras espécies presentes no local, ou pela capacidade de se manterem viáveis por períodos mais longos, até que as condições ambientais sejam propícias ao desenvolvimento das plântulas (BORGES, 2003). Para tanto, cada espécie lança mão de adaptações, como a mobilização de determinadas reservas que serão úteis para formação de estruturas físicas, como parede celular, ou para respiração, sintetizando intermediários metabólicos com finalidades diversas (BUCKERIDGE *et al.*, 2000; BORGES & RENA, 1993; BORGES, 2003).

As principais substâncias de reserva nas sementes são carboidratos, proteínas e lipídios. A proporção dessa composição pode variar de espécie para espécie e até entre espécies de uma mesma família (BORGES & RENA, 1993; BEWLEY & BLACK, 1994). A utilização dessas substâncias para promover o crescimento dos tecidos do eixo embrionário depende da ação enzimática. Algumas dessas enzimas presentes nas células desidratadas da semente necessitam ser reativadas, ao passo que outras são sintetizadas durante o processo de germinação (BEWLEY & BLACK, 1994; BEWLEY, 1997; CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

Tem sido verificado que a mobilização das reservas ocorre seguindo-se a germinação e acompanhando o subsequente crescimento do eixo embrionário (DAVIES & SLACK, 1981). Estas substâncias são mobilizadas durante a germinação e, durante o desenvolvimento das plântulas seus produtos de degradação são usados para diferentes propósitos, tais como a geração de energia e a produção de matéria-prima (proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios) para a construção de novas células e tecidos (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1975).

As sementes têm sido estudadas quanto à composição química de suas reservas e tal interesse não se dá apenas por seu teor nutritivo, mas por serem úteis na confecção de produtos industrializados (BUCKERIDGE *et al.*, 2004), entre diversos fins. Além disso, o estudo da composição química é do interesse prático da tecnologia de sementes, porque, tanto o vigor como o potencial de armazenamento de sementes são influenciados pelo teor dos compostos presentes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

O conhecimento acerca da biologia de sementes é essencial para se compreender processos de comunidades vegetais, tais como o estabelecimento das plantas, a sucessão

e sua regeneração natural. Dessa forma, tal conhecimento pode constituir também uma ferramenta para o manejo das populações e, para florestas tropicais, informações nas áreas de fisiologia e ecologia ainda são escassas e dispersas (VÁZQUEZ-YANES & OROZCO-SEGOVIA, 1993).

Diante da possibilidade de ampliar o conhecimento sobre aspectos germinativos e do crescimento inicial de uma espécie nativa tropical, o presente estudo se fez com *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). Essa espécie, conhecida popularmente como sibipiruna ou falso pau-brasil, tem grande potencial ornamental e madeireiro, e possui grande distribuição no Brasil, ocorrendo principalmente na região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro, sul da Bahia, São Paulo, Espírito Santo e no Pantanal Mato-grossense (LORENZI 2002).

Recentemente, estudos acerca da fisiologia da germinação de sementes de *C. peltophoroides* têm sido desenvolvidos (PONTES *et al.*, 2002; BORGES, 2003). Entretanto, aspectos bioquímicos e fisiológicos da composição das reservas e sua mobilização nas sementes durante a germinação e crescimento inicial dessa espécie ainda são pouco conhecidos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações no conteúdo de carboidratos, lipídios e proteínas durante a germinação e crescimento inicial das plântulas em sementes de *Caesalpinia peltophoroides*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de *Caesalpinia peltophoroides* colhidas em Viçosa, Minas Gerais, provenientes de um mínimo de 10 árvores. Durante o beneficiamento foram eliminadas sementes imaturas, deterioradas ou danificadas.

Para avaliação da capacidade germinativa foi realizado um teste de germinação em câmara de germinação tipo B.O.D., à temperatura constante de 25°C e iluminação contínua de 24 horas, proporcionada por oito lâmpadas tipo fluorescentes OSRAM, de 40W cada, tipo luz do dia especial, por dez dias, (condições determinadas por testes realizados no Laboratório de Sementes Florestais da UFV – LASF). Utilizou-se cinco repetições, com 20 sementes cada. Foram feitas contagens diárias das sementes germinadas, sendo consideradas como tal todas aquelas que apresentaram a protusão da radícula. Os resultados foram expressos em porcentagem de germinação.

Os cotilédones utilizados para os ensaios foram obtidos a partir de sementes previamente tratadas com solução de captan 0,5% por 60 segundos e colocadas para germinar sobre areia previamente esterilizada com brometo de metila (20cc. m⁻²).

O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado.

Os cotilédones das sementes ou plântulas foram coletados e amostrados para a determinação dos teores de lipídios, proteínas e carboidratos a cada cinco dias até o estágio de senescência e abscisão dos cotilédones (Figura 1). As coletas constaram de cinco repetições de 20 cotilédones com três replicatas cada.

Amostras de parte aérea e de raiz das plântulas foram coletadas e utilizadas para obtenção das medidas de incremento do peso seco ao longo do tempo. As coletas constaram de cinco repetições de 20 cotilédones.

Assim, os tempos de coleta compreenderam: cotilédones de sementes maduras e secas (T0), sementes aos 5 dias após a semeadura (DAS), período marcado pela protusão da radícula (T5), plântulas aos 10 DAS (T10), plântulas aos 15 DAS (T15), plântulas aos 20 DAS (T20), plântulas aos 25 DAS (T25), período marcado pela senescência dos cotilédones, plântulas aos 30 e 35 DAS (T30 e T35, respectivamente), período marcado pela abscisão dos cotilédones.

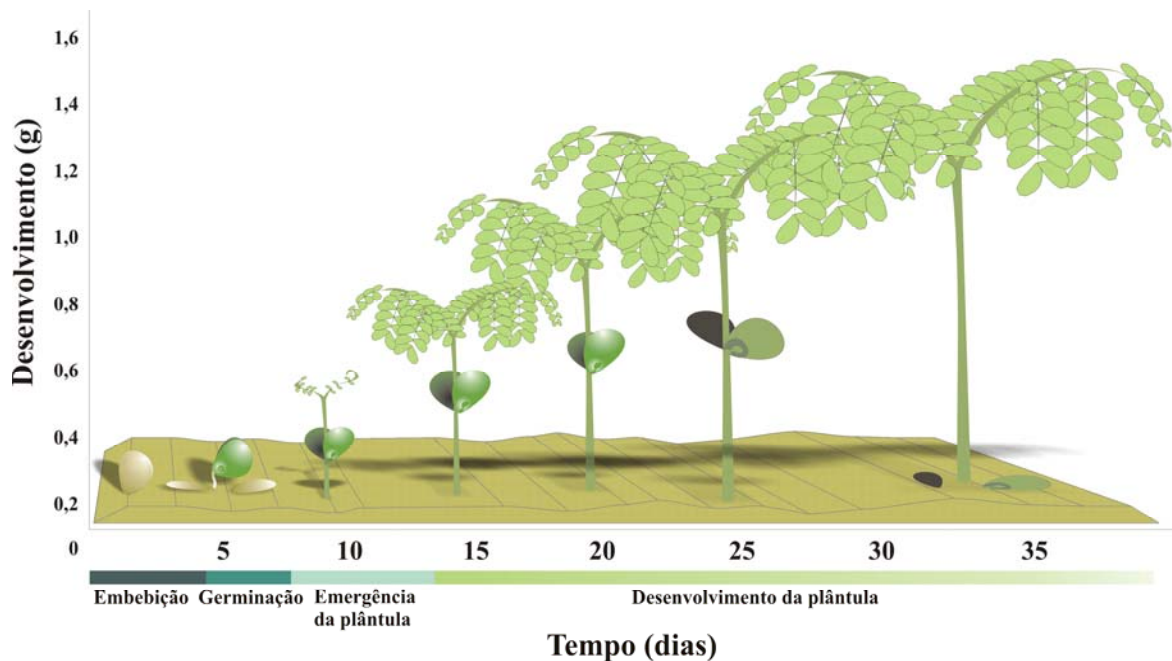


Figura 1 – Modelo esquemático dos tempos de coletas dos cotilédones de *C. peltophoroides* durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.

As amostras foram secas em estufa a 45°C, por 72 horas, determinado o peso da matéria seca e armazenadas em vidros hermeticamente fechados e mantidos no freezer até a extração e quantificação das reservas.

Determinação dos lipídios: Tanto a extração quanto a quantificação do teor de lipídios foram realizadas em aparelho tipo Soxhlet, pelo método de extração a frio com éter de petróleo por 24 horas, conforme SILVA (1990).

Determinação de proteínas solúveis: A extração de proteínas nos cotilédones foi feita conforme descrito por ALFENAS *et al.* (1991), utilizando-se o tampão TRIS-HCl, 0,1 M, pH 7,5 como solução de extração. A quantificação dos teores de proteínas foi feita pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se albumina de sérica bovina (BSA) como padrão de proteína.

Determinação de carboidratos solúveis e amido: A extração de açúcares solúveis foi feita em banho-maria (BUCKERIDGE & DIETRICH, 1990) e repetida cinco vezes. Após cada extração, a mistura foi centrifugada, retirando-se o sobrenadante. Após a extração dos açúcares solúveis, o precipitado foi seco em estufa a 45°C, por 48 horas, e submetido à digestão do amido com 1mL de ácido perclórico 35% (PASSOS, 1996). Os açúcares solúveis e os provenientes da digestão do amido foram quantificados pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Usou-se glicose (Sigma) como padrão.

Foi feito o ajuste das equações de regressão, pelo método *stepwise* (DRAPER & SMITH, 1981), para as concentrações de lipídios, carboidratos e proteínas presentes nos cotilédones das sementes e plântulas ao longo do período de germinação e crescimento, com o objetivo de analisar o comportamento das referidas concentrações em relação ao tempo. Para verificar o grau de associação entre as concentrações dos compostos, assim como a produção de massa seca em cotilédones e plântulas usou-se análise do coeficiente de correlação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sementes de *Caesalpinia peltophoroides* germinaram entre o quinto e sétimo dia de embebição, alcançando cerca de 70% de germinação no 10º dia (Figura 2A). Na Figura 2B, observa-se a frequência relativa da germinação mostrando um comportamento germinativo homogêneo, e na figura 2A uma porcentagem de germinação final que indica o bom vigor do lote, comparando-se com as informações em Lorenzi (2002).

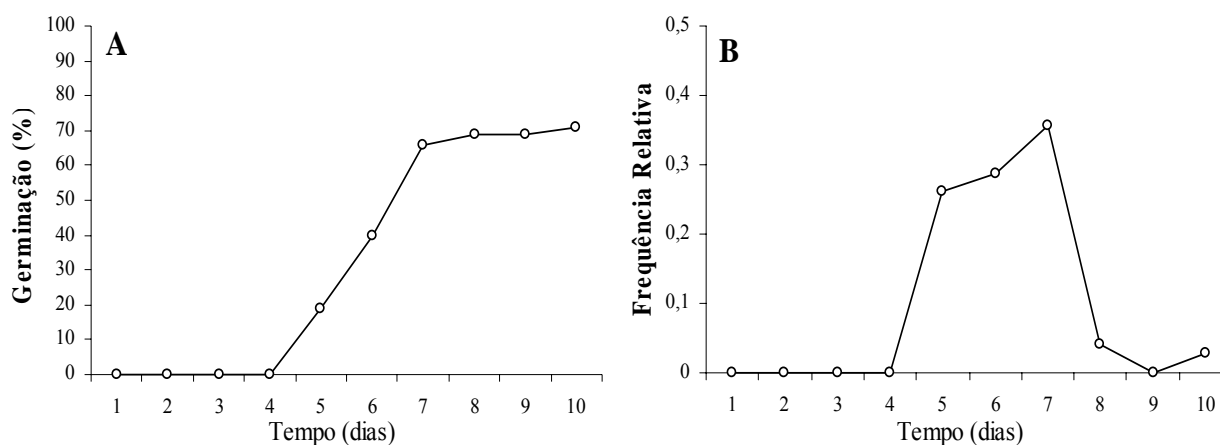


Figura 2 – Porcentagem de germinação (A) e frequência relativa (B) de germinação de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth.

No período pré-germinativo (entre T0 e T5) observou-se aumento exponencial no peso da massa fresca dos cotilédones. O peso massa fresca dos cotilédones aumentou até o 15º dia, em função do aumento da turgescência de seus tecidos, seguindo-se de queda, na medida em que as reservas são exauridas. O valor do peso da massa seca declinou significativamente após o quinto dia (Figura 3).

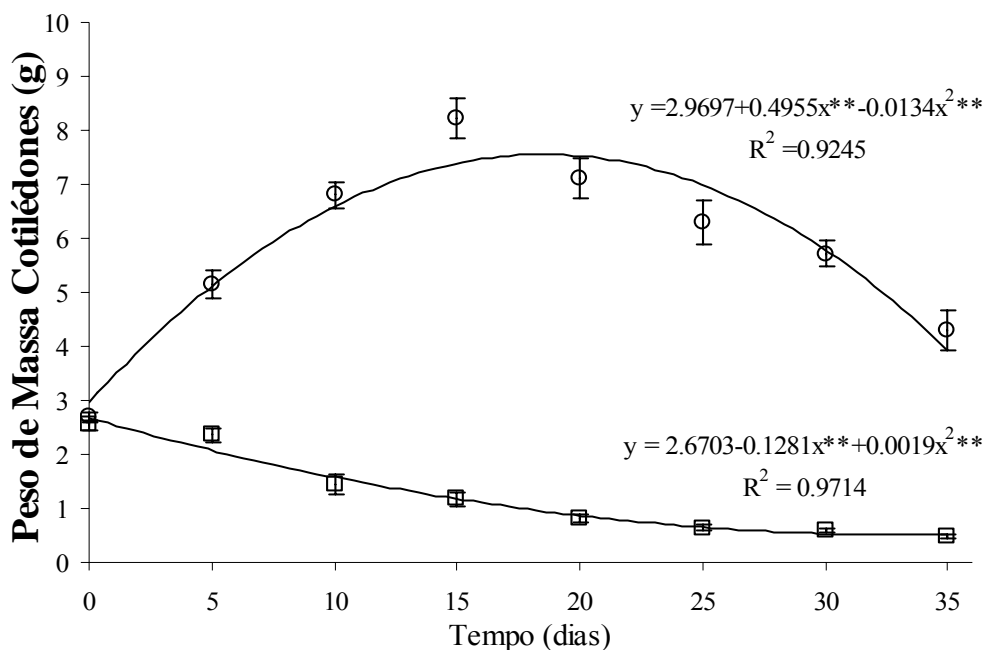


Figura 3 – Curva de regressão para peso de massa de cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. ○ massa fresca; □ massa seca. ** significativo a 1% de probabilidade.

Segundo BORGES *et al.* (2002), a germinação de sementes consiste na retomada do crescimento do eixo embrionário, e esta alteração de tamanho é, inicialmente, determinada pela embebição de água, seguida pela mobilização de reservas para formação de novas estruturas celulares. Ainda, segundo BORGES *et al.* (2002), a embebição causa alongamento do eixo embrionário de *Senna macranthera* e, durante esta etapa, há consumo de reservas, não sendo, entretanto, utilizada para deposição de parede celular, uma vez que não se observou variações no peso de matéria seca do eixo embrionário.

Nota-se, na Figura 4, maior crescimento da raiz em relação à parte aérea no período pré-germinativo (entre T0 e T5), sendo o crescimento da parte aérea seguido temporalmente pela protusão da radícula. Nesse período, os cotilédones apresentaram apenas uma pequena diminuição na massa seca (Figura 3), podendo indicar que a hidrólise das reservas ainda estava por se iniciar. Após T5, foi verificada uma aceleração no desenvolvimento da parte aérea da plântula (Figura 4), com uso do suprimento de nutrientes a partir do tecido de reserva. De T5 à T35 observou-se

aumento crescente na produção de biomassa tanto da parte aérea quanto da raiz das plântulas. Entretanto, a produção de matéria seca no corpo vegetativo da plântula não pode ser atribuída exclusivamente às reservas energéticas originais dos cotilédones, uma vez que no T15 seu primeiro par de folhas já se encontrava, havendo provavelmente contribuição de material proveniente da fotossíntese. Da mesma forma, SASSAKI & FELIPPE (1992) verificaram em *Dalbergia miscolobium* grande dependência do eixo em relação às reservas dos cotilédones até os 20 dias de idade, quando começa a maior expansão foliar.

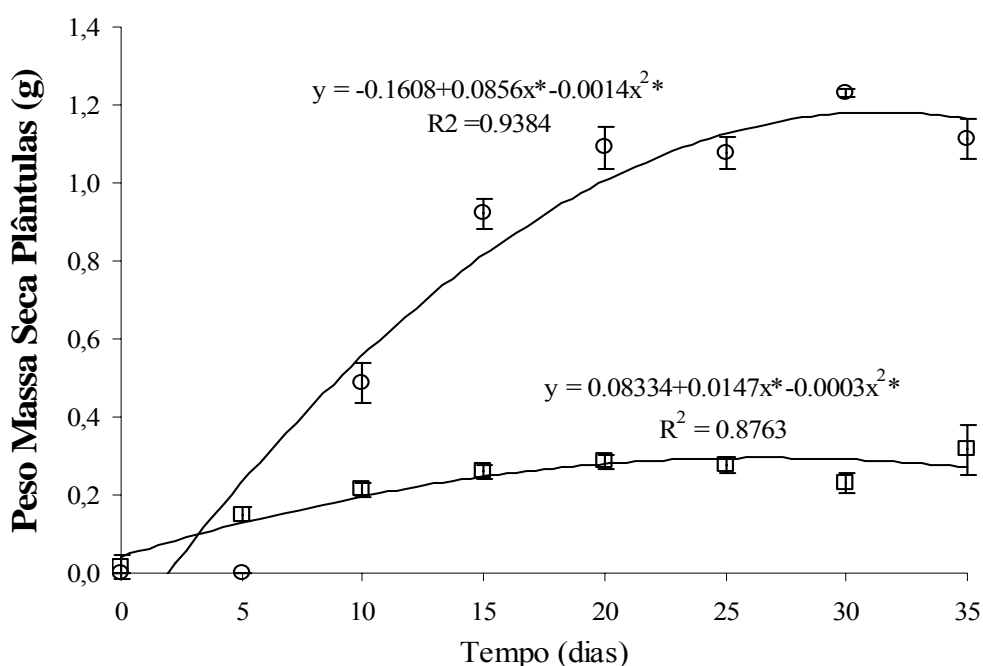


Figura 4 - Curva de regressão para peso de massa seca de plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. durante a germinação e crescimento inicial. ○ parte aérea (caule+folha); □ raiz. * significativo a 5% de probabilidade.

Sementes de *Caesalpinia peltophoroides* apresentaram cerca de 50% de lipídios, 32% de carboidratos solúveis, 7,7% de amido e 6,8% de proteínas solúveis, em relação ao peso seco dos cotilédones (Figura 5). Outros compostos, tais como carboidratos constituintes de parede, proteínas insolúveis e compostos do metabolismo secundário estariam compondo os 4% restantes.

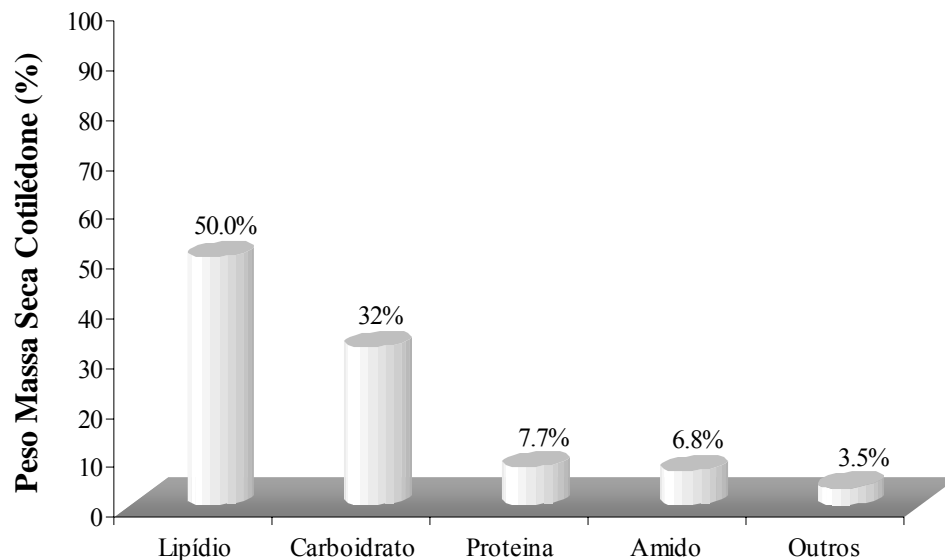


Figura 5 – Composição química com base no peso de massa seca de cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth não germinadas.

Os principais materiais de reserva em sementes de girassol também são estocados nos cotilédones, tendo entre 22 a 36% do seu peso seco constituído por lipídios (SOROKIN, 1967). Sementes de *Dalbergia miscolobium* apresentam 32% de lipídio e pequena proporção de amido (2,4 a 4,7%) nos cotilédones (SILVA *et al.*, 1998), já sementes de *Euphorbia heterophylla* o amido não é detectado (SUDA & GIORGINI, 2000).

Os carboidratos de reserva armazenados em sementes de espécies de leguminosas têm sido aplicados como ferramenta na taxonomia. Muitas Papilionoideae armazenam grandes quantidades de amido em suas sementes. Em outras tribos dessa subfamília, a ocorrência do amido é pequena ou ausente. Em Caesalpinioideae esta reserva constitui uma exceção e, em Mimosoideae, a situação é similar, entretanto, reserva de pequenos grãos de amido nas sementes ocorrem ligeiramente em maior frequência (HEGNAUER & GPAYER-BARKMEIJER, 1993).

Embora haja grandes variações quantitativas entre os compostos constituintes das sementes, qualitativamente eles se apresentam mais estáveis, pelo menos considerando-os em seus grupos e funções nas sementes. Interessante é que parece haver uma relação inversa em sementes oleaginosas entre o conteúdo de óleo e de proteína (GUIMARÃES, 1999). Tal relação é claramente observada em sementes de

Caesalpinia peltophoroides, onde lipídios e proteínas ocuparam proporções máxima e mínima, respectivamente.

A quantidade total de reservas da semente disponível para uma plântula não é determinada somente pela massa, mas é também influenciada pela composição química (KITAJIMA, 1996). Considerando-se a alta proporção de lipídios nas sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, aliado a sua posição secundária inicial na sucessão ecológica, coloca-se a hipótese de uma possível vantagem das altas concentrações de energia em sementes para o estabelecimento de plântulas em ambientes de sombra. Assim, os altos conteúdos de lipídios nas sementes poderiam conferir uma vantagem adaptativa à espécie. KITAJIMA (1996) sugere que a existência de altos conteúdos de lipídios nas sementes de algumas espécies deve indicar uma seleção compensatória, na medida em que as sementes mais leves são fortemente selecionadas, por exemplo, para melhor dispersão.

Em sementes oleaginosas, a maior parte das reservas armazenadas é constituída por lipídios, encontrados na forma de triacilgliceróis (BEWLEY & BLACK, 1994). Esses lipídios apresentaram forte queda entre T0 e T10, sendo esta mais suave a partir do T10 (Figura 6). Em espécies do gênero *Impatiens*, após o 4º dia de semeadura, há acentuado declínio de lipídio (NOZZOLILLO & THIE, 1984).

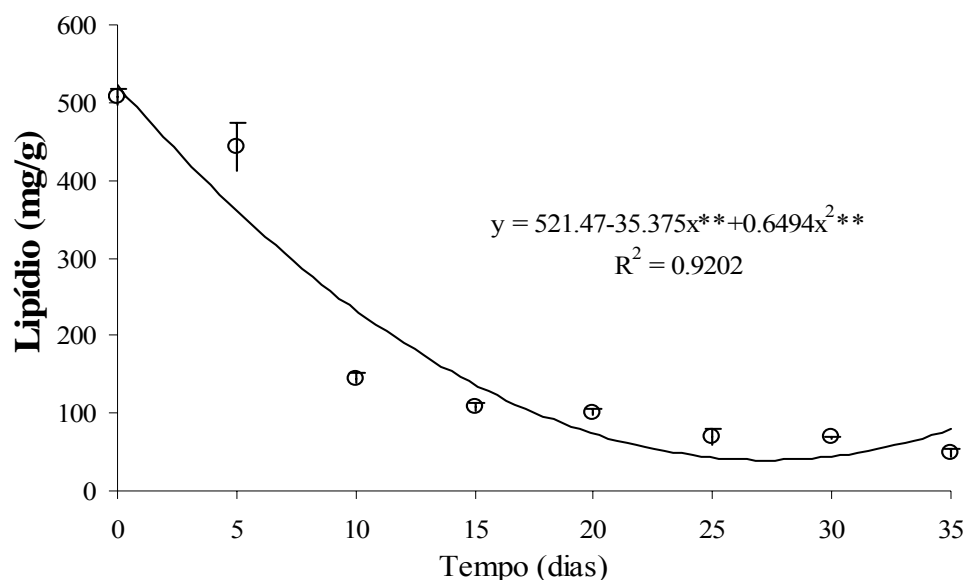


Figura 6 – Curva de regressão para mobilização dos lipídios de cotilédones de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. ** significativo a 1% de probabilidade.

Consumo ainda mais rápido foi encontrado por SUDA & GIORGINI (2000), em sementes de *Euphorbia heterophylla*, cuja degradação dos lipídios inicia-se logo após a embebição, atingindo consumo de cerca de 70% do total inicial entre três e quatro dias. Em *Cucumis sativus* a degradação dos lipídios inicia no segundo dia após a germinação, só restando 3% do total inicial aos seis dias. Essa rápida degradação se inicia com o aparecimento da radícula e termina com a completa expansão dos cotilédones (MATSUI *et al.*, 1999). Entretanto, segundo SUDA & GIORGINI (2000), este padrão não é usual, quando comparado a outras sementes oleaginosas, nas quais o conteúdo de lipídio permanece inalterado durante o período inicial da germinação, diminuindo posteriormente.

Segundo PONTES *et al.* (2002), estas observações evidenciam a importância dos lipídios de reserva no eixo embrionário, nos estádios iniciais de germinação. Todavia, observou-se em *Arabidopsis thaliana* que a mobilização das reservas de lipídio são inibidas na presença de açúcares solúveis, tais como glicose e sacarose, em geral provindos do metabolismo do amido (TO *et al.*, 2002).

Teores de carboidratos solúveis reduziram continuamente durante todo o período observado (Figura 7). O conteúdo de carboidratos apresentou queda mais acentuada após o 10º dia, concomitantemente com a diminuição da degradação das reservas de lipídios (Figura 6). Resultados semelhantes foram observados por BUCKERIDGE *et al.* (1992), em sementes de *Copaifera langsdorfii*, cujo conteúdo de açúcares solúveis reduziu durante e após a germinação. Ao contrário, sementes de *Brassica oleracea* e *Euphorbia heterophyllae*, tiveram o conteúdo de carboidratos solúveis inalterados até 48 e 72 horas, respectivamente (QOUTA, *et al.*, 1991; SUDA & GIORGINI, 2000).

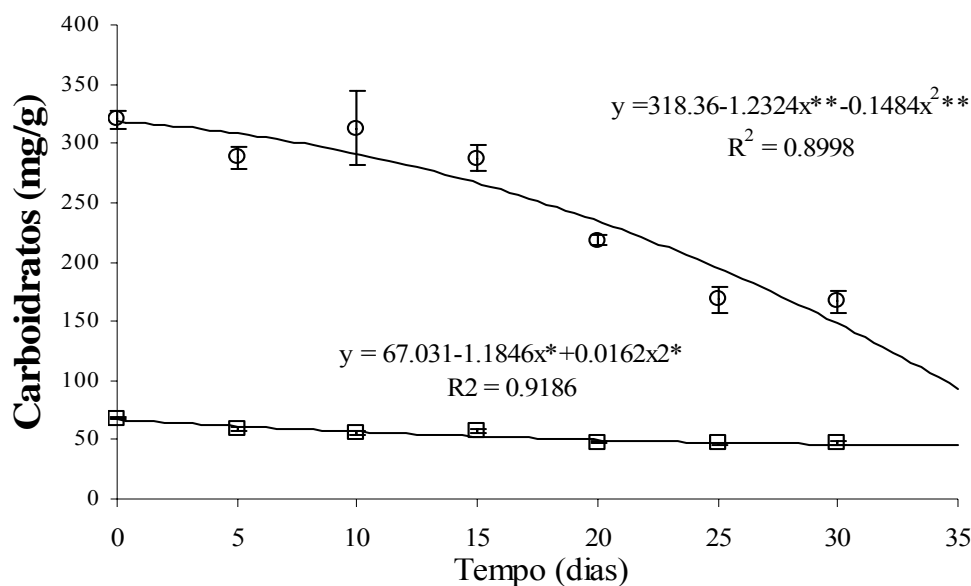


Figura 7 – Curva de regressão para mobilização dos carboidratos em cotilédones de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. ○ carboidratos solúveis; □ Amido. ** significativo a 1% de probabilidade.

Pode-se sugerir que a grande quantidade de carboidratos solúveis observada em *Caesalpinia peltophoroides* se presta não só ao fornecimento de energia para a germinação, mas também atua conferindo maior armazenabilidade às sementes.

As reservas armazenadas na forma de amido apresentaram menores concentrações em sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, semelhante ao que ocorre em outras leguminosas (IRVING, 1984; HEGNAUER & GPAYER-BARKMEIJER, 1993; SILVA *et al.*, 1998; SUDA & GIORGINI, 2000).

Durante o período pré-germinativo, segundo BEWLEY & BLACK (1994), os carboidratos pré-formados na semente servem como substrato para a respiração, no que concordam os resultados obtidos por BUCKERIDGE *et al.* (1995) para sementes de *Dimorphandra mollis*. CORTELAZZO (1992), acompanhando a mobilização do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata*, verificou diminuição na quantidade e tamanho dos grãos, chegando a um esgotamento quase total. Entretanto, em *Caesalpinia peltophoroides* o conteúdo de amido apresentou pequeno consumo durante o período germinativo e de crescimento das plântulas (Figura 7).

O conteúdo protéico apresenta-se inalterado no período pré-germinativo, com redução gradativa após a protrusão da radícula (T5). BORGES (2003) relatou que o teor de proteína se mantém estável nos cotilédones desta espécie até 24 horas de embebição.

SCHLERETH *et al.* (2000) observaram que em sementes de *Vicia sativa* a mobilização das reservas de proteína nos cotilédones só começa após 48 horas de embebição.

O conteúdo de proteínas solúveis continua a decrescer durante o crescimento das plântulas (Figura 8), o que concorda com a afirmação de BEWLEY & BLACK (1994), de que as proteínas são mobilizadas durante a germinação e subsequente crescimento das plântulas.

Esses resultados também concordam com os obtidos por MÜNTZ *et al.* (2001), de que a mobilização das proteínas armazenadas nos cotilédones só é detectável após a protusão da radícula (pós-germinação). Em sementes de *Erythrina velutina*, o conteúdo de proteína cotiledonar solúvel decresceu rapidamente durante a germinação e crescimento da plântula (OLIVEIRA *et al.*, 1998) e, em sementes de *Euphorbia heterophylla*, as proteínas foram continuamente degradadas após o início da embebição (SUDA & GIORGINI, 2000).

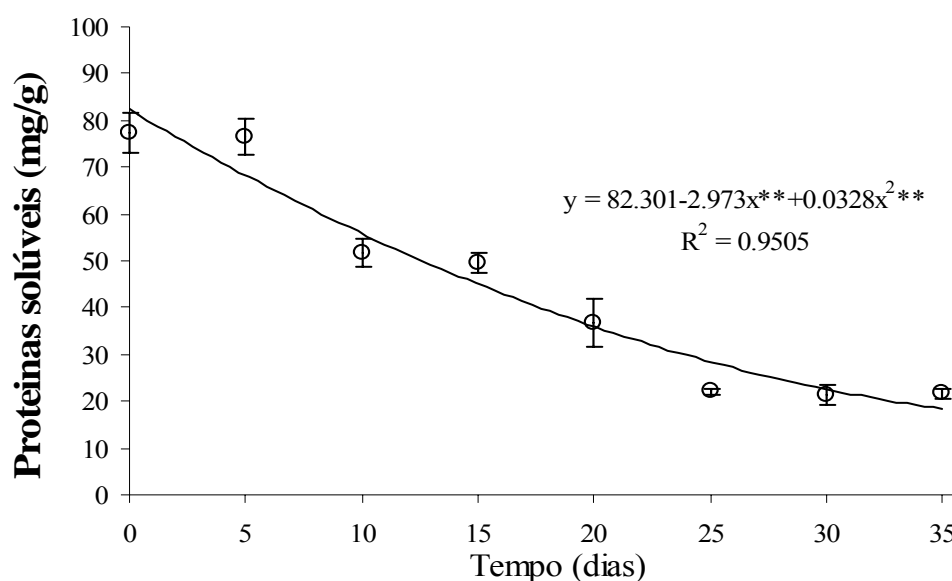


Figura 8 - Curva de regressão para mobilização das proteínas solúveis em cotilédones de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. ** significativo a 1% de probabilidade.

Em sementes de *Pinus taeda*, a maior parte das reservas de proteínas estão contidas no megagametófito e sua degradação após a emergência da radícula é correlacionada com aumento na concentração de aminoácidos livres na plântula (KING & GIFFORD, 1997). A germinação da semente é iniciada graças às reservas próprias do embrião e mantida com a degradação dos componentes dos tecidos de reserva, pela

atividade enzimática e fluxo dos componentes solúveis às regiões de crescimento onde há rápido consumo (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

YAMAGUCHI *et al.* (1996) e MATSUI *et al.* (1999) observaram que em sementes de *Cucumis sativus* a degradação das reservas de proteínas inicia-se aos três dias após a germinação, e que a diminuição desta está claramente correlacionada à transição do metabolismo dos cotilédones para o crescimento heterotrófico, o qual é dependente de fonte da energia preservada nas sementes secas para o crescimento autotrófico. Nesse contexto, BUCKERIDGE *et al.* (2004) também evidenciaram a mobilização das reservas de proteínas para a estruturação dos processos que conferem capacidade de absorver nutrientes e de realizar fotossíntese.

A Tabela 1 mostra o grau de associação entre as concentrações dos compostos químicos analisados nos cotilédones, bem como a produção ou consumo de massa seca em plântulas e cotilédones, através do coeficiente de correlação.

Tabela 1 – Análise de correlação entre os compostos de reserva e peso de massa seca (PMS) de cotilédones e plântulas de *Caesalpinia peltophoroides*. Valores significativos ao nível de 1% de probabilidade.

	Lipídio	Carboidrato	Amido	Proteína	PMS Plântula	PMS Cotilédone
lipídio	1,0000	0,6541	0,8674	0,9122	-0,9480	0,9691
carboidrato		1,0000	0,8840	0,8859	-0,8017	0,8107
amido			1,0000	0,9334	-0,8947	0,9311
proteína				1,0000	-0,9513	0,9772
PMS plântula					1,0000	-0,9872
PMS cotilédone						1,0000

As correlações positivas (valor maior que zero) indicam que à medida que determinada variável cresce, também cresce a outra variável a que se compara, e uma correlação negativa (valor menor que zero) indica que à medida que uma variável cresce, a outra decresce (em média). E, quanto maior o valor da correlação (positivo ou negativo), mais forte a associação. Segundo SCHIMAKURA (2002), uma correlação pode ser descrita em palavras dado o valor numérico, da seguinte forma: valores de 0,00 a 0,19 indicam uma correlação muito fraca; 0,20 a 0,39 indicam uma correlação fraca; 0,40 a 0,69 indicam uma correlação moderada; 0,70 a 0,89 indicam correlação forte; 0,90 a 1,00 indicam uma correlação muito forte.

Observa-se que o peso da massa seca dos cotilédones apresenta correlação positiva muito forte com os teores de lipídio, amido e proteína (0,9691; 0,9311; 0,9772, respectivamente), e correlação forte (0,8107) com o teor de carboidrato. Ao contrário, o peso da massa seca dos cotilédones apresenta correlação negativa muito forte (-0,9872) com o peso de massa seca das plântulas. Do mesmo modo, o peso de massa seca das plântulas apresenta correlação negativa muito forte com os teores de lipídio e proteínas (-0,9480 e -0,9513, respectivamente) e correlação negativa forte com os teores de carboidratos solúveis e amido (-0,8017 e -0,8947, respectivamente) (Tabela 1).

Pode-se afirmar, então, que a diminuição do peso da massa seca dos cotilédones está diretamente associada à redução dos compostos de reserva neles estocados, e esta associada ao aumento do peso de massa seca da plântula. Estas relações evidenciam a mobilização dos compostos de reserva dos cotilédones (fonte) e sua translocação para outros órgãos (dreno), à medida que a redução na massa seca cotiledonar reflete o aumento da produção de biomassa de parte aérea e raiz da nova plântula. Resultados semelhantes a estes foram obtidos durante a germinação e o crescimento inicial de *Brassica oleracea*, e espécies do gênero *Impatiens* (NOZZOLILLO & THIE, 1984; QOUTA *et al.*, 1991).

Em relação os teores de lipídio, carboidratos solúveis, amido e proteínas solúveis observam-se correlações sempre positivas. As proteínas apresentam correlação positiva muito forte com lipídio e amido (0,9122 e 0,9334, respectivamente) e correlação forte com carboidratos (0,8859). Amido apresentou correlação forte com lipídio e carboidratos (0,8674 e 0,8840, respectivamente). Carboidratos apresentaram correlação moderada com o teor de lipídio (0,6541). Essas correlações positivas demonstram o semelhante comportamento de degradação entre esses compostos.

Para justificar o grau de associação ou correlação entre os componentes químicos analisados, podem existir diversas explicações do porque elas variam conjuntamente, incluindo: mudanças em A causam mudanças em B, mudanças em B causam mudanças em A, mudanças em outras variáveis causam mudanças tanto em A quanto em B, ou a relação observada é somente uma coincidência. A terceira explicação é frequentemente a mais apropriada. Por exemplo, o ritmo ou intensidade de degradação das proteínas solúveis e amido está altamente correlacionado. Isto não significa que o consumo protéico causa, necessariamente, o consumo de amido ou vice-versa, de forma que nem sempre os dados observacionais estabelecem relações causais. Para afirmações

dessa natureza, seria necessário realizar experimentos específicos para a obtenção de mais evidências de uma relação causal.

Isto indica que existe algum processo de conexão atuando, processo este inserido num amplo e complexo sistema metabólico que atua no sentido de mobilizar a reserva energética estocada nos cotilédones das sementes com o objetivo final de estabelecer uma nova planta.

4. CONCLUSÃO

Sementes de *Caesalpinia peltophoroides* possuem alto conteúdo de lipídios, os quais são predominante consumidos durante a germinação.

Lipídios, proteínas e carboidratos são consumidos durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.

O consumo das reservas energéticas dos cotilédones foi fortemente correlacionado à redução do peso de massa seca dos mesmos e, inversamente correlacionado ao aumento da produção de biomassa nas plântulas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; I. PETERS; W. BRUNE; G. C. PASSADOR. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa:SIF, 1991. 242p.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M.. **Seeds: Physiology of development and germination**, 2nd. New York: Plenum, 1994.
- BEWLEY, J.D.. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, 9, 1055-1066, 1997.
- BORGES, E.E.L. **Comportamento bioquímico e fisiológico de sementes florestais nativas durante a embebição**. Tese de doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 100 p., 2003.
- 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. **Revista Cerne**, vol.8, n.1, p.69-76, 2002.
- BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. **Germinação de sementes**. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M; FIGLIOLIA, M.B. Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES, 350 p., 1993.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.
- BUCKERIDGE, M.S. et al. Xiloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfi* from savanna and forest populations. **Physiologia Planteram**, v.86, p.145-151, 1992.
- BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S.. Acúmulo de Reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- 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.; PANEGASSI, V.R.; DIETRICH, S.M.C. Storage carbohydrate mobilization of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination. **Revista Brasileira de Botânica**, v.18, n.2, p.171-175, 1995.

- CARVALHO, J.E.U.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Funep, p.588, 2000.
- CORTELAZZO, A.L. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. **Revista Brasileira de Botânica**, v.15, n.2, p.157-162, 1992.
- DAVIES, H.V.; SLACK, P.T. The control of food mobilization in seeds of dicotyledonous plants. **New Phytol.** v.88, p.41-51, 1981.
- DRAPER, W.R.; SMITH, H.. **Applied regression analysis**. New York: Jonh Willey & Sons, 709 p., 1981.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Annalical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.
- GUIMARÃES, R.M. **Fisiologia de sementes**. Lavras:UFLA/ FAEPE, 79 p., 1999.
- HEGNAUER, R; GPAYER-BARKMEIJER, R.J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification og the leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, vol. 34, n.1, p.3-16, 1993.
- IRVING, D.W. Seed structure and histochemistry of *Prosopis velutina* (Leguminosae). **Botanical Gazete**, 145(3), pag. 340-345, 1984.
- KING, J.E.; GIFFORD D.J.. Amino Acid Utilization in Seeds of Loblolly Pine during Germination and Early Seedling Growth. 1. Arginine and Arginase Activity. **Plant Physiol.**, 113 p.1125-1135, 1997.
- KITAJIMA. K. Ecophysiology of tropical tree seedlings. In: Mulkey, S.S.; Chazdon, R.L.; Smith, A.P. **Tropical Forest Plant Ecophysiology**. New York: Chapman & Hall, p.559-96, 1996.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, p.352, 1998.
- MATSUI, K.; HIJIYA, K.; TABUCHI, Y.; KAJIWARA, T. Cucumber Cotyledon Lipoxigenase during Postgerminative Growth. Its Expression and Action on Lipid Bodies. **Plant Physiology**, Vol. 119, pp. 1279–1287, 1999.
- MAYER A.M.; POLJAKOFF-MAYBER A. **The germination of seeds**. Pergamon Press, McMillan, New York, 236 p., 1975.
- MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.362, p.1741-1752, 2001.

- NOZZOLILLO, C.; THIE, I. A comparative study of mobilization of lipid and carbohydrate reserves during germination of seeds of three species of *Impatiens* (Balsaminaceae): *I. balsamina* L., *I. capensis* Meerb. and *I. ballida* Nutt. **Torrey Botanical Club**, vol. 111, n.2, p.200-208, 1984.
- OLIVEIRA, J.T.A.; MORAES, S.M.D.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; VASONCELOS, I.M. Protein and lecitin mobilization during *Erythrina velutina* forma *Aurantiaca* seed germination and seedling growth in the dark. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, vol.10, n.1, p.25-30, 1998.
- PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Voronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 223 p., 1996.
- PONTES, A. P.; 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.
- QUOTA, L.A.; WALDRON, K.W.; BAYDOUN, E.A.H.; BRETT, C.T. Changes in seed reserves and cell wall composition of component organs during germination of cabbage (*Brassica oleracea*) seeds. **Journal of Plant Physiology**, v.138, p.700-707, 1991.
- SASSAKI, R.M.; FELIPPE, G.M. Remoção dos cotilédones e desenvolvimento inicial de *Dalbergia miscolobium*. **Revista Brasileira de Botânica**, n.15, p.5-16, 1992.
- SCHLERETH, A.; BECKER, C.; HORSTMANN, C.; TIEDEMANN, J.; MÜNTZ, K.. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedlings growing of vetch (*Vicia sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.349, p.1423-1433, 2000.
- SHIMAKURA, S.E. **Interpretação do coeficiente de correlação**. [Disponível em: www.est.ufpr.br acessado em 07 de junho de 2005].
- SILVA, D.J. **Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos**. Viçosa, U.F.V., Imprensa. Universitária. 165p. 1990.
- 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**. Vol.10, n.2, p. 119-124, 1998.
- SOROKIN, H.P. The spherosomes and the reserve fat in plant cells. **Amer. Journal Botany**, v.54, n.8, p.1008-1016, 1967.

- SUDA, C.N.K.; GIORGINI, J.F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Rev. Bras. Fisiologia Vegetal**. Vol.12, n.3, p.226-245, 2000.
- TO, J.P.C.; REITER, W.; GIBSON, S.I. Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. **BMC Plant Biology**, 2:4, 2002.
- VÁZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, n.24, p.69-87, 1993.
- YAMAGUCHI, Y.; SUGIMOTO, T.; SUEYOSHI, K.; OJI, Y. Emergence of proteases in germinating cucumber cotyledons and their roles in the two-step degradation of storage protein. **Plant Cell Physiol** v.37, p.279–284, 1996.

CONCLUSÕES GERAIS

Resultados bioquímicos e histoquímicos concordaram que tanto lipídios quanto proteínas são consumidos de forma gradativa durante o período estudado, não sendo significante suas concentrações após 25 dias.

A falta de concordância entre os resultados bioquímicos e histoquímicos para proteínas se deve ao fato de que sua quantificação bioquímica se restringiu a apenas uma classe de proteínas, ao passo que a marcação histoquímica foi generalista, tendo-se detectado proteínas totais.

Os grãos de amido, presentes em pequena quantidade nas sementes secas, apresentam leve aumento aos 10 dias, sendo totalmente consumidos até os 30 dias. Nesse caso, a quantificação bioquímica não detectou as variações sutis visualizadas *in situ* pela histoquímica, possivelmente devido às suas pequenas proporções.

Compostos fenólicos e cristais de oxalato de cálcio, avaliados histoquimicamente, não foram consumidos durante a germinação, não sendo atribuída função de reserva a estes compostos.