

LYDIANE LUCIA DE SOUSA BASTOS

**FOGO E FUMAÇAS, LÍQUIDA E GASOSA, AFETAM A FISIOLOGIA DE
SEMENTES DE *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby**

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

Orientador: Fillipe Tamiozzo Pereira Torres

Coorientadoras: Angélica de Cássia Carneiro
Genáina Aparecida de Souza
Lausanne Soraya Almeida

**VIÇOSA- MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

B327f
2023

Bastos, Lydiane Lucia de Sousa, 1984-
Fogo e fumaças, líquida e gasosa, afetam a fisiologia de
sementes de *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H. S. Irwin &
Barneby / Lydiane Lucia de Sousa Bastos. – Viçosa, MG, 2023.
1 tese eletrônica (133 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Fillipe Tamiozzo Pereira Torres.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Engenharia Florestal, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.152>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Germinação - Efeito do fogo. 2. Fedegoso. 3. Dormência
de semente. 4. Enzimas. 5. Antioxidantes. I. Torres, Fillipe
Tamiozzo Pereira, 1979-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Florestal. Programa de
Pós-Graduação em Ciência Florestal. III. Título.

GDFC adapt. CDD 634.92323123

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

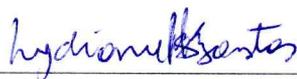
LYDIANE LUCIA DE SOUSA BASTOS

**FOGO E FUMAÇAS, LÍQUIDA E GASOSA, AFETAM A FISIOLOGIA DE
SEMENTES DE *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby**

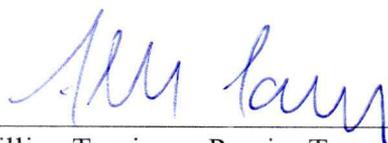
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 01 de março de 2023.

Assentimento:



Lydiane Lucia de Sousa Bastos
Autora



Fillipe Tamiozzo Pereira Torres
Orientador

Dedico este trabalho à memória do meu orientador Eduardo Borges, por todos os ensinamentos, paciência, amor e carinho.

Dedico também à memória da minha querida e amada avó Nazaré Nunes de Souza, uma das tantas vítimas que a Covid levou.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal e ao Departamento de Engenharia Florestal pela oportunidade oferecida e por todos os ensinamentos; aos secretários da Pós-graduação Alexandre Amorim e Dilson Garcia por todo carinho e auxílio administrativo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. O presente trabalho também foi realizado com apoio da CAPES através do Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Euclides de Lima e Borges (*in memoriam*) pela orientação, por ter me recebido de braços abertos para o doutorado, por ter postergado sua aposentadoria e por todo exemplo de luta e otimismo mesmo nos dias delicados de quimioterapia.

Ao Prof. Dr. Fillipe Torres primeiramente pela co-orientação e depois quando assumiu a orientação, por toda parceria, ensinamentos, apoio e amizade, que me incentivaram a prosseguir quando eu achava que já não daria mais conta.

Às Prof. Dra. Lausanne Almeida, Dra. Angélica de Cassia Carneiro e Dra. Yêda Arruda, exemplos de mulheres pesquisadoras dedicadas, cujo suporte afetivo e científico foram cruciais para a realização desse trabalho em todas as esferas da vida.

Ao Prof. Dr. Sergio Fernandes, Dra. Sarah Pereira, Dra. Adriana Vilela e Dr. Vinicius Rodrigues pelas análises e auxílio na interpretação dos resultados da composição química dos extratos pirolenhosos.

Ao Prof. Dr. Jean Lira, Dra. Genaina Souza e Dra. Luciane Reis pelo apoio e ensinamentos fundamentais na interpretação dos resultados do sistema enzimático antioxidante.

À Sociedade de Investigação Florestal – SIF pelo apoio na logística e na coleta de sementes.

A todos os funcionários do Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) pelo acolhimento e auxílio nas análises, principalmente ao José Mauro, Luciane e Marquione pela amizade, risadas, conversas e apoio emocional.

Às minhas amigas de Viçosa, Ana, Fábila, Mayra, Danúcia, Dayane, Crícia e Ângela e aos meus amigos Ítalo, Jorge e Caio por todo amor, carinho, companheirismo e conversas éticas sempre regadas a descobertas científicas inimagináveis! Às repúblicas Scamanacho e F1 pelo suporte materno e por incentivarem uma jovem mãe a se tornar doutora!

À minha turma de doutorado em Ciência Florestal de 2018, que fizeram dos dias de salinha da pós uma aventura gostosa de se viver!

Aos meus pais Lydia e César pelo amor incondicional, educação, incentivo e apoio financeiro nos momentos cruciais.

À minha filha Linda Luz, que se aventurou comigo aos quatro anos de idade para morar em Viçosa e me acompanhar nesse doutorado. Ao meu namorado Bruno Trigo, que muitas vezes ficou de babá e acreditou nesse sonho junto comigo! À minha família budista, que insistia em me lembrar que sim, eu era capaz!

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Lydiane Lucia de Sousa Bastos, filha de Augusto César Nunes Bastos e Lydia Lucia Nunes de Sousa, natural de Manaus, Amazonas, nasceu em 10 de setembro de 1984.

Em março de 2003, ingressou na Universidade Federal do Amazonas - UFAM, graduando-se em Engenharia Florestal em agosto de 2009.

Em 2010, ingressou como aluna especial no Programa Pós-graduação em Ciência Florestal, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Em 2011, assumiu como Engenheira Florestal na Secretaria Municipal do Meio-Ambiente da cidade de João Pessoa, Paraíba.

Em março de 2012, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências de Florestas Tropicais, em nível de Mestrado, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, concluindo os requisitos necessários para obter o título de Mestre em Ciências de Florestas Tropicais com ênfase em Silvicultura Tropical e Germinação de Sementes Florestais em outubro de 2014, com apresentação da dissertação. Mesmo ano em que se tornou mãe.

Em 2015, assumiu como Pesquisadora DCT na Rede de Biocosméticos da Amazônia – Projeto REDEBIO, no INPA.

Em 2016, assumiu como Pesquisadora DTI as análises de sementes florestais no Centro de Sementes Nativas do Amazonas, na UFAM.

Em 2017, assumiu como Pesquisadora Sênior no laboratório de sementes florestais do Instituto Soka Amazônia, em Manaus.

Em agosto de 2018, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal, nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Doctor Scientiae* em março de 2023 com defesa de tese.

“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores”

(Sócrates)

RESUMO

BASTOS, Lydiane Lucia de Sousa, *D.Sc.*, Universidade Federal de Viçosa, março de 2023. **Fogo e fumaças, líquida e gasosa, afetam a fisiologia de sementes de *Senna macranthera* (dc. Ex collad.) H.S.Irwin & Barneby.** Orientador: Fillipe Tamiozzo Pereira Torres. Co-orientadoras: Lausanne Soraya Almeida, Angélica de Cássia Carneiro e Genáina Aparecida de Souza.

A germinação pós fogo tem sido relatada a partir de uma enorme diversidade de espécies vegetais, uma vez que o calor e a fumaça podem quebrar a dormência de sementes enterradas no solo. Apesar dos muitos estudos em regiões temperadas, a contribuição do fogo na germinação de espécies tropicais ainda é pouco compreendida. Além da complexidade da composição química da fumaça, as condições de estresse durante a germinação podem levar a diversas alterações metabólicas, desencadeando a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a germinação e as alterações enzimáticas que ocorreram em sementes de *Senna macranthera* (Fabaceae), uma árvore nativa do Cerrado. Aplicou-se fogo em sementes enterradas a 2 e 5 cm no solo; defumação pela queima de feno; e fumaça líquida com uso de extratos pirolenhosos (EPs) produzidos do carvão de *Eucalyptus* sp. e *Anadenanthera macrocarpa* (angico) diluídos em diferentes concentrações. Utilizou-se sementes embebidas em água destilada, sem aplicação do fogo e fumaça, como testemunha. O teste de germinação durou uma semana e a protrusão da raiz foi o critério germinativo. Um corte foi realizado para verificar a viabilidade de sementes não germinadas. Foram calculadas a porcentagem de germinação (G%), tempo médio e índice de velocidade de germinação. A composição química dos EPs foi identificada por cromatografia gasosa. Foram analisadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX). A germinação da testemunha após sete dias foi de 0%, porém o teste de viabilidade atestou que estavam vivas (intumescimento do tegumento e cotilédones de coloração verde). Houve efeito positivo do fogo na germinação de sementes dormentes enterradas a 5cm embebidas em EP de eucalipto (14,0 G%), seguida das sementes incendiadas a 2cm (11,2 G%) e das que não foram embebidas em EP (10,0 G%). Sementes defumadas apresentaram intumescimento do tegumento, porém estavam mortas (0 G%). Registrou-se 124 compostos orgânicos nos EPs de eucalipto e angico. Piridonas e aldeídos podem ter sido responsáveis pela germinação das sementes embebidas com EP de eucalipto. A germinação das sementes embebidas com um dos EPs de angico, pode ter sido influenciada pelo (Tetrahydrofuran-2-yl) metanol, um derivado do éter. As atividades da SOD aumentaram após EP de eucalipto (F2-1:75) e exposição ao fogo. As atividades da CAT

e POX reduziram após EP de angico (F2-1:50) e fumaça. O efeito do calor e da fumaça líquida na quebra de dormência de sementes sugere que *S. macranthera* é adaptada ao fogo. No entanto, a exposição das sementes à fumaça gasosa reduziu todas as atividades enzimáticas antioxidantes, indicando que este estresse é o mais prejudicial para a germinação, e em cenários de incêndios florestais frequentes seu desenvolvimento ficará prejudicado. Este trabalho indica como prática silvicultural o uso de EP de eucalipto e de angico no tratamento de sementes de *S. macranthera*, devido sua composição antioxidante. É possível que a POX atue na parede celular das sementes reduzindo peróxido, sinalizando dano oxidativo e removendo EROs. Os estudos nessas áreas são encorajados.

Palavras-chave: Germinação pós fogo. Quebra de dormência. Espécie florestal. Extrato pirolenhoso. Defumação. Composição química. Enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

BASTOS, Lydiane Lucia de Sousa, *D.Sc.*, Universidade Federal de Viçosa, March, 2023. **Fire and liquid and gaseous smoke affect the physiology of *Senna macranthera* (dc. Ex collad.) H.S.Irwin & Barneby seeds** Adviser: Fillipe Tamiozzo Pereira Torres. Co-advisers: Lausanne Soraya Almeida, Angélica de Cássia Carneiro and Genaína Aparecida de Souza.

Post-fire germination has been reported from a huge diversity of plant species, since heat and smoke can break the dormancy of seeds buried in the soil. Despite the many studies in temperate regions, the contribution of fire to the germination of tropical species is still poorly understood. In addition to the complexity of the chemical composition of smoke, stress conditions during germination can lead to several metabolic changes, triggering the excessive production of reactive oxygen species (ROS). The objective of this research was to evaluate the germination and the enzymatic alterations that occurred in seeds of *Senna macranthera* (Fabaceae), a tree native to the Cerrado. Fire was applied to seeds buried at 2 and 5 cm in the soil; smoking by burning hay; and liquid smoke with pyroligneous acid (PAs) produced from *Eucalyptus* sp. and *Anadenanthera macrocarpa* (angico) diluted in different concentrations. Seeds soaked in distilled water, without the application of fire and smoke, were used as a witness. The germination test lasted one week and root protrusion was the germination criterion. A cut was performed to verify the viability of non-germinated seeds. Germination percentage (G%), mean time and germination speed index were calculated. The chemical composition of PAs was identified by gas chromatography. The enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POX) were analyzed. The germination of the control after seven days was 0%, but the viability test attested that they were alive (swelling of the tegument and green cotyledons). There was a positive effect of fire on the germination of dormant seeds buried at 5 cm soaked in eucalyptus PA (14.0 G%), followed by seeds burned at 2 cm (11.2 G%) and those that were not soaked in PA (10.0 G%). Smoked seeds showed integument swelling, but they were dead (0 G%). 124 organic compounds were registered in the PAs of eucalyptus and angico. Pyridones and aldehydes may have been responsible for the germination of seeds soaked with eucalyptus PA. Germination of seeds soaked with one of the angico PAs may have been influenced by (Tetrahydrofuran-2-yl) methanol, an ether derivative. SOD activities increased after eucalyptus EP (F2-1:75) and fire exposure. CAT and POX activities decreased after angico PA (F2-1:50) and smoke. The effect of heat and liquid smoke on breaking seed dormancy suggests that *S. macranthera* is adapted to fire. However, exposure of seeds to gaseous smoke reduced all antioxidant enzymatic activities, indicating that this stress is the

most harmful for germination, and in scenarios of frequent forest fires, its development will be impaired. This work indicates as a silvicultural practice the use of PA of eucalyptus and angico in the treatment of *S. macranthera* seeds, due to their antioxidant composition. It is possible that POX acts on the cell wall of seeds reducing peroxide, signaling oxidative damage and removing ROS. Studies in these areas are encouraged.

Keywords: Post fire germination. Dormancy break. Forest species. Pyroligneous acid. Smoking. Chemical composition. Antioxidant enzymes.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
Referências Bibliográficas.....	17
Água de fumaça e extrato pirolenhoso na germinação de sementes	21
Smoke water and pyroligneous acid on seed germination	21
Resumo	21
Abstract.....	21
1. Introdução	21
2. Água de fumaça e a germinação de sementes	23
3. Extrato pirolenhoso.....	26
4. Os componentes na fumaça responsáveis pela germinação de sementes	27
5. Estudos com fumaça no Brasil	28
6. Considerações Finais	29
7. Referências Bibliográficas	30
Germinação de <i>Senna macranthera</i> (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby em resposta ao calor e a fumaça: o papel dos gatilhos de incêndio e o efeito do método de tratamento da fumaça .	37
Resumo	37
Abstract.....	37
1. Introdução	38
2. Material e métodos.....	40
2.1 Procedência das sementes.....	40
2.2 Simulação de incêndio e germinação das sementes	40
2.3 Análise dos dados	42
3. Resultados.....	42
4. Discussão	45
5. Conclusão.....	47
6. Referências bibliográficas.....	47
Composição química de extratos pirolenhosos influencia a germinação de sementes de <i>Senna macranthera</i> (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby	54
Resumo	54
Abstract.....	54
1. Introdução	55
2.1 Carbonização da madeira e preparo dos extratos pirolenhosos	57

2.2 Coleta das sementes e teste de germinação	59
2.3 Análise dos dados	60
2.4 Análise química dos EPs	61
3. Resultados.....	62
3.1 Germinação das sementes após embebição nos extratos	62
3.2 Composição química dos EPs.....	64
4. Discussão	68
5. Conclusão.....	72
6. Referências Bibliográficas	72
Sistema enzimático antioxidante de sementes de <i>Senna macranthera</i> (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby após exposição ao fogo e fumaças gasosa e líquida.....	77
Resumo	77
Abstract.....	77
1. Introdução	77
2. Material e métodos.....	80
2.1 Procedência das sementes	80
2.2 Exposição das sementes ao fogo e fumaças	81
2.3 Ensaio enzimáticos.....	82
2.4 Análise dos dados	84
3. Resultados.....	85
4. Discussão	90
5. Conclusão	94
6. Referências Bibliográficas.....	94
CONCLUSÃO GERAL	102
APÊNDICE A – BIOENSAIOS PRELIMINARES PARA ANÁLISE DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Senna macranthera</i> (FEDEGOSO) APÓS EXPOSIÇÃO A EXTRATOS PIROLENHOSOS	103
APÊNDICE B - RESULTADOS ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	122
ANEXO	127

INTRODUÇÃO GERAL

Durante milhões de anos, o fogo teve um impacto nos ecossistemas, e seu papel na formação dos padrões globais de vegetação é uma das observações mais antigas do mundo natural (Bond et al. 1996; Lamont e He, 2012). A exposição direta a temperaturas mais altas e deposição de cinzas causa mudanças imediatas nas propriedades físicas, biológicas, mineralógicas e químicas do ambiente pós-fogo (Van Staden et al., 2000; Daibes et al., 2018), influenciando as condições do habitat e processos vitais, como floração, frutificação e germinação de sementes (Bradshaw et al., 2011; Keeley et al., 2011; Daibes et al., 2018).

A germinação estimulada pelo fogo pode ser desencadeada por diferentes mecanismos, mas tem como catalisadores primários o calor e a fumaça (Keeley e Fotheringham, 2000; Van Staden et al., 2000), e tem sido relatada a partir de uma enorme diversidade de espécies vegetais. As primeiras investigações sobre a germinação estimulada pelo fogo concentraram-se no papel do calor na superação da dormência das sementes (Sweeney, 1956; Mott e McKeon, 1979; Jefferey et al., 1988; Trabaud e Oustric, 1989a; Trabaud e Oustric, 1989b), e na capacidade da fumaça de promover a germinação das sementes, e o crescimento das mudas (Light et al., 2009; Tormo et al. 2014; Çatav et al., 2018). Inicialmente, foi proposto que o calor e a fumaça eram gatilhos alternativos e exclusivos de sementes armazenadas no solo (Grant et al., 1997), com sementes estimuladas pela fumaça sendo mortas pelo calor letal do fogo (Zacharias et al., 1988) e sementes estimulada pelo calor, sendo geralmente inalteradas pela fumaça (Ramos et al., 2019). No entanto, esse comportamento pode mudar de acordo com o ambiente, tempo de exposição, intensidade do estresse e fatores climáticos (Daibes, et al., 2018).

Pesquisas sobre os efeitos da fumaça na germinação de espécies vegetais concentraram-se principalmente nos ecossistemas sul-africanos (Van Staden et al., 2000; Abedi et al., 2018), australianos (Dixon et al., 1995 , Lloyd et al., 2000; Morris, 2000), ecossistemas mediterrâneos na Espanha (Moreira et al., 2010; Tormo et al., 2014; Moreira e Pausas, 2016), chaparral californiano (Keeley e Fotheringham, 2000), Ásia ocidental (Çatav et al., 2015, Naghipour et al., 2016 , Zaki e Abedi, 2017, Zaki et al., 2018) e ecossistemas livres de fogo (Ferraz et al., 2013; Bargmann et al., 2014). Porém, informações sobre espécies de outras regiões, especialmente do Cerrado brasileiro, são raras.

Senna macranthera (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby é uma espécie arbórea da família Fabaceae, nativa do Cerrado, com uso potencial na arborização urbana e em projetos de recuperação de áreas degradadas, por ser espécie pioneira, de rápido crescimento e indicadora

de biodiversidade (Lorenzi, 2021). No entanto, possui sementes pequenas e cerosas o que lhe confere uma dormência física causada pela impermeabilidade do tegumento (Carvalho e Nakagawa, 2000) e ainda não se sabe qual gatilho de fogo pode promover sua germinação.

As dormências física e fisiológica são o tipo mais comum em espécies de ecossistemas pluviométricos sazonais, que inclui muitos ambientes propensos a incêndios (Baskin e Baskin, 2014), e são fortemente influenciadas por sinais ambientais como temperatura, umidade e radiação solar (Willis et al., 2014; Collette e Ooi, 2017). Entretanto, em regiões tropicais úmidas quando o calor dos incêndios quebra a dormência das sementes há diminuição do seu vigor (Soares et al., 2021). No caso de *S. macranthera*, uma vez superada esta dormência, as sementes germinam em até 14 dias com alta porcentagem de germinação (Brasil, 2013). A rápida germinação é vantajosa uma vez que permite a colonização da área em menor tempo e aumenta as vantagens na competição com outras espécies (De Luis et al., 2008; Sparg et al., 2005). Sendo assim, espécies cuja germinação seja estimulada pelo fogo (calor danificando o tegumento ou efeitos químicos da fumaça) possuirão vantagem sobre as demais no estabelecimento no ambiente após a ocorrência de um incêndio. E já existem alguns tratamentos silviculturais que podem ser realizados para acelerar o desenvolvimento de plantas, que exibem comportamento estimulado pelo calor e fumaça (Arruda et al., 2012; Ferraz et al., 2013).

Tratamentos à base de fumaça líquida são baseados no princípio da condensação da fumaça dos incêndios com a umidade da atmosfera. Esses tratamentos podem derivar de diferentes fontes vegetais e metodologias de preparo (Campos, 2007) e podem fornecer sinais ecológicos e fisiológicos das espécies para responder a diferentes estímulos. O ácido pirolenhoso (PA), ou extrato pirolenhoso (EP), ou fumaça líquida, ou extrato aquoso da fumaça (serão adotados todos estes sinônimos ao longo do texto), é um derivado do carvão vegetal, e tem sido testado em uma ampla gama de espécies de ambientes propensos (Keeley and Fotheringham, 2000; Crosti et al., 2006; Brown et al., 2003) ou não (Ferraz et al., 2013) ao fogo. Estudos com espécies florestais relataram redução no desenvolvimento de clones de eucalipto (Souza-Silva et al., 2006), e aumento no crescimento radicular e foliar de mudas de pinus quando submetidos à fumaça líquida (Porto et al., 2007). No entanto, ainda há uma lacuna em relação a pesquisas do uso do PA na germinação de sementes florestais e os estudos existentes evidenciam que há diferentes respostas das espécies submetidas ao extrato, o que reforça a necessidade de mais estudos nesta área.

Vários compostos foram identificados em fumaça líquida nos últimos anos, por exemplo, os butenolídeos *karrikins* e alguns compostos nitrogenados, que são substâncias

conhecidas por estimularem a germinação em sementes de espécies de uma ampla gama de famílias de plantas de ecossistemas propensos ou não ao fogo (Ghebrehiwot et al., 2008; Nelson et al., 2012; Downes et al., 2014; Keeley e Pausas, 2018). Porém, sua utilização depende de fatores como material vegetal (Ferraz et al., 2013; Stirk et al., 2016) e concentração da solução (Minorsky, 2000; Arruda et al., 2012), uma vez que a fumaça também é conhecida por ter um efeito tóxico, inibindo a germinação em altas concentrações (Light et al., 2002). Além da complexidade da composição química dessas fumaças as condições de estresse durante a germinação podem levar a diversas alterações metabólicas, afetando a germinação e a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Smirnoff e Arnoud, 2019). O que pode prejudicar o estabelecimento de espécies com comportamento germinativo estimulado pelo fogo, em biomas suscetíveis a incêndios florestais recorrentes.

Nos últimos anos, muita ênfase tem sido dada ao papel das EROs relacionadas na função da planta, devido ao seu desempenho no controle de processos como crescimento, desenvolvimento e, principalmente, respostas a estímulos ambientais bióticos e abióticos (Smirnoff e Arnoud, 2019). Embora as EROs atuem como mensageiras secundárias em vários fenômenos fisiológicos importantes, elas também induzem dano oxidativo sob várias condições de estresse ambiental, como salinidade, seca, frio, metais pesados, irradiação ultravioleta - UV (Miller et al, 2010). Quando um delicado equilíbrio entre produção e eliminação de EROs é interrompido, acontece dano celular que se manifesta com a degradação de biomoléculas como pigmentos, proteínas, lipídeos, carboidratos e ácido desoxirribonucleico - DNA, que culmina na morte celular vegetal (Apel e Hirt, 2004; Foyer e Noctor, 2005). Para minimizar os efeitos desses danos as plantas desenvolveram uma maquinaria antioxidante enzimática como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), e peroxidase (POX).

Com o objetivo de avaliar o comportamento germinativo e as alterações enzimáticas que ocorreram durante a germinação de *Senna macranthera*, as sementes dessa espécie foram submetidas a diferentes tipos de estresse de calor e fumaças. Realizou-se experimentos e os resultados foram relatados em quatro partes, em formato de artigos científicos.

Na primeira parte, o artigo “Água de fumaça e extrato pirolenhoso na germinação de sementes” aborda os tratamentos mais difundidos à base de fumaça no melhoramento tanto das condições de solo, quanto no crescimento de mudas de espécies. Apresenta ainda, exemplos de algumas experiências com espécies brasileiras.

Na segunda parte, o artigo “Germinação de *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby em resposta ao calor e a fumaça: o papel dos gatilhos de incêndio e o efeito do método de tratamento da fumaça” aborda o experimento realizado com aplicação de fogo, defumação e PA de eucalipto na germinação das sementes. Esse artigo foi publicado na revista South African Journal of Botany com o título “Germination of *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby in response to heat and smoke” na edição de março de 2023, Volume 154, Páginas 219-224.

Na terceira parte, o artigo “Composição química de extratos pirolenhosos influencia a germinação de sementes de *Senna macrathera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby” apresenta como a composição química dos extratos pode ter influenciado positiva e negativamente a germinação das sementes. E por fim, na quarta parte, o artigo “Sistema enzimático antioxidante de sementes de *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby após exposição ao fogo e fumaças gasosa e líquida” explica como a “maquinaria antioxidante” da espécie atuou contra os danos oxidativos, provocados pela exposição ao fogo e fumaças.

Ao final deste documento, as considerações finais apresentam um apanhado de descobertas e indicações de preparo e mistura de extratos pirolenhosos como prática silvicultural no tratamento de sementes de *Senna macranthera*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedi, M. et al. 2018. Germination patterns of the scrublands in response to smoke: The role of functional groups and the effect of smoke treatment method. South African Journal of Botany, v. 115, p. 231-236.
- Arruda, Y. M. B. et al. 2012. Sources and concentrations of smoke-water on the seed germination and seedling vigor of tomato. Horticultura Brasileira, v. 30, n. 2, p. 293-299,
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Bargmann, T. et al. 2014. Life after fire: smoke and ash as germination cues in ericads, herbs and graminoids of northern heathlands. Applied vegetation science, v. 17, n. 4, p. 670-679.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M. 2014. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Second ed. Elsevier/Academic Press, San Diego.
- Bond, W. J. et al. 1996. Why and how do ecosystems burn?. In Fire and plants p. 16-33, Springer, Dordrecht.

- Bradshaw, S. D. et al. 2011. Little evidence for fire-adapted plant traits in Mediterranean climate regions. *Trends in plant science*, v. 16, n. 2, p. 69-76.
- Brown, N. A. C., Van Staden, J., Daws, M. I., Johnson, T. 2003. Patterns in the seed germination response to smoke in plants from the Cape Floristic Region, South Africa. *South African Journal of Botany*, 69(4), 514-525.
- Campos, A. D. 2007. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. Embrapa Clima Temperado-Circular Técnica (INFOTECA-E), Pelotas.
- Carvalho, N. M., Nakagawa, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. FUNEP, Jaboticabal
- Collette, J. C., Ooi, M. K. J. 2017. Germination ecology of the endangered species *Asterolasia buxifolia* (Rutaceae): smoke response depends on season and light. *Australian Journal of Botany*, 65(3), 283-291.
- Crosti, R., Ladd, P. G., Dixon, K. W., Piotto, B. 2006. Post-fire germination: the effect of smoke on seeds of selected species from the central Mediterranean basin. *Forest Ecology and Management*, 221(1-3), 306-312.
- Çatav, Ş.S. et al. 2015. Effects of aqueous smoke and nitrate treatments on germination of 12 eastern Mediterranean basin plants. *Annales Botanici Fennici*, v. 52, p. 93–100.
- Daibes, L. F. et al. 2018. Gaps critical for the survival of exposed seeds during Cerrado fires. *Australian Journal of Botany*, v. 66, n. 2, p. 116-123
- De Luis, M., Raventós, J., Wiegand, T., Carlos González-Hidalgo, J. 2008. Temporal and spatial differentiation in seedling emergence may promote species coexistence in Mediterranean fire-prone ecosystems. *Ecography*, 31(5), 620-629.
- Dixon, K.W., Merritt, D.J., Flematti, G.R., Ghisalberti, E.L. 2009. Karrikinolide—a phytoreactive 608 compound derived from smoke with applications in horticulture, ecological restoration and 609 agriculture. *Acta Horticulturae*, 813, 155-170.
- Downes, K. S., Light, M. E., Pošta, M., Kohout, L., van Staden, J. 2014. Do fire-related cues, including smoke-water, karrikinolide, glyceronitrile and nitrate, stimulate the germination of 17 *Anigozanthos* taxa and *Blancoa canescens* (Haemodoraceae)? *Australian Journal of Botany*, 62(4), 347-358.
- Ferraz, I. D. K. et al. 2013. Smoke-water effect on the germination of Amazonian tree species. *South African Journal of Botany*, 87, 122-128,
- Ferreira, R. A., Davide, A. C., Motta, M. S. 2004. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. e *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn.; num banco de sementes em solo de viveiro. *Revista Brasileira de Sementes*, 26(1), 24-31.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The plant cell*, 17(7), 1866-1875.
- Grant, C. D. et al. 1997. Fuel characteristics, vegetation structure and fire behaviour of 11–15 year-old rehabilitated bauxite mines in Western Australia. *Australian Forestry*, 60(3), 147-157.

- Ghebrehiwot, H. M., Kulkarni, M. G., Kirkman, K. P., Van Staden, J. 2008. Smoke-Water and a Smoke-Isolated Butenolide Improve Germination and Seedling Vigour of *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter under High Temperature and Low Osmotic Potential. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(4), 270-277.
- Jeffery, D. J. et al. 1988. Effects of dry heat on seed germination in selected indigenous and alien legume species in South Africa. *South African Journal of Botany*, 54(1), 28-34.
- Keeley, J. E.; Fotheringham, C. J. 2000. Role of fire in regeneration from seed. *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*, 2, 311-330.
- Keeley, J. E., Pausas, J. G. 2018. Evolution of 'smoke'-induced seed germination in pyroendemic plants. *South African Journal of Botany*, 115, 251-255.
- Keeley, J. E. et al. 2011. Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. *Trends in plant science*, 16(8), 406-411.
- Lamont, Byron B.; HE, Tianhua. 2012. Fire-adapted Gondwanan angiosperm floras evolved in the Cretaceous. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, n. 1, p. 1-11.
- Lloyd, M.V. et al. 2000. Comparative effects of different smoke treatments on germination of Australian native plants. *Austral Ecology* 25, 610–615.
- Light, M. E. et al. 2002. Dual regulation of seed germination by smoke solutions. *Plant Growth Regulation*, 37(2), 135-141.
- Lorenzi, H. 2021. Árvores Brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, Insitituto Plantarum, V. 3, 3ªEd, Nova Odessa.
- Minorsky, P. V. 2002. The hot and the classic. *Plant Physiology*, 130(2), 517.
- Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. U. L. T. A. N., & Mittler, R. O. N. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4), 453-467.
- Moreira, B. et al. 2010. Disentangling the role of heat and smoke as germination cues in Mediterranean Basin flora. *Annals of Botany* 105, 627–635.
- Morris, E. C. 2000. Germination response of seven east Australian *Grevillea* species (Proteaceae) to smoke, heat exposure and scarification. *Australian Journal of Botany* 48, 179–189.
- Moreira, B., Pausas, J.G., 2016. Shedding light through the smoke on the germination of Mediterranean Basin flora. *South African Journal of Botany*
- Mott, J. J.; Mckee, G. M. 1979. Effect of heat treatments in breaking hardseededness in four species of *Stylosanthes*. *Seed Science and Technology*, 7(1), 15-25.
- Naghipour, A.A. et al. 2016. Effects of smoke, ash and heat shock on seed germination of seven species from Central Zagros rangelands in the semi-arid region of Iran. *African Journal of Range and Forage Science* 33, 67–71.
- Nelson, D. C., Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., Smith, S. M. 2012. Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. *Annual review of plant biology*, 63, 107-130.

- Porto, P. R., Sakita, A. E. N., Nakaoka, S. M. 2007. Efeito da aplicação do extrato pirolenhoso na germinação e no desenvolvimento de mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. IF-Série Registros, 31, 15-19.
- Ramos, D. M. et al. 2019. Fire cues trigger germination and stimulate seedling growth of grass species from Brazilian savannas. *American Journal of Botany*, v. 106, n. 9, p. 1190-1201,
- Soares, V. C., Scremin-Dias, E., Daibes, L. F., Damasceno-Junior, G. A., Pott, A., de Lima, L. B. 2021. Fire has little to no effect on the enhancement of germination, but buried seeds may survive in a Neotropical wetland. *Flora*, 278, 151801.
- Souza-Silva, A., Zanetti, R., Carvalho, G. A., Mendonça, L. A. 2006. Qualidade de mudas de eucalipto tratadas com extrato pirolenhoso. *Cerne*, 12(1), 19-26.
- Smirnoff, N., & Arnaud, D. 2019. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221(3), 1197-1214.
- Sparg, S. G., Kulkarni, M. G., Light, M. E., Van Staden, J. 2005. Improving seedling vigour of indigenous medicinal plants with smoke. *Bioresource technology*, 96(12), 1323-1330.
- Stirk, W. A. et al. 2016. Effect of smoke-derived extracts on *Spirodela polyrhiza*, an aquatic plant grown in nutrient-rich and-depleted conditions. *Aquatic Botany*, 129, 31-34.
- Sweeney, J. R. 1956. Responses of vegetation to fire: a study of the herbaceous vegetation following chaparral fires. University of California Press.
- Trabaud, L.; Oustric, J. 1989a. Heat requirements for seed germination of three *Cistus* species in the garrigue of southern France. *Flora*, 183(3-4), 321-325.
- Trabaud, L., Oustric, J. 1989b. Comparaison des stratégies de régénération après incendie chez deux espèces de ciste. *Revue d'écologie*.
- Tormo, J. et al. 2014. Field evidence of smoke-stimulated seedling emergence and establishment in Mediterranean Basin flora. *Journal of vegetation science*, 25(3), 771-777.
- Van Staden J. et al. Smoke as a germination cue. 2000. *Plant Species Biology* 15: 167–178.
- Willis, C. G., Baskin, C. C., Baskin, J. M., Auld, J. R., Venable, D. L., Cavender-Bares, J., ... NESCent Germination Working Group. 2014. The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytologist*, 203(1), 300-309.
- Zacharias, P. J. K. et al. 1988. The effect of fire on germination in five common veld grasses. *Journal of the Grassland Society of southern Africa*, 5(4), 229-230.
- Zaki, E. et al. 2018. Seed germination responses of different functional groups to aerosol and smoke water treatments. *Journal of Plant Researches* v. 30, n. 4, p. 803-814.
- Zaki, E., Abedi, M. 2017. Germination study of Three perennial grasses *Stipa caucasica*, *Festuca valensica* and *Poa densa* to smoke and heat. *Journal of Rangeland* 10, 474–482.

Água de fumaça e extrato pirolenhoso na germinação de sementes

Smoke water and pyroligneous acid on seed germination

Resumo

A germinação estimulada por fumaça tem sido relatada a partir de uma enorme diversidade de espécies vegetais. Pesquisas com água de fumaça e extratos pirolenhosos tem sido amplamente defendidas como promotores de germinação. Aqui mostramos que a germinação estimulada pela fumaça é uma característica complexa com diferentes compostos envolvidos e, que apesar de ser um assunto amplamente discutido no mundo, as pesquisas com espécies vegetais brasileiras ainda são raras.

Abstract

Smoke-stimulated germination has been reported from an enormous diversity of plant species. Research with smoke water and pyroligneous acids has been widely advocated as germination promoters. Here we show that smoke-stimulated germination is a complex characteristic with different compounds involved and, despite being a widely discussed subject in the world, research with Brazilian plant species is still rare.

1. Introdução

O fogo afeta os ecossistemas há milhões de anos e seu papel principal na formação dos padrões de vegetação global é uma das observações mais antigas do mundo natural ([Bond e Van Wilgen, 1996](#); [Lamont e He, 2012](#)). Também é reconhecido que o fogo (queima) induz mudanças imediatas nas propriedades físicas, biológicas, mineralógicas e químicas do ambiente pós-incêndio como resultado da exposição direta a temperaturas mais altas e deposição de cinzas ([Van Staden et al., 2000](#); [Daibes et al., 2018](#)), afetando assim, as condições do habitat e processos vitais como floração, frutificação e germinação de sementes ([Bradshaw et al., 2011](#); [Keeley et al., 2011](#); [Daibes et al., 2018](#)).

A germinação pós fogo pode ser desencadeada por diferentes mecanismos, sendo o calor e a fumaça os principais propulsores ([Keeley e Fotheringham, 2000](#); [Van Staden et al., 2000](#)). Os primeiros estudos sobre a germinação estimulada pelo fogo concentraram-se no papel

do calor na quebra de dormência das sementes (Sweeney, 1956; Mott e McKeon, 1979; Jefferey et al., 1988; Trabaud e Oustric, 1989a; Trabaud e Oustric, 1989b), e da fumaça estimulando a germinação de sementes e o crescimento das plântulas (Light et al., 2009; Tormo et al., 2014; Çatav et al., 2018).

Inicialmente, foi sugerido que o calor e a fumaça eram gatilhos alternativos e exclusivos das sementes armazenadas no solo (Grant e Koch, 1997), onde as sementes estimuladas pela fumaça tendem a ser mortas pelo calor letal dos incêndios (Zacharias et al., 1988) e que sementes estimuladas pelo calor geralmente não são afetadas pela fumaça (Ramos et al., 2019). No entanto, a relevância do calor ou da fumaça como sinais de germinação ainda é incerta ou indeterminada. Entretanto, o emprego de técnicas a partir da fumaça para responder mecanismos ecológicos, são também utilizadas nas indústrias alimentícias, agrícolas e florestais.

A Água de Fumaça, ou *smoke water*, é uma solução a base de fumaça, sendo essa gerada em laboratório, pela queima de galhos finos ou folhas secas de herbáceas, ervas, arbustos ou palmeiras e árvores a uma temperatura entre 60 e 120°C (Jain e Van Staden, 2007; Arruda et al., 2012, Ferraz et al., 2013). A fumaça gerada é diluída, simulando a condensação da fumaça na atmosfera gerada em um incêndio real. As pesquisas realizadas com água de fumaça explicam principalmente o efeito da fumaça na regeneração do banco de sementes do solo incendiado ou não (Rokich et al., 2002; Abedi et al., 2018); e na dormência das sementes desse banco (Merrit et al., 2007; Ramos et al., 2019). Fornecendo pistas ecológicas e fisiológicas tomadas pelas espécies para responder a diferentes estímulos, nesse caso, a fumaça.

O Extrato Pirolenhoso (EP), ou *pyroligneous acid*, é um líquido obtido através da condensação da fumaça gerada pela carbonização da madeira na produção do carvão vegetal (Campos, 2007). A composição do EP em sua maior parte é de água e mais de 200 compostos orgânicos, dentre eles ácido acético, álcoois, cetonas, fenóis e alguns derivados de lignina (Yang et al., 2007). Esse produto pode ser obtido de diferentes espécies vegetais, como o bambu, o eucalipto e o pinus (Alves, 2006; Campos, 2007). Na Agricultura Natural é utilizado como potencializador de herbicida (Zeferino et al., 2018), fertilizante orgânico (Souza-Silva et al., 2006), indutor de enraizamento (Porto et al., 2007), inseticida (Alves et al., 2007) e até na culinária (Zhang et al., 2020). Cada uso depende de uma forma correta de diluição ou mistura.

As técnicas de manipulação da fumaça são utilizadas para melhoria das condições ambientais e ecológicas que podem promover a germinação de sementes e o desenvolvimento de espécies vegetais tanto *ex situ* (Van Staden et al., 2000) quanto *in situ* (Rokich e Dixon,

2007; Ghebrehiwot et al., 2008; Tormo et al., 2014). Portanto, os tratamentos de fumaça são agora amplamente aceitos em estudos de simulação de incêndio (Baskin e Baskin, 2014). No entanto, as metodologias utilizadas para simular esses efeitos variam de acordo com a região do estudo e as espécies-teste. Nesta revisão serão abordados os últimos estudos sobre o efeito da água de fumaça e do extrato pirolenhoso na germinação de sementes, bem como as metodologias utilizadas para produzir essas soluções.

2. Água de fumaça e a germinação de sementes

Depois do fogo, muitos ecossistemas são capazes de se regenerar, enquanto outros são radicalmente alterados (Cochrane e Ryan, 2009). Consequentemente, a maioria dos estudos anteriores sobre os efeitos do fogo na regeneração (germinação) de ecossistemas inflamáveis focados nos atributos físicos (Christensen e Muller, 1975) fornece informações limitadas sobre os estímulos químicos do fogo, por exemplo, fumaça e madeira carbonizada (Wicklow, 1977).

No início da década de 70, Bhalla & Sabharwal (1973) haviam constatado **inibição** da germinação de sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) e cebola (*Allium cepa*) utilizando extratos solúveis em água de fumaça de tabaco, preparados a partir do cigarro. Em 1977, houve o primeiro relato de madeira queimada **estimulando** a germinação de *Emmenanthe penduliflora* (Boraginaceae) no chaparral californiano (Wicklow, 1977). Essa nova ênfase de produtos químicos a partir da combustão de biomassa desempenhando um papel no estímulo da germinação de espécies pós-fogo, foi confirmada também por Jones e Schlesinger (1980) e Keeley e Nitzberg (1984).

De Lange e Boucher (1990) foram os primeiros a relatar uma melhoria acentuada na germinação de espécies a partir de extratos aquosos de fumaça. Eles geraram fumaça em um tambor e usando ar comprimido, a fumaça foi borbulhada através da água destilada. Com base neste método, uma ampla variedade de materiais têm sido usados para preparar extratos aquosos de fumaça (Brown e Van Staden, 1997, Arruda et al., 2012, Ferraz et al. 2013). Desde o relatório de Lange e Boucher, os pesquisadores usaram o termo germinação estimulada por 'fumaça' e, por ser mais sucinto do que a germinação estimulada por 'produto de combustão', seguiremos essa nomenclatura aqui.

A água de fumaça pode ser preparada em laboratório pela queima de papel de germinação ou pela queima de espécies herbáceas nativas (Jain e Van Staden, 2007), folhas de angiospermas (Ferraz et al., 2013; Stirk et al., 2016) e gimnospermas (Kalogridis et al., 2018).

O efeito da água de fumaça varia em função da espécie e do tipo de material (galho ou folha) usado na combustão (Ferraz et al., 2013), seu estado (seco e/ou fresco), bem como a concentração de fumaça na água (Minorsky, 2000; Arruda et al., 2012), uma vez que a fumaça também é conhecida por ter um efeito inibitório na germinação em altas concentrações (Light et al., 2002). Diluições de extratos de fumaça com água em proporções de 1:10 (Ramos et al., 2019) 1: 250; 1: 500; 1: 1000; (v / v) (Abedi et al., 2018) são geralmente eficazes na promoção da germinação vegetativa, embora varie de espécie para espécie.

Os benefícios da fumaça em relação a produtividade são vários, como o aumento da taxa de germinação (Brown et al., 2003), aumento da velocidade de crescimento (Van Staden et al., 2007), e formação de raízes secundárias (Kulkarni et al., 2007), maior comprimento (Sparg et al., 2006) e maior massa fresca de plântulas (Van Staden et al., 2006). Além disso, o tipo de método no tratamento da fumaça influencia na germinação de sementes. Em uma floresta no norte do Irã, a fumaça condensada e diluída em água (1:1000) aumentou em até duas vezes a germinação de gramíneas perenes e anuais do banco de sementes do solo em comparação com a fumaça em aerossol (Tabela 1), indicando que a fumaça pode alterar os padrões de regeneração em grupos funcionais distintos (Abedi et al., 2018). Pois, enquanto as espécies perenes alocam recursos para estruturas que aumentem sua chance de sobreviver ao próximo incêndio, as anuais acumulam sementes no banco de sementes do solo como forma de garantir a sobrevivência pós fogo (Bond e Midgley, 2003; Pausas et al., 2004).

Tabela 1. Efeito de diferentes tratamentos de fumaça na germinação de sementes do solo de Savanas Africanas (valores médios de contagem de plântulas obtido do modelo \pm DP, ni = 10). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) dentro das espécies entre os tratamentos no teste Tukey. (Fonte: Abedi et al., 2018)

Effect of different smoke treatments on soil seed germination (mean seedling count values obtained from model \pm SE, n = 10). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) within species among treatments in post-hoc Tukey's Test.

	Control	Aerosol smoke	Smoke-water
Annual grasses (AG)	36 \pm 5a	33 \pm 5a	48 \pm 6b
Annual herbs (AH)	26 \pm 2a	70 \pm 6c	54 \pm 5b
Legumes (L)	2 \pm 1a	4 \pm 1b	3 \pm 1b
Perennial grasses (PG)	84 \pm 11c	46 \pm 6a	70 \pm 9b
Perennial herbs (PH)	11 \pm 2a	11 \pm 2a	12 \pm 2a

(Fonte: Abedi et al., 2018)

Alguns estudos sugerem que o calor não seja necessário para a resposta da germinação, pois a aplicação de fumaça fria induziu um aumento de até 48 vezes no número de mudas em germinação e um enriquecimento de aproximadamente três vezes na abundância de espécies em ensaios de campo (Rokich et al., 2002). A fumaça também interagiu com o escuro e promoveu a germinação de duas espécies do banco de sementes do solo na savana brasileira, bioma que sofre com constantes incêndios florestais (Ramos et al., 2019). A água de fumaça na concentração de 1:10 aumentou a taxa de germinação de *Aristida riparia* e *Aristida recurvata* no escuro (Figura 1), indicando que a fumaça supera a foto inibição dessas espécies, agindo como um sinalizador de que o fogo já ocorreu, e que agora as sementes podem germinar (Ramos et al., 2019).

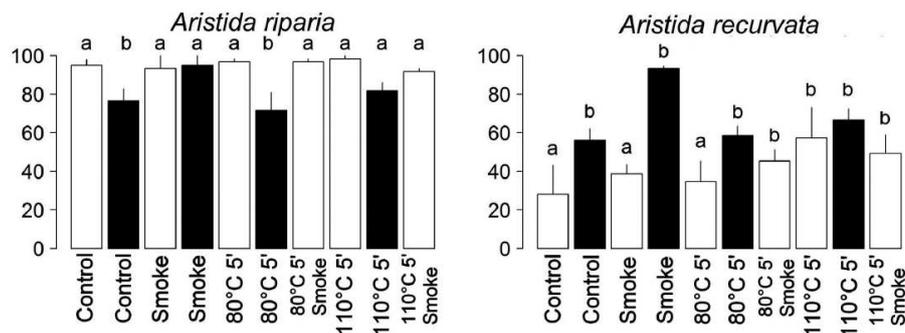


Figura 1. Efeitos das temperaturas sazonais de incubação, choque térmico, água de fumaça e luz na germinação de sementes de espécies de grama de Savanas brasileiras. Germinação média \pm DP. Barras pretas: germinação no escuro; barras brancas; germinação em fotoperíodo escuro e claro alternado. Letras mostram diferenças significativas para comparações múltiplas realizadas apenas entre o controle na luz contra todos os tratamentos. (Fonte: Ramos et al., 2019)

Entretanto, soluções a base de água de fumaça não são as únicas metodologias estudadas como promotor da germinação e crescimento de plântulas. Em 1945, foi publicado o primeiro livro, intitulado “Fabricação e Utilização do Extrato Pirolenhoso”, por Tatsujiro Fukuda, com relatos interessantes sobre a eficiência do extrato pirolenhoso na cultura do arroz. As pesquisas com extrato pirolenhoso serão abordadas a seguir.

3. Extrato pirolenhoso

O extrato pirolenhoso (EP), ou fração pirolenhosa, também conhecido como ácido pirolenhoso (PA), vinagre de madeira ou fumaça líquida, é obtido pela condensação da fumaça formada pela queima da madeira na produção de carvão vegetal (Campos, 2007). Trata-se de um líquido de cor amarela a marrom avermelhada, composto, em sua maior parte, por água e mais de 200 compostos orgânicos, dentre eles ácido acético, álcoois, cetonas, fenóis e alguns derivados de lignina são liberados principalmente a temperaturas relativamente baixas, ou seja, 200-400 °C e 300-450 °C a partir da hemicelulose e celulose, respectivamente (Yang et al., 2007).

O extrato pirolenhoso pode ser obtido de diferentes espécies vegetais, como bambu, eucalipto e pinus (Maekawa, 2002). E quando diluído em água e aplicado ao solo em concentrações variando de 5 a 20 mL L⁻¹, melhora seus atributos físicos e químicos, proporciona aumento da população de microrganismos benéficos ao desenvolvimento vegetal, como actinomicetes e micorrizas e, portanto, favorece a disponibilização de nutrientes para as plantas (Miyasaka et al., 1999).

Atualmente, os principais países produtores de extrato pirolenhoso são o Japão, China, Indonésia, Malásia, Brasil e Chile. A fabricação e utilização do extrato pirolenhoso é muito antiga. Na China existem relatos de sua utilização há milênios e na Índia foi muito utilizado para curar doenças. Na Europa, no século 17, já havia destilação seca de madeira para produção de alcatrão, com relato de aproveitamento do líquido pirolenhoso para ser utilizado na coloração do linho e em 1941, já havia oito companhias produzindo o extrato pirolenhoso com grandes lucros (BSHS, 1988).

O extrato pirolenhoso bruto é descrito como um condensado cru que consiste principalmente de água, entretanto, deve ser produzido rigorosamente dentro das recomendações para a obtenção de um produto de boa qualidade, o mais livre de alcatrão possível (FAO, 1987). A presença de alcatrão no extrato pirolenhoso o torna muito tóxico e inviável para a utilização na agricultura, pois é altamente poluente, contendo componentes cancerígenos, como benzopirenos e outros. As técnicas de separação destes produtos são eficientes e, quando seguidas corretamente, permitem obter um produto de qualidade muito boa e livre de riscos (Campos, 2007).

Hoje existem fornos e fornalhas adaptados para coleta do extrato pirolenhoso. A Embrapa disponibilizou uma circular técnica (Nº 65 de 2007), onde informa com detalhes como

o produtor rural pode construir seu próprio forno, que poderá ser construído com terra argilosa, pedra comum, tijolo, concreto ou outro material. E enfatiza que para a obtenção de um EP de boa qualidade, é importante a temperatura de coleta, e mesmo na ausência de um termômetro, a cor da fumaça pode indicar o momento apropriado para coleta do EP. Na fase inicial, logo após o forno ser aceso, a cor da fumaça é branca opaca. Nesta fase a quantidade de água presente no líquido é alta, e a coleta do extrato pirolenhoso deve ser evitada. A coleta deve ser interrompida quando a temperatura na saída da primeira chaminé atingir 120 a 150° C, e a cor da fumaça ainda estiver amarela esbranquiçada. Se a fumaça ficar azulada, devido à temperatura muito alta no interior do forno, a substância extraída será alcatrão (Campos, 2007).

No Brasil as pesquisas com EP na agricultura confirmam seu uso no crescimento de plântulas, sobretudo de espécies agrícolas como tomate (Guerreiro et al., 2012) e alface (Mascarenhas et al., 2006a), enriquecimento nutricional na ração animal (Nunes, 2019), crescimento de orquídeas (Schnitzer et al., 2015) e controle biológico de pragas (Alves et al., 2007). Apesar dos efeitos otimistas para o extrato pirolenhoso, existe escassez de informações científicas que possam dar suporte à utilização deste produto e à compreensão dos mecanismos pelos quais funciona, especialmente no que se refere à germinação de sementes.

Tentativas de estudar os efeitos da fumaça na fisiologia das plantas foram confundidas pela complexa mistura de componentes da fumaça, alguns dos quais conferem toxicidade em altas concentrações (Light et al., 2002; Daws et al., 2007). O fracionamento da fumaça condensada guiada por bioensaio culminou na descoberta e síntese de vários compostos, que a partir da queima de celulose conferem características germinativas em sementes. Os principais componentes químicos existentes na fumaça serão abordados a seguir.

4. Os componentes na fumaça responsáveis pela germinação de sementes

Nos últimos anos, muitos esforços foram feitos por numerosos laboratórios para determinar quais componentes da fumaça estimulam a germinação. E após décadas de trabalho, ficou evidente que muitos produtos químicos orgânicos e inorgânicos gerados ou liberados pela fumaça estimularão a germinação de sementes de plantas, que exibem germinação estimulada pelo fogo (Keeley e Pausas, 2018).

Em 2004, dois estudos independentes relataram a descoberta de uma molécula orgânica isolada da fumaça derivada de plantas, o 3-metil- 2H- furo [2,3- c] piran-2-ona, em uma classe conhecida como butanolídeos, que tem uma atividade altamente estimulante no

desencadeamento de germinação de espécies de recrutamento (Flematti et al., 2004; Van Staden et al., 2004). Essa família de moléculas de butenolídeo foram denominadas de carriquilionídeos, chamada depois de "karrikin", a primeira palavra aborígine Nyungar registrada para fumaça (Dixon et al., 2009).

O *karrikin* ganhou a atenção como “o composto na fumaça” responsável por promover a germinação das sementes de pós-fogo (Flematti et al., 2007; Flematti et al., 2009). No entanto, grande parte da literatura sugere que a germinação estimulada pela fumaça é uma característica muito mais complexa e apoia a ideia de que vários compostos presentes na fumaça podem estimular a germinação (Daws et al., 2007; Downes et al., 2010; Downes et al., 2014), como por exemplo os compostos nitrogenados resultantes da combustão de biomassa, que parecem ter um papel na germinação de piroendêmicos estimulados pela fumaça, incluindo gliceronitrila (cianidrina), que pode levar à formação de óxido de nitrogênio (Flematti et al., 2011, Downes et al., 2014).

Desde o estudo pioneiro de De Lange e Boucher (1990), o papel da fumaça como fator regulador da germinação de sementes fascinou botânicos e o assunto foi extensivamente examinado (Van Staden et al., 2000). Até a presente data, foi demonstrado que a fumaça derivada de plantas (aerossol e soluções) e o karrikin (doravante denominado KAR 1) é estimulante amplamente eficaz que aumenta a germinação de sementes de mais de 1200 espécies em mais de 80 gêneros em todo o mundo (Dixon et al., 2009).

5. Estudos com fumaça no Brasil

Os efeitos profundos e complexos da fumaça no estímulo de crescimento da vegetação podem estar relacionados a vários fatores. Em primeiro lugar, há respostas variáveis de espécies de habitats propensos ao fogo e livres de fogo (Brown et al., 2003; Keeley e Fotheringham, 2000; Van Staden et al., 2000). Diferentes tipos de espécies, incluindo gramíneas (Baxter et al., 1994; Read e Bellairs, 1999, Ghebrehiwot et al., 2008; Abedi et al., 2018; Ramos et al., 2019), ervas (Brown et al., 2003; Mojzes e Kalapos, 2014, Çatav et al., 2014) e espécies lenhosas (Gómez- González et al., 2008, Ferraz et al., 2013) podem responder positivamente a fumaça. Aparentemente, a resposta da espécie à fumaça pode estar associada às suas condições nativas (Rawson et al., 2013) ou exóticas (Figuerola et al., 2009), histórico de fogo (Bargmann et al., 2014) e habilidade de reengenharia (Luna et al., 2007).

Pesquisas sobre os efeitos da fumaça na germinação de espécies vegetais (ecologia da fumaça) concentraram-se principalmente nos ecossistemas sul-africanos (Van Staden et al., 2000; Abedi et al., 2018), ecossistemas australianos (Dixon et al., 1995, Lloyd et al., 2000; Morris, 2000), ecossistemas mediterrâneos na Espanha (Tormo et al., 2014; Moreira et al., 2010; Moreira e Pausas, 2016), chaparral californiano (Keeley e Fotheringham, 2000), Ásia ocidental (Çatav et al., 2015, Naghipour et al., 2016, Zaki e Abedi, 2017, Zaki et al., 2018) e ecossistemas livres de fogo (Ferraz et al., 2013; Bargmann et al., 2014). Porém, informações sobre espécies de outras regiões, especialmente do Cerrado brasileiro, são raras.

As respostas ao choque térmico e à fumaça foram abordadas apenas recentemente no Cerrado, com uma falta total de resposta a estímulos de fogo, mas uma tolerância consistente ao calor entre espécies (Le Stradic et al., 2015; Fichino et al., 2016; Ramos et al., 2016). Apenas algumas espécies de plantas selecionadas foram recentemente estudadas com relação à sua resposta germinativa à fumaça no cerrado *strictu sensu* (Zirondi et al., 2019). No entanto, até onde sabemos nenhuma germinação pós fogo de espécies nesta região foi examinada a nível fisiológico.

Em relação ao uso do extrato pirolenhoso, as experiências brasileiras são direcionadas principalmente para o enriquecimento da adubação de espécies agrícolas, tais como alface (Mascarenhas et al., 2006a; Roel et al., 2007), quiabo (Mascarenhas et al., 2006b), couve-de-folha (Shingo e Ventura, 2009), ou frutíferas como o limoeiro ‘cravo’ (Zanetti et al., 2004). Estudos com espécies florestais, relataram redução no desenvolvimento de clones de eucalipto utilizando 1% de EP na adubação (Souza-Silva et al., 2006), e aumento no crescimento radicular e foliar de mudas de pinus, quando regadas com EP obtido com controle de temperatura de carbonização entre 80 a 120 °C (Porto et al., 2007). E não foi constatada alteração no desenvolvimento de plântulas de palmeira fênix quando regadas com EP isoladamente (Wanderley et al., 2012). No entanto, ainda não há experiências com germinação de sementes florestais, sendo essa, uma lacuna a ser preenchida com estudos futuros.

6. Considerações Finais

A germinação pós fogo estimulada pela fumaça ainda é uma incógnita. Estudos mostraram sua eficiência no estímulo germinativo e crescimento de plântulas. No entanto, quando a fumaça é condensada de formas diferentes, sua aplicação pode desencadear mecanismos distintos que podem reduzir a germinação e crescimento de muitas espécies. Então,

o que acontece nesses casos? Quais respostas bioquímicas e fisiológicas estão envolvidas durante esses processos? Por que a diluição da fumaça e as diferentes temperaturas no qual ela é constituída influenciam no desenvolvimento de espécies vegetais? Essas e outras perguntas continuam sem respostas e, espera-se que essa breve revisão sobre o tema incentive novas pesquisas no campo da germinação de sementes.

7. Referências Bibliográficas

- ABEDI, M. et al. Germination patterns of the scrublands in response to smoke: The role of functional groups and the effect of smoke treatment method. **South African Journal of Botany**, v. 115, p. 231-236, 2018.
- ALVES, M. et al. Ação de diferentes preparações de extrato pirolenhoso sobre *Brevipalpus phoenicis* (GEIJSKES). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 2, p. 382-385, 2007.
- ALVES M. Impactos da utilização de fino de carvão e extrato pirolenhoso na agricultura. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal. 52p, 2006.
- ARRUDA, Y. M. B. et al. Sources and concentrations of smoke-water on the seed germination and seedling vigor of tomato. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 293-299, 2012.
- BARGMANN, T. et al. Life after fire: smoke and ash as germination cues in ericads, herbs and graminoids of northern heathlands. **Applied vegetation science**, v. 17, n. 4, p. 670-679, 2014.
- BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination**. Elsevier Science, 2014.
- BAXTER, B. et al. Plant-derived smoke and smoke extracts stimulate seed germination of the fire-climax grass *Themeda triandra*. **Environmental**, 1994.
- BHALLA, P. R. et al. Effect of water-soluble tobacco smoke extracts from filter and non-filter cigarettes on seed germination of onion and tomato. **Environmental Pollution**, v. 5, n. 3, 231-236, 1973.
- BOND, W. J. et al. Why and how do ecosystems burn?. In **Fire and plants** p. 16-33, Springer, Dordrecht, 1996.
- BOND, W.J. et al. The evolutionary ecology of sprouting in woody plants. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, p. 103–S114, 2003.
- BROWN, N. A. C. et al. Patterns in the seed germination response to smoke in plants from the Cape Floristic Region, South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 69, n.4, 514-525, 2003.
- BROWN, N. A. C.; VAN STADEN, J. Smoke as a germination cue: a review. **Plant Growth Regulation**, v. 22, n. 2, p. 115-124, 1997.

- BRADSHAW, S. D. et al. Little evidence for fire-adapted plant traits in Mediterranean climate regions. **Trends in plant science**, v. 16, n. 2, p. 69-76, 2011.
- BSHS-British Society for the History of Science. **Archives of the british chemical industry 1750-1914: a handlist**. Londres, Não paginado. (BSHS. Monograph, 6), 1988.
- CAMPOS, A. D. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. **Embrapa Clima Temperado-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.
- ÇATAV, Ş.S. et al. Effects of aqueous smoke and nitrate treatments on germination of 12 eastern Mediterranean basin plants. **Annales Botanici Fennici**, v. 52, p. 93–100, 2015.
- ÇATAV, S. S. et al. Smoke-enhanced seed germination in Mediterranean Lamiaceae. **Seed Science Research**, v. 24, n. 3, p. 257, 2014.
- ÇATAV, Ş.S. et al. Effect of fire-derived chemicals on germination and seedling growth in Mediterranean plant species. **Basic Applied Ecology**, v. 30, p. 65–75, 2018.
- COCHRANE, M. A.; RYAN, K. C. Fire and fire ecology: Concepts and principles. In **Tropical fire ecology**, p. 25-62, Springer, Berlin, Heidelberg, 2009.
- CHRISTENSEN, N. L.; MULLER, C. H. Effects of fire on factors controlling plant growth in *Adenostoma chaparral*. **Ecological monographs**, v. 45, n. 1, p. 29-55, 1975.
- DAIBES, L. F. et al. Gaps critical for the survival of exposed seeds during Cerrado fires. **Australian Journal of Botany**, v. 66, n. 2, p. 116-123, 2018.
- DAWS, M. I. et al. Butenolide from plant-derived smoke enhances germination and seedling growth of arable weed species. **Plant Growth Regulation**, 51(1), 73-82, 2007
- DE LANGE, J. H.; BOUCHER, C. Autecological studies on *Audouinia capitata* (Bruniaceae). I. Plant-derived smoke as a seed germination cue. **South African Journal of Botany**, 56(6), 700-703, 1990.
- DIXON, K.W. et al. The promotive effect of smoke derived from burnt native vegetation on seed germination of Western Australian plants. **Oecologia** 101, 185–192, 1995.
- DIXON, K. W. et al. Karrikinolide—a phytoactive compound derived from smoke with applications in horticulture, ecological restoration and agriculture. **Acta Horticulturae**, 813, 155-170, 2009.
- DOWNES, K. S. et al. The fire ephemeral *Tersonia cyathiflora* (Gyrostemonaceae) germinates in response to smoke but not the butenolide 3-methyl-2 H-furo [2, 3-c] pyran-2-one. **Annals of Botany**, 106(2), 381-384, 2010.
- DOWNES, K. S. et al. Do fire-related cues, including smoke-water, karrikinolide, glyceronitrile and nitrate, stimulate the germination of 17 Anigozanthos taxa and *Blancoa canescens* (Haemodoraceae)?. **Australian Journal of Botany**, 62(4), 347-358, 2014.
- FAO Forestry Department. **Recovery of byproducts from hardwood carbonization**. (FAO FORESTRY. Paper, 41), Rome, 1987.

- FLEMATTI, G. R. et al. Preparation of 2 H-furo [2, 3-c] pyran-2-one derivatives and evaluation of their germination-promoting activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55(6), 2189-2194, 2007.
- FLEMATTI, G. R. et al. Burning vegetation produces cyanohydrins that liberate cyanide and stimulate seed germination. **Nature Communications**, 2(1), 1-6, 2011.
- FLEMATTI, G. R. et al. Identification of alkyl substituted 2H-furo[2,3-c]pyran-2-ones as germination stimulants present in smoke. **J. Agric. Food Chem.** 57, 9475–9480, 2009.
- FLEMATTI, G. R. et al. A compound from smoke that promotes seed germination. **Science**, 305(5686), 977-977, 2004.
- GRANT, C. D. et al. Fuel characteristics, vegetation structure and fire behaviour of 11–15 year-old rehabilitated bauxite mines in Western Australia. **Australian Forestry**, 60(3), 147-157, 1997.
- GHEBREHIWOT, H. M. et al. Smoke-Water and a Smoke-Isolated Butenolide Improve Germination and Seedling Vigour of *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter under High Temperature and Low Osmotic Potential. **Journal of Agronomy and Crop Science**, 194(4), 270-277, 2008.
- FERRAZ, I. D. K. et al. Smoke-water effect on the germination of Amazonian tree species. *South African Journal of Botany*, 87, 122-128, 2013.
- FICHINO, Betânia Santos et al. Does fire trigger seed germination in the Neotropical Savannas? Experimental tests with six Cerrado species. **Biotropica**, v. 48, n. 2, p. 181-187, 2016.
- FIGUEROA, J. A. et al. Do heat and smoke increase emergence of exotic and native plants in the matorral of central Chile?. **Acta Oecologica**, 35(2), 335-340, 2009.
- GÓMEZ-GONZÁLEZ, S. et al. Does plant-derived smoke affect seed germination in dominant woody species of the Mediterranean matorral of central Chile?. **Forest Ecology and Management**, 255(5-6), 1510-1515, 2008.
- GUERREIRO, J. C. G. et al. Efeito da incorporação de extrato pirolenhoso em substrato no desenvolvimento inicial de mudas de tomate. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 8, n. 1, 2012.
- JAIN, N.; VAN STADEN, J. The potential of the smoke-derived compound 3-methyl-2H-furo [2, 3-c] pyran-2-one as a priming agent for tomato seeds. **Seed Science Research**, 17(3), 175, 2007.
- JONES, C. S.; SCHLESINGER, W. H. *Emmenanthe penduliflora* (Hydrophyllaceae): further consideration of germination response. **Madrono**, 122-125, 1980.
- JEFFERY, D. J. et al. Effects of dry heat on seed germination in selected indigenous and alien legume species in South Africa. **South African Journal of Botany**, 54(1), 28-34, 1988.
- KALOGRIDIS, A. C. et al. Smoke aerosol chemistry and aging of Siberian biomass burning emissions in a large aerosol chamber. **Atmospheric Environment**, 185, 15-28. 2018.

- KEELEY, J. E.; NITZBERG, M. E. Role of charred wood in the germination of the chaparral herbs *Emmenanthe penduliflora* (Hydrophyllaceae) and *Eriophyllum confertiflorum* (Asteraceae). **Madroño**, 208-218. 1984.
- KEELEY, J. E. et al. Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. **Trends in plant science**, 16(8), 406-411. 2011.
- KEELEY, J. E.; FOTHERINGHAM, C. J. Role of fire in regeneration from seed. **Seeds: the ecology of regeneration in plant communities**, 2, 311-330. 2000.
- KEELEY, J. E.; PAUSAS, J. G. Evolution of 'smoke' induced seed germination in pyroendemic plants. **South African Journal of Botany**, 115, 251-255. 2018.
- KULKARNI, M. G. et al. Germination and post-germination response of Acacia seeds to smoke-water and butenolide, a smoke-derived compound. **Journal of Arid Environments**, 69(1), 177-187. 2007.
- LAMONT, Byron B.; HE, Tianhua. Fire-adapted Gondwanan angiosperm floras evolved in the Cretaceous. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2012.
- LE STRADIC, S., F. A. O. et al. Diversity of germination strategies and seed dormancy in herbaceous species of Campo Rupestre grasslands. **Austral Ecol.** 40: 537–546. 2015.
- LIGHT, M. E. et al. Smoke-derived butenolide: towards understanding its biological effects. **South African Journal of Botany**, 75(1), 1-7. 2009.
- LIGHT, M. E. et al. Dual regulation of seed germination by smoke solutions. **Plant Growth Regulation**, 37(2), 135-141. 2002.
- LUNA, B. et al. Heat-shock and seed germination of a group of Mediterranean plant species growing in a burned area: an approach based on plant functional types. **Environmental and Experimental Botany**, 60(3), 324-333. 2007.
- LLOYD, M.V. et al. Comparative effects of different smoke treatments on germination of Australian native plants. **Austral Ecology** 25, 610–615. 2000.
- MAEKAWA, K. Curso sobre produção de carvão, extrato pirolenhoso e seu uso na agricultura. Botucatu: **APAN**, 2002.
- MASCARENHAS, M. H. T. et al. Efeito da utilização do extrato pirolenhoso na produtividade do alface. **Revista Brasileira de Horticultura**, Goiânia, v. 24, n. 1, p. 3122-3125, 2006a.
- MASCARENHAS M. H. T. et al. Efeito da utilização do extrato pirolenhoso na produtividade do quiabeiro. **Revista Brasileira de Horticultura**, 24:3126-3128. 2006b.
- MERRITT, D. J., S. R. et al. Seed dormancy and germination stimulation syndromes for Australian temperate species. **Australian Journal of Botany**, v. 55, p. 336–344, 2007.
- MINORSKY, P. V. The hot and the classic. **Plant Physiology**, 130(2), 517. 2002.
- MORRIS, E. C. Germination response of seven east Australian *Grevillea* species (Proteaceae) to smoke, heat exposure and scarification. **Australian Journal of Botany** 48, 179–189. 2000.

- MOTT, J. J.; MCKEON, G. M. Effect of heat treatments in breaking hardseededness in four species of *Stylosanthes*. **Seed Science and Technology**, 7(1), 15-25. 1979).
- MOREIRA, B., PAUSAS, J.G., Shedding light through the smoke on the germination of Mediterranean Basin flora. **South African Journal of Botany**, 2016.
- MOREIRA, B. et al. Disentangling the role of heat and smoke as germination cues in Mediterranean Basin flora. **Annals of Botany** 105,627–635. 2010.
- MOJZES, A.; KALAPOUS, T. Plant-derived smoke stimulates germination of four herbaceous species common in temperate regions of Europe. **Plant ecology**, 215(4), 411-415. 2014.
- MIYASAKA S, et al. Ácido Pirolenhoso: uso e fabricação. Botucatu. **Boletim AgroEcológico**, 14, 1999.
- NAGHIPOUR, A.A. et al. Effects of smoke, ash and heat shock on seed germination of seven species from Central Zagros rangelands in the semi-arid region of Iran. **African Journal of Range and Forage Science** 33, 67–71. 2016.
- NUNES, T. S. Extrato Pirolenhoso na alimentação de cordornas japonesas em postura. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Espírito Santo. 63p, 2019.
- PAUSAS, J.G et al. Plant functional traits in relation to fire in crown-fire ecosystems. **Ecology** 85, 1085–1100. 2004.
- PORTO, P. R. et al. Efeito da aplicação do extrato pirolenhoso na germinação e no desenvolvimento de mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. **IF-Série Registros**, v. 31, p. 15-19, 2007.
- RAMOS, D. M. et al. Seed tolerance to heating is better predicted by seed dormancy than by habitat type in neotropical savanna grasses. **International Journal of Wildland Fire** 25: 1273–1280. 2016.
- RAMOS, D. M. et al. Fire cues trigger germination and stimulate seedling growth of grass species from Brazilian savannas. **American Journal of Botany**, v. 106, n. 9, p. 1190-1201, 2019.
- RAWSON, T. et al. Fire-related cues and germination from the soil seed bank of senescent remnants of mallee vegetation on Eastern Kangaroo Island. **Austral Ecology**, 38(2), 139-151. 2013.
- READ, T.R., BELLAIRS, S.M. Smoke affects the germination of native grasses of New South Wales. **Australian Journal of Botany** 47, 563–576. 1999.
- ROEL A. R. et al. Avaliação de fertilizantes orgânicos na produção de alface em Campo Grande, MS. **Scientia Agraria**, 8:325-329. 2007.
- ROKICH, D.P.; DIXON, K.W. Recent advances in restoration ecology, with a focus on the Banksia woodland and the smoke germination tool. **Australian Journal of Botany**, v. 55, p. 375–389, 2007.

- ROKICH, Deanna P. et al. Smoke, mulch, and seed broadcasting effects on woodland restoration in Western Australia. **Restoration Ecology**, v. 10, n. 2, p. 185-194, 2002
- ROKICH, D. P. et al. Smoke, mulch, and seed broadcasting effects on woodland restoration in Western Australia. **Restoration Ecology**, 10(2), 185-194. 2002.
- SHINGO, G.Y.; VENTURA, M.U. Produção de couve *Brassica oleracea* L. var. acephala com adubação mineral e orgânica. **Semina: Ciências Agrárias**, 30:589-594. 2009.
- STIRK, W. A. et al. Effect of smoke-derived extracts on *Spirodela polyrhiza*, an aquatic plant grown in nutrient-rich and-depleted conditions. **Aquatic Botany**, 129, 31-34. 2016.
- SPARG, S. G. et al. Aerosol smoke and smoke-water stimulation of seedling vigor of a commercial maize cultivar. **Crop Science**, 46(3), 1336-1340. 2006.
- SWEENEY, J. R. **Responses of vegetation to fire: a study of the herbaceous vegetation following chaparral fires**. University of California Press. 1956.
- SCHNITZER, J. A. et al. Doses de extrato pirolenhoso no cultivo de orquídea. **Revista Ceres**, v. 62, n. 1, p. 101-106, 2015.
- SOUZA-SILVA, A. et al. Qualidade de mudas de eucalipto tratadas com extrato pirolenhoso. **Cerne**, v. 12, n. 1, p. 19-26, 2006.
- TORMO, J. et al. Field evidence of smoke-stimulated seedling emergence and establishment in Mediterranean Basin flora. **Journal of vegetation science**, 25(3), 771-777. 2014.
- TRABAUD, L.; OUSTRIC, J. Heat requirements for seed germination of three *Cistus* species in the garrigue of southern France. **Flora**, 183(3-4), 321-325. 1989a.
- TRABAUD, L., OUSTRIC, J. Comparaison des stratégies de régénération après incendie chez deux espèces de ciste. **Revue d'écologie**.1989b.
- VAN STADEN, J. et al. Post-germination effects of the smoke-derived compound 3-methyl-2H-furo [2, 3-c] pyran-2-one, and its potential as a preconditioning agent. **Field Crops Research**, 98(2-3), 98-105. 2006.
- VAN STADEN J et al. The promotion of tomato and okra seedling growth by foliar applications of smoke-water and a smoke-isolated butenolide. **South African Journal of Botany** 73:318. 2007.
- VAN STADEN J. et al. Smoke as a germination cue. **Plant Species Biology** 15: 167–178, 2000.
- VAN STADEN J. et al. **Isolation of the major germination cue from plant-derived smoke**. 2004.
- WANDERLEY C. S. et al. Chemical fertilization, organic fertilization and pyroligneous extract in the development of seedlings of areca bamboo palm (*Dyopsis lutescens*). **Acta Scientiarum Agronomy**, 34:163-167. 2012.
- WICKLOW, D. T. Germination response in *Emmenanthe penduliflora* (Hydrophyllaceae). **Ecology**, 58(1), 201-205, 1977.

- YANG, H. et al. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, p. 1781–1788, 2007.
- ZACHARIAS, P. J. K. et al. The effect of fire on germination in five common veld grasses. **Journal of the Grassland Society of southern Africa**, 5(4), 229-230. 1988.
- ZANETTI M. et al. Influência do extrato pirolenhoso na calda de pulverização sobre o teor foliar de nutrientes em Limoeiro ‘Cravo’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 26:529-533. 2004.
- ZAKI, E. et al. Seed germination responses of different functional groups to aerosol and smoke water treatments. **Journal of Plant Researches** v. 30, n. 4, p. 803-814, 2018.
- ZAKI, E., ABEDI, M. Germination study of Three perennial grasses *Stipa caucasica*, *Festuca valensica* and *Poa densa* to smoke and heat. **Journal of Rangeland** 10, 474–482, 2017
- ZEFERINO, I. et al. Uso do extrato pirolenhoso como adjuvante de herbicida. **Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2018.
- ZIRONDI, H. L. et al. Fire effects on seed germination: heat shock and smoke on permeable vs impermeable seed coats. **Flora** 253: 98–106. 2019.
- ZHANG, Y. et al. Changes in wood smoke volatile composition by anipulating the smoke generation conditions. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, p. 104769, 2020.

Germinação de *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby em resposta ao calor e a fumaça: o papel dos gatilhos de incêndio e o efeito do método de tratamento da fumaça

Resumo

O fogo pode desencadear a germinação de várias espécies florestais, uma vez que o calor e a fumaça podem quebrar a dormência de sementes enterradas no solo. Apesar desse processo ser amplamente documentado em regiões da Oceania, Ásia e Mediterrâneo, a contribuição do fogo para a germinação de espécies de zonas neotropicais ainda é pouco compreendida. Neste estudo, aplicamos calor, fumaça e ácido pirolenhoso (PA) em sementes dormentes de *Senna macranthera* (Fabaceae), uma árvore nativa do Cerrado brasileiro, visando avaliar o efeito dos gatilhos de incêndio florestal em sua germinação. Utilizamos sementes dormentes embebidas em água destilada, sem aplicação do fogo e fumaça, como tratamento controle. O teste durou uma semana e a protrusão da raiz foi utilizada como critério germinativo. Após esse período foi realizado um teste de viabilidade nas sementes não germinadas. A germinação do controle após sete dias foi de 0%, porém o teste de viabilidade atestou que estavam vivas (intumescimento do tegumento e cotilédones de coloração verde). Houve efeito positivo do fogo na germinação de sementes incendiadas enterradas a 5cm de profundidade embebidas em PA (14.0%), seguida das sementes incendiadas enterradas no horizonte de 2cm (11.2%) e das que não foram embebidas em PA (10.0%). Sementes defumadas apresentaram intumescimento do tegumento pelo teste de viabilidade, porém estavam mortas, indicando que houve efeito negativo (0%) da fumaça gasosa na germinação. Concluímos que o efeito promocional do calor e da fumaça líquida (utilizando PA) na quebra de dormência e na germinação de sementes de *S. macranthera* sugere que essa espécie é adaptada ao fogo. No entanto, a fumaça gasosa foi letal, revelando que essa espécie apresenta respostas diferentes a depender do tipo de gatilho (calor ou fumaça) e das condições do incêndio.

Abstract

Fire can trigger the germination of several forest species, as heat and smoke can break the dormancy of seeds buried in the ground. In this study, we applied heat, smoke and pyroligneous acid (PA) to dormant seeds of *Senna macranthera* (Fabaceae), a Brazilian Cerrado native tree, in order to evaluate the effect of forest fire triggers on its germination. We used dormant seeds soaked in distilled water, without the application of fire and smoke, as a control treatment. The test lasted seven days and root protrusion was used as a germination criterion. After this period, a viability test based on the longitudinal section was performed on the non-germinated seeds. The control germination after seven days was 0%, but the viability test confirmed that they were alive (integument swelling and green color cotyledons). There was a positive effect of fire on the germination of burnt seeds buried at a depth of 5 cm soaked in PA (14.0%), followed by burnt seeds buried at a horizon of 2 cm (11.2%) and those that were not soaked in PA (10.0%). Smoked seeds showed swelling of the tegument by the viability test, but they were dead, indicating that there was a negative effect (0%) of the gaseous smoke on germination. We conclude that the strong promotional effect of heat and liquid smoke (using PA) on dormancy

breaking and seed germination of *S. macranthera* suggests that this species is fire-adapted. However, the gaseous smoke was lethal, revealing that this species has different responses depending on the type of trigger (heat or smoke) and fire conditions.

1. Introdução

Considerado um “hotspot” da biodiversidade, o Cerrado abriga uma grande diversidade de espécies endêmicas, e apesar de ser um dos biomas mais ricos do Brasil é também um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo (Myers et al., 2000; Silva et al., 2006). A influência do fogo sobre a fitofisionomia do Cerrado é complexa e as respostas ao calor e à fumaça na germinação de sementes foram abordadas apenas recentemente, sem resposta aos estímulos de fogo, porém com tolerância consistente ao calor entre espécies (Lamont et al., 2019; Ramos et al., 2019; Dairel and Fidelis, 2020). Embora as sementes de algumas espécies deste habitat suportem temperaturas superiores a 100 °C sem afetar a germinação, o tempo de exposição a essas temperaturas por mais que cinco minutos já compromete sua sobrevivência (Ramos et al., 2019). As novas clareiras causadas pelos incêndios no Cerrado geralmente proporcionam mudanças no microclima, com aumento das flutuações diárias de temperatura pós-fogo (Fidelis e Blanco, 2014; Daibes et al., 2018), o que também pode levar à quebra de dormência em algumas espécies (Santana et al., 2013; Daibes et al., 2017) e mudanças da fitossociologia (Daibes et al., 2018).

O fogo apresenta um importante papel como agente de perturbação e tem função na organização do ecossistema, afetando processos vitais como floração, frutificação e germinação de sementes (Bradshaw et al., 2011; Keeley et al., 2011; Daibes et al., 2018). Espécies que apresentam comportamento germinativo estimulado pelo fogo podem ter este processo desencadeado por diferentes mecanismos, sendo o calor e a fumaça os principais propulsores (Keeley e Fotheringham, 2000; Van Staden et al., 2000). O efeito do calor tem sido evidenciado nos danos ao tegumento impermeável das sementes, permitindo a entrada de água e desencadeando a germinação (Baskin and Baskin, 2014). Além disso, as espécies que são adaptadas a altas temperaturas são capazes de sobreviver ao calor dos incêndios, principalmente porque persistem mantendo um banco de sementes no solo (Overbeck et al., 2006; Ribeiro e Borghetti, 2014; Fichino et al., 2016; Ramos et al., 2016). Por outro lado, a fumaça é rica em compostos químicos (por exemplo, cianoidrinas e karrikins), substâncias conhecidas por estimular a germinação em sementes de espécies de uma ampla gama de famílias de plantas de

ecossistemas propensos ou não ao fogo (Ghebrehiwot et al., 2008; Nelson et al., 2012; Downes et al., 2014; Keeley e Pausas, 2018).

As dormências física e fisiológica são o tipo mais comum em espécies de ecossistemas pluviométricos sazonais, que inclui muitos ambientes propensos a incêndios (Baskin e Baskin, 2014), e são fortemente influenciadas por sinais ambientais como temperatura, umidade e radiação solar (Willis et al., 2014; Collette e Ooi, 2017). Entretanto, em regiões tropicais úmidas quando o calor dos incêndios quebra a dormência das sementes há diminuição do seu vigor (Soares et al., 2021). O que explica principalmente, o efeito da fumaça, e não do calor, na regeneração do banco de sementes do solo incendiado ou não (Rokich et al., 2002; Abedi et al., 2018), e na quebra de dormência das sementes desse banco (Merrit et al., 2007; Ramos et al., 2019). Tratamentos à base de fumaça líquida são baseados no princípio da condensação da fumaça dos incêndios com a umidade da atmosfera. Esses tratamentos podem derivar de diferentes fontes vegetais e metodologias de preparo (Campos, 2007) e podem fornecer sinais ecológicos e fisiológicos das espécies para responder a diferentes estímulos.

O ácido pirolenhoso (PA), ou extrato pirolenhoso ou extrato aquoso da fumaça, tem sido testado em uma ampla gama de espécies de ambientes propensos (Keeley and Fotheringham, 2000; Crosti et al., 2006; Brown et al., 2003) ou não (Ferraz et al., 2013) ao fogo. Estudos com espécies florestais relataram redução no desenvolvimento de clones de eucalipto (Souza-Silva et al., 2006), e aumento no crescimento radicular e foliar de mudas de pinus (Porto et al., 2007). Não foi constatada alteração no desenvolvimento de plântulas de palmeira fênix quando regadas com PA isoladamente (Wanderley et al., 2012). No entanto, ainda há uma lacuna em relação a pesquisas do uso do PA na germinação de sementes florestais e os estudos existentes evidenciam que há diferentes respostas das espécies submetidas ao extrato, o que reforça a necessidade de mais estudos nesta área.

Senna macranthera (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby é uma espécie arbórea da família Fabaceae, nativa do Cerrado, com uso potencial na arborização urbana e em projetos de recuperação de áreas degradadas, por ser espécie pioneira, de rápido crescimento e indicadora de biodiversidade (Lorenzi, 2021). No entanto, possuem sementes pequenas e cerosas o que lhe confere uma dormência física causada pela impermeabilidade do tegumento (Carvalho e Nakagawa, 2000) e ainda não se sabe qual gatilho de incêndio pode promover sua germinação. Esta dormência pode ser rompida por escarificação química ou desponte em posição oposta ao hilo (Brasil, 2013). Uma vez superada esta dormência, as sementes germinam em até sete dias com alta porcentagem de germinação (Ferreira et al., 2004). A rápida germinação é vantajosa

uma vez que permite a colonização da área em menor tempo e aumenta as vantagens na competição com outras espécies (De Luis et al., 2008; Sparg et al., 2005). Sendo assim, espécies cuja germinação seja estimulada pelo fogo (calor danificando o tegumento ou efeitos químicos da fumaça) possuirão vantagem sobre as demais no estabelecimento no ambiente após a ocorrência de um incêndio.

Diante disso, esse estudo analisou a germinação, a dormência e a viabilidade de sementes de *Senna macranthera* em relação ao fogo, a fumaça e ao ácido pirolenhoso (fumaça líquida). Tentamos responder as seguintes perguntas: (i) Há superação da dormência das sementes desta espécie por calor e fumaça?; (ii) os efeitos do calor sobre a germinação de sementes são mais pronunciados do que os da fumaça? e (iii) pode o método de tratamento da fumaça influenciar as respostas de germinação?

2. Material e métodos

2.1 Procedência das sementes

As sementes de *Senna macranthera* foram coletadas de duas árvores matrizes no Campus da Universidade Federal de Viçosa - UFV (20°45'14" S 42°52'54" W) em 2019 pela Sociedade de Investigação Florestal - SIF e doadas ao Departamento de Engenharia Florestal da UFV. Foi coletado um total de três quilos de sementes (cada quilo contendo entre 20 e 28 mil sementes, de acordo com Brasil, 2013) que permaneceram armazenadas em sacos de plástico em câmara fria a 5 °C no Laboratório de Análise de Sementes Florestais da UFV por um ano até o início das análises. O teor de água inicial e a viabilidade do lote foram determinados de acordo com as Regras para Análise de Sementes Florestais do Brasil - RAS (Brasil, 2009). O desponte lateral foi adotado para a quebra de dormência em teste preliminar realizado com 400 sementes em placa de Petri com duas camadas de papel, visando a obtenção da porcentagem de germinação do lote.

2.2 Simulação de incêndio e germinação das sementes

Sementes dormentes foram dispostas em caixa de areia nas profundidades de dois e cinco centímetros (Tabela 1). Galhos e folhas secas de palmeiras foram utilizados como

material combustível e o fogo foi aplicado com duração de 10 minutos com temperatura do inicial de 22.8 °C. As temperaturas durante o experimento foram aferidas com auxílio do termopar digital Minipa MT-600. Para a defumação, as sementes foram dispostas em grades no alto de uma chaminé improvisada em um tambor de ferro. A fumaça gerada no interior deste tambor se deu pela queima de feno e durou dois minutos com a temperatura inicial de 19 °C.

O teste de embebição em fumaça líquida se deu pela utilização de ácido pirolenhoso (PA) de eucalipto. Foi realizado um ensaio preliminar com este PA, o qual foi produzido pela combustão da madeira de eucalipto em mufla sob quatro temperaturas (100, 200, 300 e 400 °C). O extrato coletado da fumaça gerada em cada temperatura foi diluído em seis proporções (1:10; 1:25; 1:50, 1:75; 1:100 e 1:1000). O PA produzido a partir da combustão da madeira a 200 °C e diluído em água destilada na proporção de 1 ml de PA para 75 ml de água destilada (1:75) foi o que desencadeou maior velocidade de germinação (4.9 Germination Speed Index – GSI) e maior porcentagem de germinação (85.0%) das sementes de *S. macranthera* (Apêndice A), e portanto escolhido para este experimento.

Após a aplicação do fogo ou fumaça nas sementes dormentes, essas foram desinfestadas com Captan ® (1%), por 2 minutos. O teste de germinação ocorreu em câmara de germinação do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) com temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro. A faixa de temperatura para a germinação da *S. macranthera* está entre 9 e 39 °C (Cassaro-Silva, 2001). Cinco repetições de 20 sementes foram dispostas em placas de Petri sobre duas camadas de papel filtro específico para análise de germinação, previamente desinfestados por 12h em estufa a 40 °C. A avaliação durou sete dias e a protrusão da raiz primária foi utilizada como critério germinativo. As sementes foram embebidas em ácido pirolenhoso por 24 horas (conforme o tratamento, ver Tabela 1) e após esse período foram reumedecidas com água destilada, quando necessário. Após o período de sete dias, foi realizado um corte longitudinal nas sementes não germinadas e feito o teste de viabilidade. Esse teste consistiu em verificar se a coloração verde dos cotilédones, que indicava vida, estava presente. Também foi feita a observação visual do aumento do tamanho das sementes, evidenciando seu intumescimento (Noronha et al., 2019). A análise de sementes mortas foi feita de acordo com Brasil (2009), assim consideradas aquelas que no final do teste não germinaram, geralmente apresentando-se amolecidas, atacadas por microrganismos e sem sinal de início de germinação, excluindo as sementes duras e dormentes.

2.3 Análise dos dados

Delineamento Inteiramente Casualizado - DIC foi aplicado para cada teste de germinação, conforme os tratamentos avaliados (Tabela 1). Para cada tratamento utilizou-se cinco repetições de 20 sementes cada ($n_i=100$). A Análise de Variância - ANOVA foi aplicada para comparar as médias de germinação e índice de velocidade de germinação das sementes, calculado de acordo com Maguire (1962). O teste de Tukey ($p<0,001$) foi utilizado para registrar a diferença entre as médias utilizando o programa SISVAR 5.6 (Ferreira, 2019). A comparação de sementes germinadas, vivas não germinadas e mortas foi avaliada através da porcentagem de germinação.

Tabela 1: Identificação dos tratamentos testados em sementes de *Senna macranthera*

Tratamentos

- 1: Controle - sem aplicação do fogo ou da fumaça, utilizando sementes dormentes embebidas apenas em água destilada
 - 2: Fogo em sementes enterradas a 2 cm, posteriormente embebidas em água destilada
 - 3: Fogo em sementes enterradas a 5 cm, posteriormente embebidas em água destilada
 - 4: Fogo em sementes enterradas a 5 cm, posteriormente embebidas em PA
 - 5: Fumaça nas sementes, posteriormente embebidas em água destilada
-

3. Resultados

O lote de sementes utilizado nesse estudo apresentou teor de água inicial de 10.9% e a viabilidade testada com desponete na quebra de dormência ao final de sete dias foi de 96.2%. O efeito do fogo na quebra de dormência das sementes de *Senna macranthera* foi evidenciado pela diferença na germinação das sementes do grupo controle (0%), em relação aos demais tratamentos com fogo e fogo + ácido pirolenhoso (PA) (Figura 1 A). As temperaturas alcançadas nestes tratamentos variaram de 63 a 90 °C durante 10 minutos. E sob essas condições as sementes incendiadas enterradas a 5 cm de profundidade, posteriormente embebidas em PA

tiveram maior germinação (14.0%), seguida das enterradas a 2 cm (11.2%) e das incendiadas enterradas a 5 cm sem embebição com PA (10.0%). Todos os tratamentos com fogo e fogo + PA desencadearam também as maiores velocidades de germinação (IVG) em comparação com o controle e a fumaça (Figura 1B).

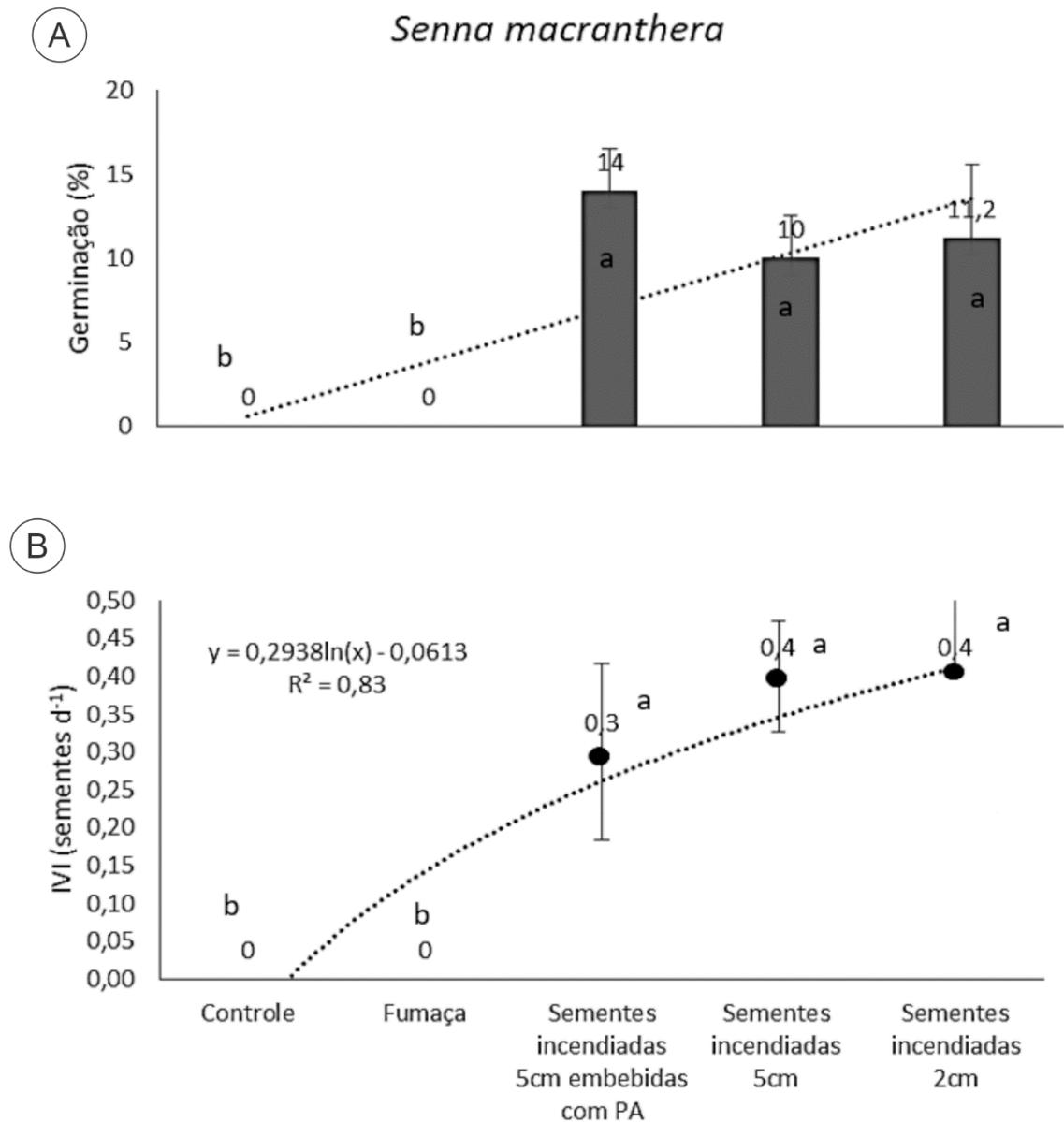


Figura 1. Germinação (A) e Índice de velocidade de germinação – IVI (B), de sementes de *Senna macranthera* submetidas a incêndio simulado por 10 e 2 minutos (fogo e fumaça, respectivamente). Letras iguais identificam que não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p < 0,001$).

Sementes defumadas a uma temperatura máxima de 64.3 °C (± 2 °C) apresentaram aumento de tamanho com o intumescimento do tegumento, porém, não houve efeito (0%) da defumação na germinação (Figura 1 A). Essa mesma temperatura (63.5 ± 2 °C) não impediu a germinação (10 – 14%) de sementes incendiadas enterradas a 5cm.

As sementes não germinadas até a contagem final do teste de germinação estavam todas intumescidas, com aumento visível no seu tamanho, sendo classificadas como vivas não germinadas e mortas pelo teste de viabilidade. As sementes vivas não germinadas apresentavam os cotilédones visivelmente verde, aparentando vivas, enquanto que as mortas apresentavam os cotilédones marrom/preto (Figura 2). Embora houvesse embebição das sementes incendiadas (tratadas com fogo ou fumaça), evidenciadas pelo intumescimento do tegumento, a quantidade de sementes germinadas ou vivas não germinadas foi muito pequena em comparação com as sementes mortas (Figura 2).

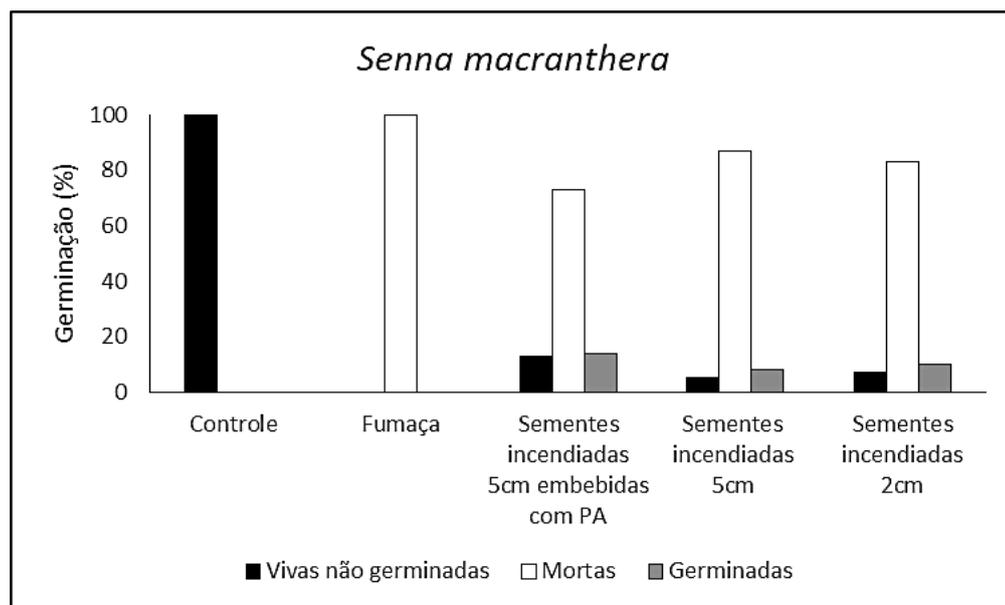


Figura 2. Sementes germinadas, vivas não germinadas e mortas após teste de viabilidade realizado em *Senna macranthera* submetida a simulação de fogo por 10 e 2 minutos (fogo e fumaça, respectivamente).

4. Discussão

A hipótese de que o calor quebraria a dormência das sementes de *Senna macranthera* foi aceita, já que pelo menos 10% das sementes germinaram (Figura 1). Neste estudo observamos também, que a sobrevivência das sementes de *S. macranthera* após o fogo indica que essa espécie suporta altas temperaturas (até 90 °C). Entretanto, o tempo de exposição por até 10 minutos comprometeu sua sobrevivência, assim como previsto por Ramos et al. (2019) para espécies vegetais do bioma Cerrado.

As sementes de *S. macranthera*, quando germinadas a 50 °C durante sete dias, apresentaram sua dormência quebrada pelo calor (De Paula et al., 2012). O calor agiu removendo toda a camada de cera do tegumento, expondo as células com parede da testa lignificada, o que permitiu à semente absorver água, favorecendo a germinação. Nesse sentido, o calor agiu no afrouxamento da barreira física que envolve as sementes, permitindo a entrada de água e posterior germinação (Bewley e Black, 2013). No caso de incêndios florestais, o calor pode atuar como choque térmico, quebrando a dormência das sementes e desencadeando a germinação de espécies pós-fogo enterradas no solo de diversas regiões do mundo, por exemplo regiões temperadas (Keeley e Fotheringham, 2000) e mediterrâneas (Tormo et al., 2014; Moreira et al., 2010; Moreira e Pausas, 2016). Além disso, o calor pode atuar no comportamento adaptativo da espécie, uma vez que sementes que germinam mesmo após exposição a altas temperaturas, ganham vantagem evolutiva em cenários de incêndio (Simon et al. 2009). Nosso estudo mostrou que apesar dos danos causados pela alta temperatura (~ 90 °C), nas sementes enterradas mais próximas a superfície do solo (2 cm), a velocidade de germinação alcançada neste tratamento foi alta (Figura 1B). Indicando que *S. macranthera* possui resiliência germinativa, uma vez que mesmo estando sob estresse, consegue germinar. A resiliência germinativa pode ser interpretada como a capacidade das plantas sobreviverem temporariamente a dificuldades, além de gerarem oportunidades para que se estabeleçam em outro lugar, longe da planta mãe (Kessler and Stuppy, 2006).

A embebição com ácido pirolenhoso (fumaça líquida), aumentou a germinação das sementes de *S. macranthera* após o incêndio em comparação com o controle (Figura 1), corroborando com estudos relacionados a fumaça líquida com espécies nativas da mesma região. O recrutamento de mudas pós fogo em banco de sementes no solo do Cerrado (Campo rupestre), foi testado por Fernandes et al. (2021), que aplicaram choque térmico (80 e 100 °C por 5 min) e fumaça líquida (1:10) em sementes de nove espécies arbustivas nativas da região.

A fumaça líquida aumentou a germinação na maioria das espécies testadas em comparação com o choque térmico. Estes mesmos autores concluíram que implicações ecológicas explicariam o aumento da taxa de germinação pela fumaça exibida pelas espécies de campo rupestre. Podendo permitir o recrutamento de mudas logo após o fogo, durante a estação chuvosa, quando há maior disponibilidade de recursos e a competição é baixa (Alvarado et al., 2017). A fumaça líquida também interagiu com a menor disponibilidade de luz e promoveu a germinação de duas espécies do banco de sementes do solo Cerrado (Ramos et al., 2019). O extrato de fumaça na concentração de 1:10 aumentou a taxa de germinação de *Aristida riparia* e *Aristida recurvata* no escuro, indicando que a fumaça líquida supera a foto inibição dessas espécies, agindo como um sinalizador de que o fogo já ocorreu e que agora as sementes podem germinar (Ramos et al., 2019).

Por outro lado, a exposição das sementes de *S. macranthera* à defumação por dois minutos resultou na morte do embrião (Figura 1). A temperatura máxima alcançada neste tratamento (64.3 ± 2 °C) foi semelhante a observada no tratamento com fogo (63.5 ± 2 °C) que permitiu a germinação de pelo menos 10% das sementes. Indicando que para esta espécie, as respostas ao incêndio podem depender de mais fatores além da temperatura. Entretanto, os resultados com defumação nesse estudo contrastam com o encontrado na literatura. Em uma floresta no norte do Irã, a fumaça em aerossol aumentou em até duas vezes a germinação de leguminosas e gramíneas perenes em comparação com a fumaça líquida (1:1000), indicando que o tipo de fumaça pode alterar os padrões de regeneração em grupos funcionais distintos (Abedi et al., 2018). Pois, enquanto as espécies perenes alocam recursos para estruturas que aumentem sua chance de sobreviver ao próximo incêndio, as anuais acumulam sementes no banco de sementes do solo como forma de garantir a sobrevivência pós-fogo (Bond e Midgley, 2003; Pausas et al., 2004).

Embora fatores abióticos, principalmente luz e temperatura (calor), possam aliviar a dormência das sementes e induzir a germinação (Baskin and Baskin, 2014), e a resiliência favoreça a sobrevivência sob condições adversas (Kessler and Stuppy, 2006), a planta precisa experimentar sinais adequados para se estabelecer. Estes sinais precisam informar que o ambiente é favorável para germinar em grande quantidade, alinhando o ambiente com os requisitos de germinação para cada espécie. Muitas vezes a exposição a uma condição estressante pode ser demasiada, mesmo para uma planta vigorosa. A extensão do dano germinativo depende da espécie, do conteúdo inicial de água da semente, da temperatura, da

duração da exposição ao estresse e do período da germinação durante o qual a exposição ocorreu (Lopes e Franke, 2011)

Neste estudo, a simulação de incêndio por até 10 minutos, testando calor e fumaça permitiu a perda da cerosidade tegumentar das sementes que lhe conferia dormência física, desencadeando a germinação. Porém, os danos visíveis no embrião revelaram que tanto o calor quanto a fumaça reduziram seu vigor (Figura 2). Além disso, a exposição a esses estresses reduziu o conteúdo de água nas sementes em pelo menos 3% (dados não mostrados). Ao iniciarem a germinação nestas condições, as sementes podem sofrer por danos de embebição, caracterizado por perdas irreparáveis ao sistema de membranas, o que leva à lixiviação de conteúdos celulares, afetando negativamente a germinação (Prodanovic et al., 2007). Portanto, mesmo que as sementes de *S. macranthera* tenham acelerado seu processo germinativo após o fogo, é notável que a redução da sua viabilidade preocupa, principalmente em cenários de incêndios florestais recorrentes no Cerrado, habitat dessa espécie (Daibes, et al., 2018).

5. Conclusão

O efeito promocional do calor e da fumaça líquida (utilizando PA) na quebra de dormência e na germinação de sementes de *S. macranthera* sugere que essa espécie é adaptada ao fogo. No entanto, a fumaça gasosa pode ser letal, reduzindo o vigor das sementes. Essa espécie apresenta respostas diferentes a depender do tipo de gatilho (calor ou fumaça) e das condições do incêndio (tempo de exposição e temperatura, por exemplo). Apesar da embebição com ácido pirolenhoso, a possível proteção do embrião ao calor é um estímulo para estudos mais detalhados.

6. Referências bibliográficas

- Abedi, M., Zaki, E., Erfanzadeh, R., Naqinezhad, A. 2018. Germination patterns of the scrublands in response to smoke: The role of functional groups and the effect of smoke treatment method. South African Journal of Botany, 115, 231-236.
- Alvarado, S. T., Fornazari, T., Cóstola, A., Morellato, L. P. C., Silva, T. S. F. 2017. Drivers of fire occurrence in a mountainous Brazilian cerrado savanna: Tracking long-term fire regimes using remote sensing. Ecological Indicators, 78, 270-281.

- Baskin, C.C., Baskin, J.M. 2014. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Second ed. Elsevier/Academic Press, San Diego.
- Bewley, J. D., Black, M. 2013. Seeds: physiology of development and germination. Springer Science & Business Media.
- Bradshaw, S. D., Dixon, K. W., Hopper, S. D., Lambers, H., Turner, S. R. 2011. Little evidence for fire-adapted plant traits in Mediterranean climate regions. *Trends in plant science*, 16(2), 69-76.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Brasília.
- Brasil. 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instruções para análise de sementes de espécies florestais, de 17 de janeiro de 2013, Brasília.
- Bond, W. J., Midgley, J. J. 2003. The evolutionary ecology of sprouting in woody plants. *International Journal of Plant Sciences*, 164(3), 103-114.
- Brown, N. A. C., Van Staden, J., Daws, M. I., Johnson, T. 2003. Patterns in the seed germination response to smoke in plants from the Cape Floristic Region, South Africa. *South African Journal of Botany*, 69(4), 514-525.
- Campos, A. D. 2007. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. Embrapa Clima Temperado-Circular Técnica (INFOTECA-E), Pelotas.
- Carvalho, N. M., Nakagawa, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. FUNEP, Jaboticabal.
- Cassaro-Silva, M. 2001. Efeito da temperatura na germinação de sementes de manduirana (*Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn. - CAESALPINIACEAE). *Revista Brasileira de Sementes*, 23(1), 92-99.
- Collette, J. C., Ooi, M. K. J. 2017. Germination ecology of the endangered species *Asterolasia buxifolia* (Rutaceae): smoke response depends on season and light. *Australian Journal of Botany*, 65(3), 283-291.

- Crosti, R., Ladd, P. G., Dixon, K. W., Piotto, B. 2006. Post-fire germination: the effect of smoke on seeds of selected species from the central Mediterranean basin. *Forest Ecology and Management*, 221(1-3), 306-312.
- Daibes, L. F., Zupo, T., Silveira, F. A., Fidelis, A. 2017. A field perspective on effects of fire and temperature fluctuation on Cerrado legume seeds. *Seed Science Research*, 27(2), 74-83.
- Daibes, L. F., Gorgone-Barbosa, E., Silveira, F. A., Fidelis, A. 2018. Gaps critical for the survival of exposed seeds during Cerrado fires. *Australian Journal of Botany*, 66(2), 116-123.
- Dairel, M., Fidelis, A. 2020. How does fire affect germination of grasses in the Cerrado?. *Seed Science Research*, 30(4), 275-283.
- De Luis, M., Raventós, J., Wiegand, T., Carlos González-Hidalgo, J. 2008. Temporal and spatial differentiation in seedling emergence may promote species coexistence in Mediterranean fire-prone ecosystems. *Ecography*, 31(5), 620-629.
- De Paula, A. S., Delgado, C. M. L., Paulilo, M. T. S., Santos, M. 2012. Breaking physical dormancy of *Cassia leptophylla* and *Senna macranthera* (Fabaceae: Caesalpinioideae) seeds: water absorption and alternating temperatures. *Seed Science Research*, 22(4), 259-267.
- Downes, K. S., Light, M. E., Pošta, M., Kohout, L., van Staden, J. 2014. Do fire-related cues, including smoke-water, karrikinolide, glyceronitrile and nitrate, stimulate the germination of 17 *Anigozanthos* taxa and *Blancoa canescens* (Haemodoraceae)?. *Australian Journal of Botany*, 62(4), 347-358.
- Ferraz, I. D. K., Arruda, Y. M. B. C., Van Staden, J. 2013. Smoke-water effect on the germination of Amazonian tree species. *South African Journal of Botany*, 87, 122-128.
- Fernandes, A. F., Oki, Y., Fernandes, G. W., Moreira, B. 2021. The effect of fire on seed germination of campo rupestre species in the South American Cerrado. *Plant Ecology*, 222(1), 45-55.
- Ferreira, D.F. 2019. SISVAR: A Computer Analysis System to Fixed Effects Split Plot Type Designs. *Revista Brasileira de Biometria*, 37(4), 529-535.

- Ferreira, R. A., Davide, A. C., Motta, M. S. 2004. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. e *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn.; num banco de sementes em solo de viveiro. *Revista Brasileira de Sementes*, 26(1), 24-31.
- Fichino, B. S., Dombroski, J. R., Pivello, V. R., Fidelis, A. 2016. Does fire trigger seed germination in the Neotropical Savannas? Experimental tests with six Cerrado species. *Biotropica*, 48(2), 181-187.
- Fidelis, A., Blanco, C. 2014. Does fire induce flowering in Brazilian subtropical grasslands?. *Applied Vegetation Science*, 17(4), 690-699.
- Ghebrehiwot, H. M., Kulkarni, M. G., Kirkman, K. P., Van Staden, J. 2008. Smoke-Water and a Smoke-Isolated Butenolide Improve Germination and Seedling Vigour of *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter under High Temperature and Low Osmotic Potential. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(4), 270-277.
- Keeley, J. E., Pausas, J. G., Rundel, P. W., Bond, W. J., Bradstock, R. A. 2011. Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. *Trends in plant science*, 16(8), 406-411
- Keeley, J. E., Fotheringham, C. J. 2000. Role of fire in regeneration from seed. *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*, 2, 311-330.
- Keeley, J. E., Pausas, J. G. 2018. Evolution of 'smoke'induced seed germination in pyroendemic plants. *South African Journal of Botany*, 115, 251-255.
- Kessler, R., Stuppy, W. 2006. *Seeds: time capsules of life*. Papadakis Publisher.
- Lamont, Byron B.; HE, Tianhua; YAN, Zhaogui. 2019. Evolutionary history of fire-stimulated resprouting, flowering, seed release and germination. *Biological Reviews*, 94(3), 903-928.
- Lopes, R. R., Franke, L. B. 2011. Aspectos térmico-biológicos da germinação de sementes de cornichão anual sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 2091-2096.
- Lorenzi, H. 2021. *Árvores Brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, Insitituto Plantarum, V. 3, 3ªEd, Nova Odessa.
- Maguire, J. D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2, 176-177.

- Merritt, D. J., Turner, S. R., Clarke, S., Dixon, K. W. 2007. Seed dormancy and germination stimulation syndromes for Australian temperate species. *Australian Journal of Botany*, 55(3), 336-344.
- Moreira, B., Pausas, J. G. 2018. Shedding light through the smoke on the germination of Mediterranean Basin flora. *South African Journal of Botany*, 115, 244-250.
- Moreira, B., Tormo, J., Estrelles, E., Pausas, J. 2010. Disentangling the role of heat and smoke as germination cues in Mediterranean Basin flora. *Annals of botany*, 105(4), 627-635.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Nelson, D. C., Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., Smith, S. M. 2012. Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. *Annual review of plant biology*, 63, 107-130.
- Noronha, B. G. D., Medeiros, A. D. D., Pereira, M. D. 2019. Incremento de área em sementes de moringa durante a embebição por meio da análise de imagens. *Ciência Florestal*, 29, 221-232.
- Overbeck, G. E., Müller, S. C., Pillar, V. D., Pfadenhauer, J. 2006. No heat-stimulated germination found in herbaceous species from burned subtropical grassland. *Plant ecology*, 184(2), 237-243.
- Pausas, J. G., Bradstock, R. A., Keith, D. A., Keeley, J. E. 2004. Plant functional traits in relation to fire in crown-fire ecosystems. *Ecology*, 85(4), 1085-1100.
- Porto, P. R., Sakita, A. E. N., Nakaoka, S. M. 2007. Efeito da aplicação do extrato pirolenhoso na germinação e no desenvolvimento de mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. *IF-Série Registros*, 31, 15-19.
- Prodanović, O., Prodanović, R., Bogdanović, J., Mitrović, A., Niilosavić, N., Radotić, K. 2007. Antioxidative enzymes during germination of two lines of Serbian spruce [*Picea omorika* (panc.) purkyae]. *Archives of Biological sciences*, 59(3), 209-216.

- Ramos, D. M., Liaffa, A. B., Diniz, P., Munhoz, C. B., Ooi, M. K., Borghetti, F., Valls, J. F. 2016. Seed tolerance to heating is better predicted by seed dormancy than by habitat type in Neotropical savanna grasses. *International Journal of Wildland Fire*, 25(12), 1273-1280.
- Ramos, D. M., Valls, J. F., Borghetti, F., Ooi, M. K. 2019. Fire cues trigger germination and stimulate seedling growth of grass species from Brazilian savannas. *American Journal of Botany*, 106(9), 1190-1201.
- Ribeiro, L. C., Borghetti, F. 2014. Comparative effects of desiccation, heat shock and high temperatures on seed germination of savanna and forest tree species. *Austral Ecology*, 39(3), 267-278.
- Rokich, D. P., Dixon, K. W., Sivasithamparam, K., Meney, K. A. 2002. Smoke, mulch, and seed broadcasting effects on woodland restoration in Western Australia. *Restoration Ecology*, 10(2), 185-194.
- Santana, V. M., Baeza, M. J., Blanes, M. C. 2013. Clarifying the role of fire heat and daily temperature fluctuations as germination cues for Mediterranean Basin obligate seeders. *Annals of botany*, 111(1), 127-134.
- Simon, M. F., Grether, R., de Queiroz, L. P., Skema, C., Pennington, R. T., Hughes, C. E. 2009. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20359-20364.
- Silva, J. F., Fariñas, M. R., Felfili, J. M., Klink, C. A. 2006. Spatial heterogeneity, land use and conservation in the cerrado region of Brazil. *Journal of biogeography*, 33(3), 536-548.
- Soares, V. C., Scremin-Dias, E., Daibes, L. F., Damasceno-Junior, G. A., Pott, A., de Lima, L. B. 2021. Fire has little to no effect on the enhancement of germination, but buried seeds may survive in a Neotropical wetland. *Flora*, 278, 151801.
- Souza-Silva, A., Zanetti, R., Carvalho, G. A., Mendonça, L. A. 2006. Qualidade de mudas de eucalipto tratadas com extrato pirolenhoso. *Cerne*, 12(1), 19-26.
- Sparg, S. G., Kulkarni, M. G., Light, M. E., Van Staden, J. 2005. Improving seedling vigour of indigenous medicinal plants with smoke. *Bioresource technology*, 96(12), 1323-1330.

Tormo, J., Moreira, B., Pausas, J. G. 2014. Field evidence of smoke-stimulated seedling emergence and establishment in Mediterranean Basin flora. *Journal of vegetation science*, 25(3), 771-777.

Van Staden, J., Brown, N. A., Jäger, A. K., Johnson, T. A. 2000. Smoke as a germination cue. *Plant Species Biology*, 15(2), 167-178.

Wanderley, C. D. S., Faria, R. T. D., Ventura, M. U. 2012. Chemical fertilization, organic fertilization and pyroligneous extract in the development of seedlings of areca bamboo palm (*Dyopsis lutescens*). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 34(2), 163-167.

Willis, C. G., Baskin, C. C., Baskin, J. M., Auld, J. R., Venable, D. L., Cavender-Bares, J., ... NESCent Germination Working Group. 2014. The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytologist*, 203(1), 300-309.

Composição química de extratos pirolenhosos influencia a germinação de sementes de *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby

Resumo

O extrato pirolenhoso (EP), também conhecido como ácido pirolenhoso e fumaça líquida, é um subproduto obtido a partir da produção do carvão vegetal e pode ser usado como promotor de crescimento para diversas espécies vegetais. Vem sendo usado na agricultura há vários anos baseado na observação da regeneração do ambiente pós-fogo, que os estudos depois confirmaram poder ser estimulada pela fumaça derivada de plantas carbonizadas. Vários compostos presentes na fumaça com atividade promotora de germinação foram identificados nos últimos anos, por exemplo, os butenolídeos *karrikins* e alguns compostos nitrogenados, que são conhecidos por promoverem a germinação de muitas espécies de plantas, quando em baixas concentrações. Neste estudo, foram obtidos três EPs obtidos através da carbonização das madeiras de *Eucalyptus* sp. e de *Anadenanthera macrocarpa* (angico), sendo identificados 54 e 72 compostos respectivamente. Os EPs foram avaliados quanto ao seu potencial para melhorar a germinação de sementes de *Senna macranthera*, uma árvore nativa do Cerrado. Nenhum extrato superou a performance germinativa das sementes do controle (96,2%). Entretanto, o EP de eucalipto foi menos prejudicial às sementes (entre 35 e 97%) do que o EP de angico (entre 26 e 73%), mas isso dependeu da concentração utilizada. Os compostos encontrados em maior quantidade no EP de eucalipto foram as piridonas e aldeídos, e podem ter sido responsáveis pela germinação das sementes embebidas nesse extrato. A germinação das sementes embebidas com um dos extratos de angico, pode ter sido influenciada pelo composto (Tetraidrofurano-2-il) metanol, um derivado do éter, tendo em vista que ele aparece em maior quantidade em apenas um dos EPs. Nenhum dos extratos nas concentrações testadas inibiram totalmente a germinação das sementes, indicando que *S. macranthera* é uma espécie resistente aos efeitos da exposição ao extrato pirolenhoso.

Abstract

Pyroligneous acid (PA), also known as pyroligneous acid and liquid smoke, is a by-product obtained from charcoal production and can be used as a growth promoter for several plant species. It has been used in agriculture for several years based on observation of post-fire environmental regeneration, which studies later confirmed can be stimulated by smoke derived from charred plants. Several compounds present in smoke with germination-promoting activity have been identified in recent years, for example, karrikins butenolides and some nitrogenous compounds are known to promote the germination of many plant species when in low concentrations. In this study, three PAs obtained through the carbonization of *Eucalyptus* sp. and *Anadenanthera macrocarpa* (angelim), being identified 54 and 72 compounds respectively. PAs were evaluated for their potential to improve seed germination of *Senna macranthera*, a tree native to the Cerrado. No extract surpassed the germination performance of the control seeds (96.2%). However, PA from eucalyptus was less harmful to seeds (between 35 and 97%)

than PA from angico (between 26 and 73%), but this depended on the concentration used. The compounds found in greater quantity in eucalyptus PA were pyridones and aldehydes, and may have been responsible for the germination of seeds soaked in this extract. The germination of seeds soaked with one of the angico extracts may have been influenced by the compound (Tetrahydrofuran-2-yl) methanol, an ether derivative, considering that it appears in greater quantity in only one of the PAs. None of the extracts at the tested concentrations totally inhibited seed germination. Indicating that *S. macranthera* is a species resistant to the effects of exposure to the pyroligneous acid.

1. Introdução

O extrato pirolenhoso (EP), também conhecido como pyroligneous acid (PA), vinagre de madeira, extrato aquoso da fumaça ou fumaça líquida, é obtido pela condensação da fumaça formada pela queima da madeira na produção de carvão vegetal (Campos, 2007). O extrato é composto, em sua maior parte, por água e mais de 200 compostos orgânicos, dentre eles ácido acético, álcoois, cetonas, fenóis e alguns derivados de lignina (Yang et al., 2007). Esse produto pode ser obtido de diferentes espécies vegetais, como o bambu, o eucalipto e o pinus (Alves, 2006; Campos, 2007). Quando diluído em água e aplicado ao solo pode melhorar seus atributos físicos e químicos, proporcionando aumento de microrganismos benéficos ao crescimento vegetal, como actinomicetos e micorrizas e pode, portanto, favorecer a disponibilidade de nutrientes para as plantas (Miyasaka et al., 1999). Na agricultura natural, esse extrato tem sido usado como potencializador de herbicida (Zeferino et al., 2018), fertilizante orgânico (Souza-Silva et al., 2006), indutor de enraizamento (Porto et al., 2007), inseticida (Alves et al., 2007) e até na culinária (Zhang et al., 2020). Cada uso depende da diluição ou da proporção da mistura de compostos.

Outra aplicação reportada na literatura é ao uso dos EPs como agentes que estimulam o crescimento de plantas. A observação de que produtos químicos a partir da combustão de biomassa desempenham um papel no estímulo da germinação pós-fogo de espécies vem sendo confirmada em vários estudos em regiões temperadas e ecossistemas africanos (Keeley e Fotheringham, 2000; Moreira e Pausas, 2016; Abedi et al., 2018). Tentativas de estudar o efeito da fumaça líquida, ou EP, nas plantas foram desafiadoras, sobretudo pela complexa mistura de compostos orgânicos presentes nesse tipo de fumaça, alguns dos quais conferem toxicidade em altas concentrações (Light et al., 2002; Daws et al., 2007). O fracionamento da fumaça condensada guiada por bioensaio culminou na descoberta e síntese de vários compostos, que a partir da queima da biomassa que contêm celulose, hemicelulose e lignina conferem

características germinativas em sementes (Keeley e Pausas, 2018). O 3-metil-2*H*-furo[2,3-*c*]piran-2-ona, uma classe denominada "karrikin" da família dos butanolídeos, é altamente estimulante na germinação de espécies de recrutamento (Flematti et al., 2004; Van Staden et al., 2004; Flematti et al., 2009). Assim como os compostos nitrogenados resultantes da combustão de biomassa, também parecem ter um papel na germinação pós fogo de espécies estimuladas por gliceronitrila (cianidrina) (Flematti et al., 2011, Downes et al., 2014). No entanto, não existem registros sobre quais compostos químicos do EP influenciam a germinação pós fogo das espécies vegetais em ecossistemas brasileiros.

Senna macranthera (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby é uma espécie arbórea da família Fabaceae, nativa do Cerrado distribuída pela Mata Atlântica e Pantanal (Lorenzi, 2021). É uma árvore de rápido crescimento, podendo ser utilizada na arborização urbana e compor plantios em áreas degradadas por também ser indicadora de biodiversidade (Campos Filho e Sartorelli, 2015). Essa espécie forma banco de sementes no solo e possui sementes cerosas que lhe conferem uma dormência física causada pela impermeabilidade do tegumento (De Paula, et al., 2012). A associação da regeneração do banco de sementes do solo com fogo e exposição a compostos químicos relacionados à fumaça líquida por longos períodos de tempo evolutivo (Light et al., 2009; Tormo et al., 2014; Çatav et al., 2018), resultou em estudos recentes reconhecendo que compostos químicos desse tipo de fumaça regulam diversos aspectos do desenvolvimento da planta (Burger et al., 2018, Ramos et al., 2019). Porém, os efeitos da fumaça na germinação de sementes florestais do banco do solo em regiões neotropicais ainda permanecem pouco estudados.

O conhecimento dos efeitos do EP na germinação de *S. macranthera* pode resultar em informações importantes sobre a capacidade do uso desse produto na preservação da espécie e produção de mudas. Seu habitat natural, o Cerrado, é considerado um hotspot de biodiversidade e as espécies desse bioma estão adaptadas a um regime definido de queima (Miranda et al., 2010). Porém, a frequência e época de ocorrência do fogo nesse bioma vem sendo ameaçado por incêndios florestais recorrentes (Myers et al., 2000; Silva et al., 2006). Isso resulta em um desequilíbrio entre os episódios de fogo e a recuperação do ecossistema, o que leva a fragmentação da paisagem e sua degradação (Alcañiz et al., 2018). Além disso, o conhecimento dos compostos químicos existentes no EP pode melhorar a compreensão de seu efeito no desenvolvimento das sementes e estabelecimento de plântulas. Preenchendo, assim, uma lacuna com relação ao detalhamento do efeito dos extratos aquosos da fumaça na germinação de sementes florestais.

Diante disso, esse estudo investigou o desempenho germinativo das sementes de *S. macranthera* após embebição com três tipos de extratos pirolenhosos, dois a partir do carvão de *Eucalyptus* sp. e um a partir de *Anadenanthera macrocarpa* (angico) em duas fases de carbonização. O intuito do estudo foi comparar o efeito dos extratos isoladamente na germinação das sementes (i); Determinar o efeito das diferentes doses do extrato na performance germinativa das sementes (ii) e; Caracterizar e comparar a composição química dos extratos (iii).

2. Material e métodos

2.1 Carbonização da madeira e preparo dos extratos pirolenhosos

A carbonização da madeira de *Eucalyptus* sp. (eucalipto) e *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (angico) para obtenção dos EPs foi realizada através de pirólise em forno elétrico do tipo mufla, modelo *GP Científica-2000*, com controle manual de temperatura, utilizando um condensador acoplado a kitassato para recuperação dos gases condensáveis (EP) (Figura 1). Amostras de cavacos dos toretes de cada madeira previamente secos em estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h foram inseridas em um recipiente de aço inoxidável (0,430 x 0,160 x 0,160 m) dentro da mufla (Apêndice A). A temperatura final foi de 400°C para eucalipto e 450°C para angico, e a taxa de aquecimento da mufla foi de $1,66^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Estabeleceu-se que a carbonização fosse finalizada após 60 min para todos os termopares atingirem as temperaturas finais estabelecidas para cada espécie. O monitoramento e medidas das temperaturas foram realizados manualmente, em intervalos de 10 minutos, até alcançar a temperatura final estabelecida. Na saída da mufla foi conectado um sistema de recuperação dos gases condensáveis utilizando um condensador tubular resfriado à água e acoplado aos dois recipientes de coleta. Os gases condensáveis gerados durante a carbonização da madeira foram coletados e quantificados por fase. Cada fase foi caracterizada por um intervalo de temperatura.

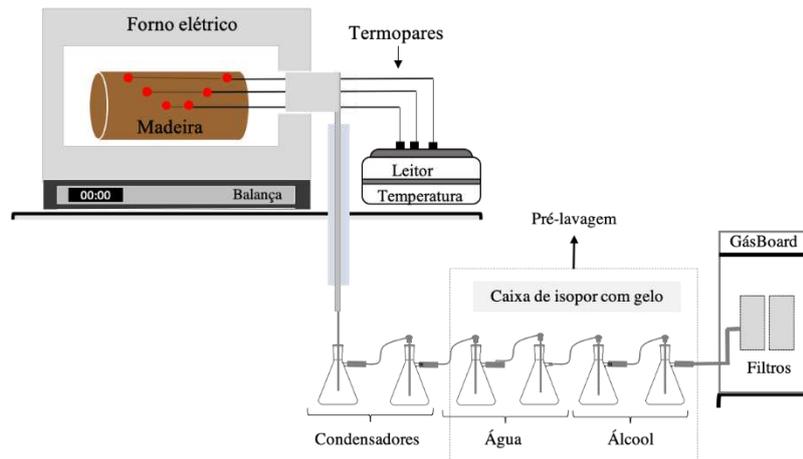


Figura 1. Layout do sistema de carbonização da madeira, acompanhamento da temperatura e sistema de recuperação dos gases condensáveis.

A princípio foram pré-estabelecidas quatro fases de pirólise, baseadas na decomposição térmica teórica da madeira, porém, para a madeira de angico a primeira fase de secagem se deu até 250 °C e foi adicionada mais uma fase até 450 °C, com intervalos a cada 50 °C após a decomposição primária, devido a observação de mudança de coloração do EP obtido.

As quatro fases de carbonização do eucalipto corresponderam às seguintes temperaturas:

- (i) Fase 1 (F1): endotérmica - secagem (25-100 °C)
- (ii) Fase 2 (F2): endotérmica - decomposição primária (101-200 °C)
- (iii) Fase 3 (F3): exotérmica - decomposição secundária (201-300 °C)
- (iv) Fase 4 (F4): exotérmica - fixação de carbono (301-400 °C)

As cinco fases de carbonização do angico correspondem às seguintes temperaturas:

- (i) Fase 1 (F1): endotérmica - secagem (25-250 °C)
- (ii) Fase 2 (F2): endotérmica - decomposição primária (251-300 °C)
- (iii) Fase 3 (F3): exotérmica - decomposição secundária (301-350 °C)
- (iv) Fase 4 (F4): exotérmica - fixação de carbono (351-400 °C)
- (v) Fase 5 (F5): exotérmica - (401-450 °C)

Após a coleta, os extratos foram acondicionados em recipientes de vidro embalados em papel escuro, a fim de evitar que as do extrato reagissem à luz e se precipitassem. Os EPs permaneceram estagnados por seis meses, e em seguida submetidos a filtração por balão de

separação, para decantação do alcatrão. Os extratos com maiores rendimentos foram escolhidos para este experimento, sendo esses obtidos da fase 2 da carbonização de eucalipto (200 °C) e das fases 2 (300 °C) e 3 (350 °C) da carbonização de angico, que posteriormente foram diluídos nas proporções de 1 mL de EP para cada 100, 75 e 50 mL de água destilada (Figura 2).



Figura 2. Coloração do extrato de angico em diferentes fases de carbonização e diluídos em água destilada.

As dosagens foram escolhidas a partir de um bioensaio preliminar com esses extratos na proporção de 1:10, 1:100 e 1:1000, onde a primeira dosagem resultou na morte de todas as sementes, a segunda resultou em diferenças significativas na velocidade e porcentagem de germinação e a terceira não diferiu do controle ([Apêndice A](#)). As soluções foram acondicionadas em recipientes de vidro identificados e armazenados na geladeira com temperatura constante de 5 °C até o início dos testes de germinação. Também foi avaliado um EP comercial de eucalipto, o EPB-106, diluído nas mesmas proporções anteriormente mencionadas.

2.2 Coleta das sementes e teste de germinação

As sementes de *Senna macranthera* foram coletadas de duas árvores matrizes no Campus da Universidade Federal de Viçosa (20°45'14" S 42°52'54" W) em 2019 pela Sociedade de Investigação Florestal - SIF e doadas ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa – UFV. Foi coletado um total de três quilos de sementes (~60.000 sementes, de acordo com [Brasil, 2013](#)) que permaneceram armazenadas em sacos de plástico em câmara fria a 5 °C no Laboratório de Análise de Sementes Florestais da UFV por um ano até o início das análises. O teor de água inicial das sementes foi de 10,9 % e a viabilidade

do lote foi verificada por um teste de germinação preliminar com uma amostra de 400 sementes com 96,2 % de germinação. O desponte lateral nas sementes foi utilizado para a quebra de dormência, sendo desinfestadas com Captan ® (1 %) por 2 minutos. Em bioensaio preliminar comparou-se a germinação quando as sementes foram apenas umedecidas com 3 ml das soluções de EP, que resultou em baixa embebição do extrato (Apêndice A). Portanto, optou-se por sementes imersas em béqueres contendo 5 ml das soluções dos EPs em cada dose já descrita, e submetidas a vácuo na pressão 5 MPa por 30 minutos (Apêndice A). Após o vácuo, foram deixadas nas soluções por 10 minutos. Cinco repetições de 20 sementes de cada tratamento foram dispostas em placas de Petri sobre duas camadas de papel substrato, e vedadas com tampa. O teste de germinação ocorreu em câmara de germinação do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro. A avaliação diária durou sete dias e a protrusão da raiz primária foi utilizada como critério germinativo. As sementes foram reumedecidas com água destilada, quando necessário.

2.3 Análise dos dados

Delineamento Inteiramente Casualizado - DIC foi aplicado para cada tratamento (Tabela 1). Cada um dos 13 tratamentos contou com cinco repetições de 20 sementes (n=100). Para verificar o efeito das variáveis explicativas (a) “dose” (variável explicativa x1) e do (b) “tempo de germinação” (variável explicativa x2) na variável resposta “germinação das sementes” (variável resposta y) foram construídos Modelos Lineares Generalizados (GLM), sob erros normais (após a verificação da normalidade com o teste Shapiro-Wilk). Após, utilizou-se o teste de Tukey para as múltiplas comparações visando acessar as diferenças estatísticas entre as doses e os tratamentos. As etapas descritas foram realizadas como sugerido por Crawley (2012) e realizadas no programa R (2020). O modelo foi construído utilizando a função “glm”, o teste de Tukey foi com a função “TukeyHSD”, e o teste de normalidade com a função “shapiro.test”. Todas essas funções podem ser encontradas no pacote “stats”, como parte integral do programa R. Os gráficos foram construídos utilizando o pacote “ggplot2”. O índice de velocidade de germinação das sementes (IVG) foi calculado de acordo com Maguire (1962).

Tabela 1: Identificação dos tratamentos testados em sementes não dormentes de *Senna macranthera*

Tratamentos
1- Controle sem aplicação de EP, utilizando apenas água destilada
2- Sementes embebidas em EP de angico-F2 na dose 1:100
3- Sementes embebidas em EP de angico-F2 na dose 1:75
4- Sementes embebidas em EP de angico-F2 na dose 1:50
5- Sementes embebidas em EP de angico-F3 na dose 1:100
6- Sementes embebidas em EP de angico-F3 na dose 1:75
7- Sementes embebidas em EP de angico-F3 na dose 1:50
8- Sementes embebidas em EP de eucalipto-F2 na dose 1:100
9- Sementes embebidas em EP de eucalipto-F2 na dose 1:75
10- Sementes embebidas em EP de eucalipto-F2 na dose 1:50
11- Sementes embebidas em EPB 106 na dose 1:100
12- Sementes embebidas em EPB 106 na dose 1:75
13- Sementes embebidas em EPB 106 na dose 1:50

2.4 Análise química dos EPs

Inicialmente as amostras de EPs, foram estocadas por seis meses para decantação e posteriormente foram filtradas para a remoção de material particulado. A análise química para caracterização dos EPs foi realizada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), com as seguintes especificações: coluna Ultra Alloy 5, 30 m, DI 0,25 mm, utilizando gás transportador hélio. A temperatura do injetor foi de 290 °C e a temperatura do forno foi de 40 °C durante 2 min, com rampa de 20 °C.min⁻¹ até 300 °C, sendo mantida por 25 min. Os compostos obtidos foram comparados com a literatura a fim de encontrar compostos

similares em até 70% com butenolídeos e/ou nitrogenados. Sendo considerados como principais compostos aqueles encontrados em maior quantidade na amostra (demonstrado pelo percentual de área ocupada) e que somem mais da metade da composição total do extrato (Apêndice B)

3. Resultados

3.1 Germinação das sementes após embebição nos extratos

Nenhum extrato superou a performance germinativa das sementes do controle (Tabela 2). O EP produzido a partir da carbonização da madeira de angico em 350 °C (Fase 3) inibiu menos (56.2 – 73.7 %) a germinação das sementes do que o EP produzido a 300 °C (Fase 2) (26.2 – 46.2 %), mas isso dependeu da dose utilizada (Tabela 2, Figura 3). Além disso, o aumento de 50 °C na faixa de temperatura de carbonização da madeira de angico influenciou a velocidade de germinação das sementes embebidas nesse extrato, que oscilou de 3 a 6 pontos comparados com o controle (Tabela 2). A embebição após o EP de angico também influenciou negativamente o tempo médio de germinação das sementes, e quanto mais concentrada foi a solução, maior a tendência de atraso germinativo (Tabela 2). Essa tendência foi evidenciada ainda pelo índice de velocidade de germinação, sendo mais proeminente nas sementes embebidas com EP de angico da fase 2 (300 °C) do que da fase 3 (350 °C) (Tabela 2).

Por outro lado, o EP produzido a partir da carbonização da madeira de eucalipto a 200 °C nas doses de 1:100 e 1:75 manteve a alta germinabilidade das sementes, entretanto para concentrações de 1:50 foi observado redução significativa de até 61% (Tabela 2, Figura 3). A velocidade foi reduzida em todas as doses testadas e o tempo de germinação resultou em diferenças significativas entre elas, sendo maior para as sementes embebidas no extrato mais diluído (1:100), que levaram dois dias a mais para germinar quando comparadas com o controle (Tabela 2).

O EP comercial EPB-106 inibiu a germinação e a velocidade e aumentou o tempo de germinação das sementes em todas as doses testadas (Tabela 2). Sendo evidenciado seu uso como herbicida quanto maior a concentração da solução.

Tabela 2. Análise de variância das médias de germinação (G%), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (T dias) das sementes de *Senna macranthera* após embebição com **EP de angico, de eucalipto e de EPB-106 em três doses**. Letras diferentes nas colunas indicam que há diferença entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

Experimento	Tratamento	Dose	G (%)	IVG	T (dias)
	Controle		96.2 ± 4.7 a	6.6 ± 0.3 a	3.1 ± 0.1 a
1	EP de angico-F2	1:100	46.2 ± 17.9 c	1.9 ± 0.7 cd	4.8 ± 0.4 b
2	EP de angico-F2	1:75	61.2 ± 21.3 c	2.4 ± 0.4 b	5.1 ± 0.4 bc
3	EP de angico-F2	1:50	26.2 ± 14.3 d	0.9 ± 0.4 d	5.9 ± 0.6 c
4	EP de angico-F3	1:100	73.7 ± 11.0 b	3.3 ± 0.7 b	4.5 ± 0.6 b
5	EP de angico-F3	1:75	56.2 ± 8.5 c	2.2 ± 0.3 bc	5.3 ± 0.5 bc
6	EP de angico-F3	1:50	63.7 ± 7.5 bc	2.4 ± 0.9 b	5.4 ± 0.4 bc
7	EP de eucalipto-F2	1:100	97.7 ± 2.2 a	3.6 ± 0.2 c	5.4 ± 0.1 c
8	EP de eucalipto-F2	1:75	85.0 ± 7.5 a	4.9 ± 0.4 b	3.5 ± 0.06 b
9	EP de eucalipto-F2	1:50	35.0 ± 12.5 b	1.7 ± 0.8 d	4.3 ± 0.5 b
10	EPB 106	1:100	66.2 ± 11.2 b	3.4 ± 0.6 b	4.0 ± 0.5 b
11	EPB 106	1:75	62.5 ± 8.7 b	3.2 ± 0.3 b	4.0 ± 0.09 b
12	EPB 106	1:50	57.5 ± 7.5 c	2.8 ± 0.4 b	3.7 ± 0.3 b

Houve efeito das doses e dos tratamentos na germinação das sementes para todos os EPs. Para o tratamento na dose mais alta (1:50) de todos os EPs, foi observado redução na germinação das sementes, mas não o suficiente para a letalidade (Figura 3). As doses de 1:75 e 1:100 não resultaram em mudanças na performance germinativa das sementes, quando comparadas com o controle, e embora o EP de eucalipto desencadeie alta germinabilidade

nessas concentrações (Figura 3) a predisposição ao atraso germinativo (Tabela 2) reitera esse resultado.

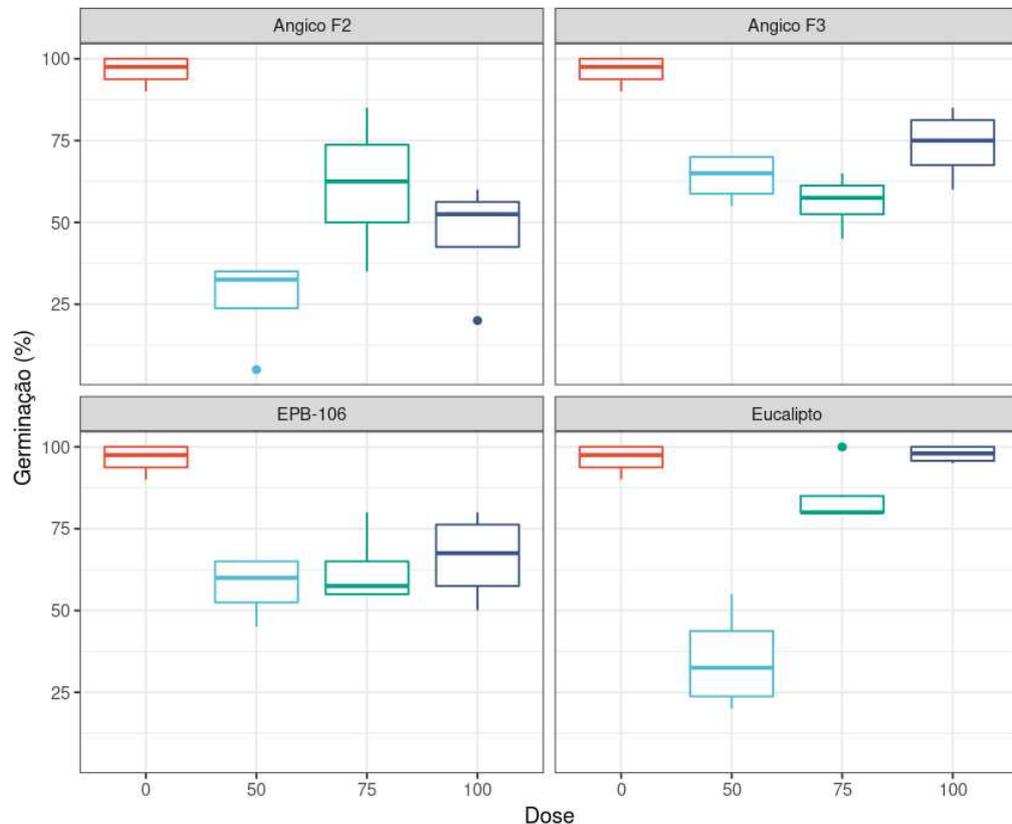


Figura 3. Distribuição da germinação (%) das sementes não dormentes de *Senna macranthera* após embebição em três ácidos pirolenhosos (EP) sendo eles: angico, produzido a partir da carbonização da madeira em mufla com temperatura controlada a 300 (F2) e 350 °C (F3); eucalipto, produzido a partir da carbonização a 200 °C; e o extrato comercial EPB 106. Todos diluídos nas doses de 1ml de EP em 50, 75 e 100 ml de água. O tratamento controle testou a germinação apenas em água destilada. As barras verticais representam a amplitude total da distribuição (valores mínimos e máximos). Cada caixa representa 50 % dos valores centrais da distribuição, limitados pelo primeiro (inferior) e terceiro quartis (superior). O símbolo * representa valores extremos (outliers). A barra horizontal que “corta” a caixa representa o intervalo de confiança de 95 % ao redor da mediana.

3.2 Composição química dos EPs

72 compostos orgânicos foram registrados nas amostras do EP de angico, sendo 37 da fase 2 de carbonização (300 °C) e 35 compostos da fase 3 (350 °C). A composição química

e a proporção dos produtos deste EP mudou conforme a faixa de temperatura de carbonização (Figura 4), e um aumento de 50 °C influenciou na quantidade registrada dos principais compostos da amostra.

Os compostos: cyclopropylmethanol (ciclopropilmetanol) (12,83 %), 2-methoxyphenol (2-metoxifenol) (11,87%); 2,6-dimethoxyphenol (2,6-dimetóxifenol) (11,69 %), (tetrahydrofuran-2-yl)methanol (tetraidrofuran-2-il)metanol(7,12%), 3-hydroxypyridin-2(1H)-one (3-hidroxipiridin-2(1H)-ona (6,08 %) e 2-methoxy-4-methylphenol (2-metoxi-4-metilfenol) (5,55 %) foram os principais componentes da amostra de EP angico da fase 2 e juntos somaram 55,14 % da sua composição.

Os compostos: cyclopropylmethanol (18,93 %), (tetrahydrofuran-2-yl)methanol (16,25 %), 2-methoxyphenol (8,52 %), 2,6-dimethoxyphenol (6,70 %), dihydrofuran-2(3H)-one (diidrofuran-2(3H)-ona)(5,23 %) e 2-methoxy-4-methylphenol (5,08 %) somaram juntos 60,71 % da composição da amostra de EP de angico da fase 3 , destacando-se em quantidade neste EP.

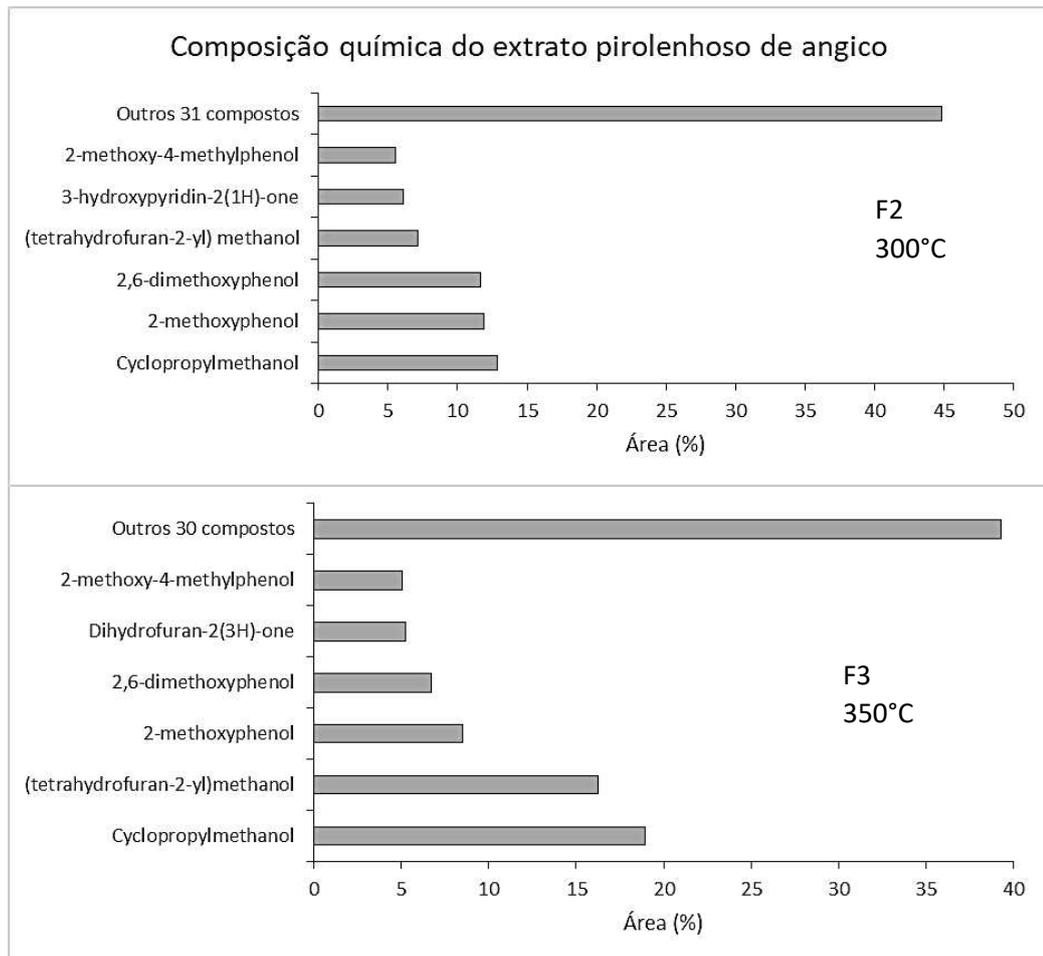


Figura 4. Os seis compostos químicos com maior área (%) encontrados no ácido pirolenhoso de angico produzido em duas fases de temperaturas de carbonização da madeira (300 e 350 °C).

54 compostos orgânicos foram registrados nas amostras de EP de eucalipto, sendo 27 compostos da fase 2 (200 °C) de carbonização da madeira. Os seis principais compostos encontrados em maior quantidade nessa amostra foram: 3-hydroxypyridin-2(1H)-one (20,7 %); D-Allose (D-Alose) (13,37 %); 2,6-dimethoxyphenol (9,78 %); cyclopropylmethanol (8,59 %); 1,2,4-trimethoxybenzene (1,2,4-trimetoxibenzeno) (6,88 %); e 1,2,3-trimethoxy-5-methylbenzene (1,2,3-trimetoxi-5-metilbenzeno) (4,53%) e juntos somaram 63,85 % da sua composição (Figura 5).

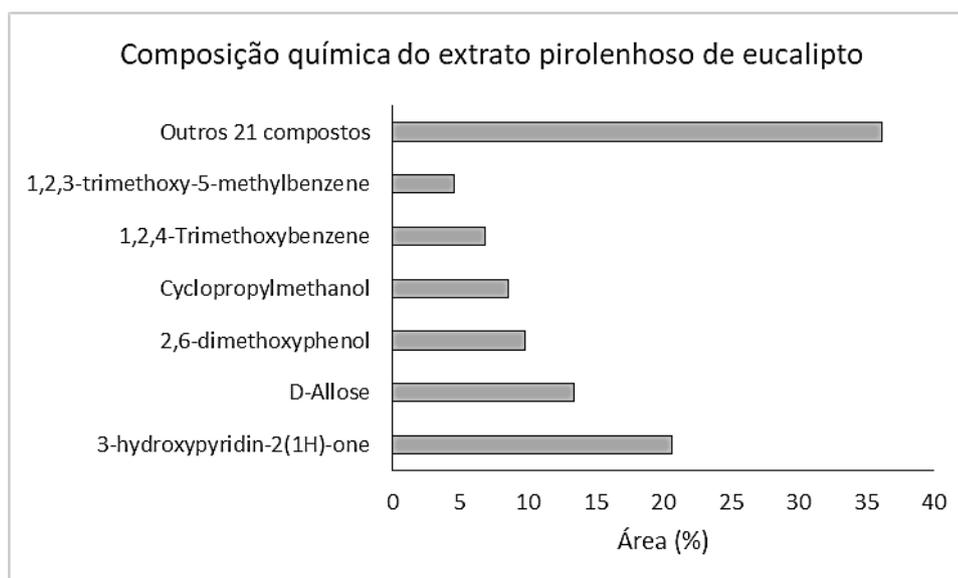


Figura 5. Os seis compostos químicos com maior área (%) encontrados no ácido pirolenhoso de eucalipto produzido a partir da carbonização da madeira a 200 °C.

O EP de angico na fase 2 prejudicou a germinação das sementes, ao contrário do EP de eucalipto, que a depender da dose, favoreceu a germinação (Tabela 2). Esses extratos possuem composição química semelhante, entretanto a quantidade de cada composto nas amostras revelou que o EP de angico possui mais compostos fenólicos, enquanto que o EP de eucalipto possui mais piridona (composto nitrogenado) e aldeído (Figura 6).

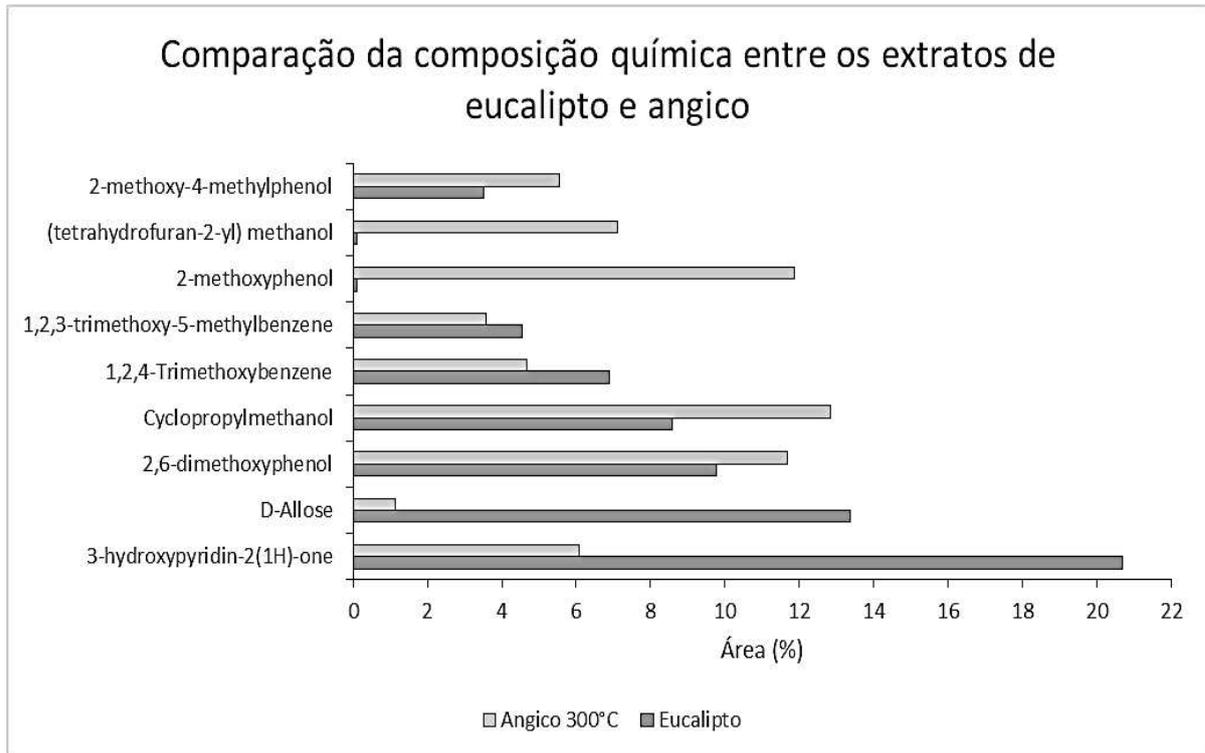


Figura 6. Comparação entre os seis compostos orgânicos encontrados em maior quantidade nos extratos pirolenhosos de angico e eucalipto, produzidos através da carbonização da madeira por pirolise em mufla a 300 °C e 200 °C, respectivamente.

O EP de angico na fase 2 prejudicou mais a germinação das sementes do que o EP da fase 3 (Tabela 2). Apesar desses extratos possuírem mais compostos fenólicos, o EP da fase 3 possui um composto etílico em maior quantidade, enquanto que o EP da fase 2 possui em maior quantidade um álcool. O composto (tetrahydrofuran-2-yl) methanol foi o que apresentou maior diferença entre os EPs de angico com mais 9 % em quantidade no extrato da fase 3 do que da fase 2. Em seguida, o composto cyclopropylmethanol que na fase 3 contou com mais 6 % do que na fase 2, que o superou em quase 5 % com 2,6-dimethoxyphenol (Figura 7).

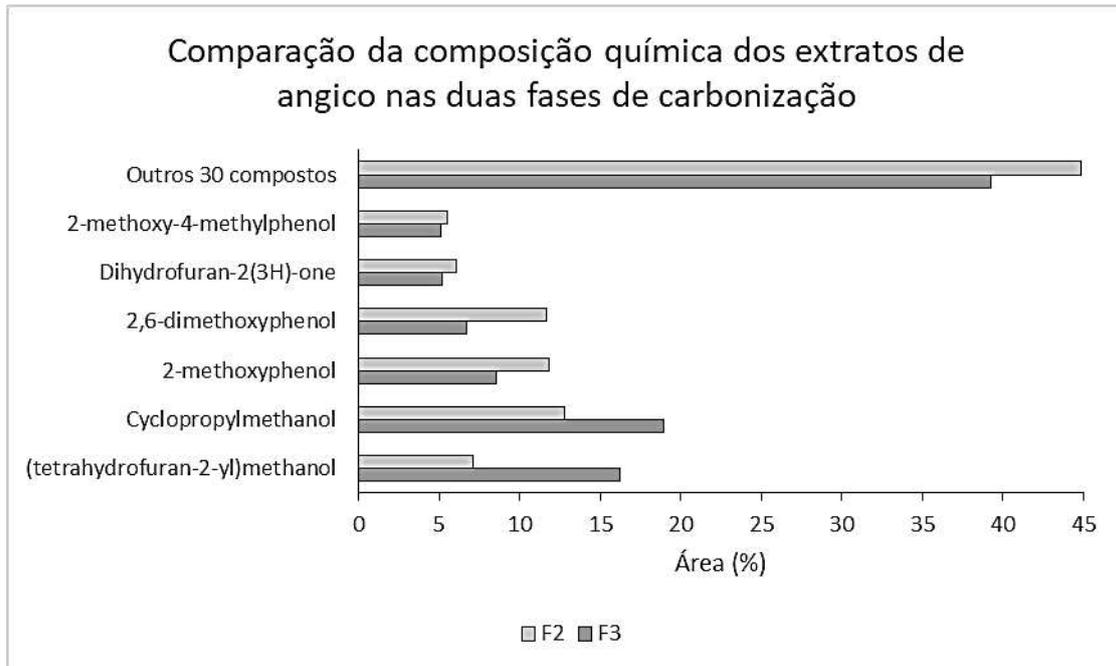


Figura 7. Comparação entre os seis compostos orgânicos encontrados em maior quantidade nos extratos pirolenhosos de angico, produzidos através da carbonização da madeira por pirolise em mufla a 300°C (F2) e 350°C (F3).

4. Discussão

Neste estudo ficou revelado a redução do desempenho germinativo promovido por todos os extratos testados na germinação de sementes de *S. macranthera*, sendo mais evidente em altas concentrações (<1:75), principalmente quando olhamos a velocidade de germinação (Tabela 2). Apesar da redução da germinação, nenhum extrato levou as sementes à letalidade. Indicando que *S. macranthera* é tolerante aos efeitos da fumaça líquida e, portanto, menos suscetível à redução nos biomas de origem quando submetidos ao fogo.

O efeito inibitório de altas concentrações do extrato pirolenhoso já foi reportado em várias espécies. O PA também induziu efeitos tóxicos sobre *Adenantha cepa*, as maiores concentrações de PA (13,07, 26,25, 52,5, 78,75 e 105 g/L) exibiram completamente a germinação das sementes dessa espécie e o crescimento das raízes (De Lima et al., 2019). Jose et al (2016), testando PA de eucalipto na germinação de sementes de quatro espécies florestais do Cerrado, observaram que as altas concentrações inibiram a germinação e a velocidade de germinação das sementes, sendo *Eugenia dysenterica*, e *Handroanthus serratifolius* as mais prejudicadas. Independente do material queimado para geração do extrato aquoso da fumaça,

altas concentrações de PA inibiram a germinação das sementes de 10 espécies florestais do bioma Amazônia (Ferraz et al., 2013). E quando não concentrado, um efeito estimulante sobre a germinação de sementes foi observado em apenas três espécies: *Jacaranda copaia*, *Ochroma pyramidale* e *Cordia goeldiana*. Porém, segundo esses mesmos autores, a concentração que resulta em inibição da germinação é dependente da espécie estudada e também do tipo de material usado como fonte do extrato. Esses estudos demonstram que o uso de extratos aquosos da fumaça pode reduzir a germinação de sementes de várias espécies vegetais, sendo evidenciado seu efeito herbicida, porém não letal. Isso porque a dose aplicada, a metodologia de preparo e o material utilizado para queima podem apresentar estímulo germinativo, ou nenhum efeito. E a isso soma-se a composição química do extrato, que como foi mostrado neste estudo, pode mudar com a diferença na temperatura de queima do material vegetal (Figura 7). A toxicidade aguda do PA já foi atribuído, principalmente à fração fenólica (Pimenta et al., 2018). Também pela forma de obtenção do PA, na pirólise lenta da madeira, como em *Eucalyptus grandis*, o PA apresentou toxicidade para a espécie *Daphnia magna* (De Lima et al., 2019). Segundo estes mesmos autores, variações na toxicidade estão possivelmente relacionadas com o processo diferente para obtenção do PA, pirólise rápida e lenta, que variam em composição e, conseqüentemente, podem diferir quanto ao seu potencial tóxico.

Neste estudo, os compostos da família dos butenólídeos podem não ter sido os responsáveis pela alta germinabilidade das sementes, como evidenciado por algumas pesquisas (Van Staden et al., 2004, Dixon et al., 2009). Estudos sugerem que a germinação estimulada pela fumaça é uma característica muito mais complexa e endossam a ideia de que vários compostos podem estimular a germinação (Daws et al., 2007; Downes et al., 2010; Downes et al., 2014). No extrato de eucalipto aqui testado, os aldeídos e um composto nitrogenado representado pelas piridonas (Figura 5), podem ter sido os responsáveis pela germinação das sementes de *S. macranthera*, corroborando com pesquisas que indicam que os compostos nitrogenados resultantes da combustão de biomassa podem ter um papel na germinação de plantas com comportamento regenerativo estimulado pela fumaça (Flematti et al., 2011, Downes et al., 2014).

No extrato de angico, um aumento de 50 °C na temperatura de carbonização da madeira fez com que os compostos fenólicos ora prejudiciais à germinação, passassem a estimulá-la, a depender da dose (Tabela 2, Figura 3). De acordo com os resultados da composição química, os compostos fenólicos e seus derivados constituíram boa parte do EP de angico (Figura 4). Estes compostos consistem principalmente em phenol, 2-methoxyphenol,

2,6-dimethoxyphenol, entre outros, e são resultado da decomposição da lignina (Sun et al., 2011). O 2,6-dimethoxyphenol (DMP) foi o fenol encontrado em maior quantidade no EP de angico, mas também encontrado no PA de eucalipto. O DMP tem a função de metabólito vegetal e é um membro dos fenóis e um dimethoxybenzene (dimetoxibenzeno) (ChEBI Database, 2022). É amplamente utilizado como substrato na determinação da atividade da lacase, enzimas responsáveis pela síntese de compostos orgânicos (Imran et al, 2012). O DMP foi o antioxidante mais útil encontrado no EP de resíduos florestais e agrícolas da China, e os autores concluem que o EP que contém alto teor de 2,6-dimethoxyphenol (2,6-dimetoxifenol) é mais adequado para as áreas alimentícia e farmacêutica (Li et al, 2019). Embora os compostos fenólicos atuem na sua maioria como inibidores de crescimento vegetal (Cardoso, 2004), neste estudo os extratos com alto teor de DPM não inibiram a germinação de sementes de *S. macranthera*.

O cyclopropylmethanol (ciclopropilmetanol) (CPMO), composto encontrado em maior quantidade no EP de angico (Figura 4), trata-se de um álcool líquido incolor transparente que se dissolve completamente em água (Salaun and Baird, 1995). A decomposição da celulose e hemicelulose produzem compostos pertencentes à classe dos álcoois (ciclopropilmetanol) assim como aldeído, cetona, éster e alguns ácidos carboxílicos (Yorgun and Yildiz, 2015). O CPMO é o menor cicloalcano que carrega um grupo hidroximetil diretamente ligado ao grupo ciclopropil (Salaun and Baird, 1995). O composto é a matéria-prima para ingrediente em antifungos, inseticidas e pesticidas (Norghauer et al., 2015). Sabe-se que o CPMO é encontrado naturalmente na planta *Portulaca oleraceae*, que são ricas em vitaminas A, B e C e sais minerais e possuem também propriedades diuréticas, purificantes, analgésicas, anti-glicêmicas e anti-hemorrágicas (Vieira et al., 2016). Entretanto, a atividade específica desse composto na germinação de sementes ainda é pouco estudada.

O 3-hydroxypyridin-2(1H)-one foi o composto nitrogenado encontrado em maior quantidade no EP de eucalipto (Figura 5). A decomposição de lignina e celulose simultaneamente dá origem à produção de aldeído, cetona e ésteres (Yorgun and Yildiz, 2015). O 3-hydroxypyridin-2(1H)-one é um composto orgânico derivado da Piridona, trata-se de um sólido cristalino incolor utilizado para síntese de peptídeos. É caracterizado pelo grupo amida formando estruturas de ligação de hidrogênio e um pouco relacionadas com o mecanismo de emparelhamento de bases encontrada no RNA e DNA (Yang and Craven, 1998). De acordo com a Medical Subject Headings (MeSH), a 3-hidroxipiridona é capaz de inibir ou retardar as reações de oxidação, neutralizando os efeitos prejudiciais da oxidação em tecidos vivos. Essa

ação antioxidante pode ter contribuído para a alta performance germinativa das sementes, quando embebidas em EP com grande quantidade desse composto (Figura 5).

D-alose foi o segundo composto encontrado em maior quantidade no EP de eucalipto, que desencadeou a maior germinação das sementes de *S. macranthera* (Tabela 2, Figura 3). Esse composto pertence ao grupo dos aldeídos, um dos monossacarídeos mais simples de carboidrato e já demonstrou efeito na germinação das sementes e crescimento de plântulas (Kobayashi et al., 2010; Afach et al., 2006). Também inibiu o crescimento da raiz por uma via independente da hexoquinase e afetou a doença da mancha bacteriana no arroz, regulando positivamente genes relacionados à defesa (Kano et al., 2013). A fosforilação de *D*-alose em A6P em arroz tratado com *D*-alose foi essencial para induzir defesa com formação de lesão (Kano et al., 2010). Em ambas *Arabidopsis* e arroz, genes relacionados à defesa foram regulados após tratamento com *D*-alose (Kano et al. 2010, Narusaka et al., 2009).

Encontrado em grande quantidade nos EPs de angico e eucalipto (Figura 6), 1,2,4-trimetoxibenzeno (1,2,4-TTB) é um tanino derivado de um anel B de procianidina e pode servir como bom marcador de taninos na planta, solo ou sedimento (Nierop et al., 2006). É encontrado em dezenas de espécies arbustivas, sendo comercializado como composto em óleos essenciais e em florais terapêuticos (Pherobase Database, 2021). Os taninos são polímeros fenólicos com propriedades de defesa vegetal. Eles são responsáveis por produzirem toxinas que reduzem o crescimento e a sobrevivência de muitos herbívoros, sendo um repelente alimentar a uma grande variedade de animais (Taiz and Zeiger, 2013). Dessa forma, uma semente embebida com certa quantidade desse composto, poderia aumentar suas chances de sobrevivência no campo.

As duas fases de carbonização analisadas no EP de angico apresentaram semelhante composição química, com a maioria de compostos fenólicos. No entanto, os EPs desencadearam performances germinativa diferentes nas sementes, a depender da dose (Figura 3). (Tetrahydrofuran-2-yl)methanol foi o composto encontrado em maior quantidade no EP de angico fase 3 (350 °C) em comparação com a fase 2 (300 °C) (Figura 7). Tetrahydrofurano (THF), ou oxolano, é um composto orgânico com a fórmula $(CH_2)_4O$, classificado como um éter cíclico (Muller, 2000). O THF é um solvente versátil (Nakawaka et al., 2012). Recentemente foi utilizado como inibidor de fosfodiesterase (Tang et al., 2021), que são enzimas que hidrolisam o AMPc (adenosina monofosfato cíclico, um tipo de mensageiro da célula) (Conti and Beavo, 2007). A redução do nível de AMPc (decorrente da degradação) inibe a lipólise, isto é, a quebra de lipídios (Ofoe et al., 2022). *Senna macranthera* possui sementes

cerosas com uma espessa camada lipídica no tegumento (De Paula et al, 2012). Nesse estudo, o fato das sementes dessa espécie germinarem pouco (26 %) quando embebidas com o EP com baixa quantidade de THF (angico F2), mas germinarem mais (73 %) com o EP com quantidades maiores desse composto (angico F3) pode indicar possível quebra dessa camada lipídica, que favoreceu a embebição e o crescimento da raiz.

5. Conclusão

Senna macranthera apresenta diferentes respostas germinativas dependendo do tipo de EP (material vegetal), da dose utilizada e da composição química de cada extrato. O efeito negativo dos extratos aquosos de fumaça na germinação das sementes evidencia que mais uma espécie vegetal da zona neotropical teve seu desenvolvimento afetado pela exposição à fumaça. No entanto, apesar da redução, nenhum dos extratos nas concentrações testadas inibiram totalmente a germinação de sementes de *S. macranthera*, indicando ser uma espécie resistente aos efeitos da exposição à fumaça, e, portanto, menos suscetível à redução nos biomas de origem quando submetidos ao fogo. A composição química dos extratos é decisiva para a sobrevivência das sementes e para a possível quebra lipídica, e a promoção da germinação desencadeada pelo TFH é um estímulo para estudos futuros.

6. Referências Bibliográficas

- Abedi, M., Zaki, E., Erfanzadeh, R., Naqinezhad, A. (2018). Germination patterns of the scrublands in response to smoke: The role of functional groups and the effect of smoke treatment method. *South African Journal of Botany*, 115, 231-236.
- Afach, G., Kawanami, Y., Kato-Noguchi, H., & Izumori, K. (2006). Practical production of 6-O-octanoyl-D-allose and its biological activity on plant growth. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(8), 2010-2012.
- Alcañiz, M., Outeiro, L., Francos, M., & Úbeda, X. (2018). Effects of prescribed fires on soil properties: A review. *Science of the Total Environment*, 613, 944-957.
- Alves, M., Cazetta, J. O., Nunes, M. A., Oliveira, C. A. L. D., & Colombi, C. A. (2007). Ação de diferentes preparações de extrato pirolenhoso sobre *Brevipalpus phoenicis* (GEIJSKES). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29, 382-385.
- Brasil. (2013). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instruções para análise de sementes de espécies florestais, de 17 de janeiro de 2013, Brasília.

- Ferraz, I. D. K., Arruda, Y. M. B. C., Van Staden, J. (2013). Smoke-water effect on the germination of Amazonian tree species. *South African Journal of Botany*, 87, 122-128.
- Burger, B. V., Pošta, M., Light, M. E., Kulkarni, M. G., Viviers, M. Z., & Van Staden, J. (2018). More butenolides from plant-derived smoke with germination inhibitory activity against karrikinolide. *South African Journal of Botany*, 115, 256-263.
- Campos, Â. D. (2007). Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. *Embrapa Clima Temperado-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- Cardoso, V. J. M. (2004). Dormência: estabelecimento do processo, in: Ferreira, A.G., Borghetti, F. (Eds.), *Germinação Do Básico Ao Aplicado*. Artmed, Porto Alegre, p. 323
- Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI) [www .ebi .ac .uk / chebi](http://www.ebi.ac.uk/chebi). Acesso em 22 de junho de 2022.
- Conti, M., & Beavo, J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 481-511.
- Curi, R., Pompeia, C., Miyasaka, C. K., & Procópio, J. (2001). Entendendo a gordura: os ácidos graxos. Barueri, SP: Manole
- Çatav, Ş. S., Küçükakyüz, K., Tavşanoğlu, Ç., & Pausas, J. G. (2018). Effect of fire-derived chemicals on germination and seedling growth in Mediterranean plant species. *Basic and applied ecology*, 30, 65-75.
- Daws, M. I., Davies, J., Pritchard, H. W., Brown, N. A., & Van Staden, J. (2007). Butenolide from plant-derived smoke enhances germination and seedling growth of arable weed species. *Plant Growth Regulation*, 51(1), 73-82.
- De Lima, G. G., Mendes, C., de Marchi, G., Vicari, T., Cestari, M. M., Gomes, M. F., ... & Leme, D. M. (2019). The evaluation of the potential ecotoxicity of pyrolygneous acid obtained from fast pyrolysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 616-623.
- De Paula, A. S., Delgado, C. M. L., Paulilo, M. T. S., Santos, M. (2012). Breaking physical dormancy of *Cassia leptophylla* and *Senna macranthera* (Fabaceae: Caesalpinioideae) seeds: water absorption and alternating temperatures. *Seed Science Research*, 22(4), 259-267.
- Dixon, K. W., Merritt, D. J., Flematti, G. R., & Ghisalberti, E. L. (2009). Karrikinolide—a phytoreactive compound derived from smoke with applications in horticulture, ecological restoration and agriculture. *Acta Horticulturae*, 813, 155-170.
- Downes, K. S., Light, M. E., Pošta, M., Kohout, L., van Staden, J. (2014). Do fire-related cues, including smoke-water, karrikinolide, glyceronitrile and nitrate, stimulate the germination of 17 Anigozanthos taxa and *Blancoa canescens* (Haemodoraceae)? *Australian Journal of Botany*, 62(4), 347-358.
- Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Trengove, R. D. (2004). A compound from smoke that promotes seed germination. *Science*, 305(5686), 977-977.
- Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Trengove, R. D. (2009). Identification of alkyl substituted 2 H-furo [2, 3-c] pyran-2-ones as germination stimulants present in smoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9475-9480.

- Flematti, G. R., Merritt, D. J., Piggott, M. J., Trengove, R. D., Smith, S. M., Dixon, K. W., & Ghisalberti, E. L. (2011). Burning vegetation produces cyanohydrins that liberate cyanide and stimulate seed germination. *Nature Communications*, 2(1), 1-6.
- Imran, M., Asad, M. J., Hadri, S. H., & Mehmood, S. (2012). Production and industrial applications of laccase enzyme. *Journal of cell and molecular biology*, 10(1), 1.
- José, A. C., de Andrade, R. J., Pereira, W. V. S., da Silva, N. C. N., & Faria, J. M. R. (2016). Efeito do extrato pirolenhoso sobre a germinação de espécies do Cerrado brasileiro. *Caderno De Ciências Agrárias*, 8(1), 62-69.
- Kano A, Gomi K, Yamasaki-Kokudo, et al.. (2010). A rare sugar, d-allose, confers resistance to rice bacterial blight with upregulation of defense-related genes in *Oryza sativa*. *Phytopathology* 100, 85–90
- Kano, A., Fukumoto, T., Ohtani, K., Yoshihara, A., Ohara, T., Tajima, S., ... & Akimitsu, K. (2013). The rare sugar D-allose acts as a triggering molecule of rice defence via ROS generation. *Journal of experimental botany*, 64(16), 4939-4951
- Keeley, J. E., Fotheringham, C. J. (2000). Role of fire in regeneration from seed. *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*, 2, 311-330.
- Keeley, J. E., Pausas, J. G. (2018). Evolution of ‘smoke’induced seed germination in pyroendemic plants. *South African Journal of Botany*, 115, 251-255.
- Kobayashi, M., Ueda, M., Furumoto, T., & Kawanami, Y. (2010). Retarding activity of 6-O-acetyl-D-alloses against plant growth. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(1), 216-217
- Li, Z., Zhang, Z., Wu, L., Zhang, H., & Wang, Z. (2019). Characterization of five kinds of wood vinegar obtained from agricultural and forestry wastes and identification of major antioxidants in wood vinegar. *Chemical Research in Chinese Universities*, 35(1), 12-20.
- Light, M. E., Gardner, M. J., Jäger, A. K., & Van Staden, J. (2002). Dual regulation of seed germination by smoke solutions. *Plant Growth Regulation*, 37(2), 135-141.
- Light, M. E., Daws, M. I., & Van Staden, J. (2009). Smoke-derived butenolide: towards understanding its biological effects. *South African Journal of Botany*, 75(1), 1-7.
- Lorenzi, H. (2021). Árvores Brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, Insitituto Plantarum, V. 3, 3ªEd, Nova Odessa.
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2, 176-177.
- Medical Subject Headings (MeSH). <https://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>
- Miranda, H. S. (2010). Efeitos do regime do fogo sobre a estrutura de comunidades de cerrado: Resultados do projeto Fogo. *Brasília-DF, Ibama*.
- Miyasaka, S., Ohkawara, T., & Utsumi, B. (1999). Ácido Pirolenhoso: uso e fabricação. *Boletim AgroEcológico*, 3, 14.
- Moreira, B., & Pausas, J. G. (2018). Shedding light through the smoke on the germination of Mediterranean Basin flora. *South African Journal of Botany*, 115, 244-250.

- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Nakagawa, Y., & Tomishige, K. (2012). Production of 1, 5-pentanediol from biomass via furfural and tetrahydrofurfuryl alcohol. *Catalysis today*, 195(1), 136-143.
- Narusaka Y, Narusaka M, Abe H, et al. (2009). High-throughput screening for plant defense activators using a β -glucuronidasereporter gene assay in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* 26, 345–349.
- Nierop, K. G., Verstraten, J. M., Tietema, A., Westerveld, J. W., & Wartenbergh, P. E. (2006). Short-and long-term tannin induced carbon, nitrogen and phosphorus dynamics in Corsican pine litter. *Biogeochemistry*, 79(3), 275-296.
- Norghauer, J. M., Röder, G., & Glauser, G. (2016). Canopy gaps promote selective stem-cutting by small mammals of two dominant tree species in an African lowland forest: the importance of seedling chemistry. *Journal of Tropical Ecology*, 32(1), 1-21
- Ofoe, R., Gunupuru, L. R., Wang-Pruski, G., Fofana, B., Thomas, R. H., & Abbey, L. (2022). Seed priming with pyroligneous acid mitigates aluminum stress, and promotes tomato seed germination and seedling growth. *Plant Stress*, 4, 100083.
- Pherobase database <https://www.pherobase.com/database/compound/compounds-index.php>
Acesso em 22/06/2022
- Pimenta, A. S., Fasciotti, M., Monteiro, T. V., & Lima, K. M. (2018). Chemical composition of pyroligneous acid obtained from *Eucalyptus* GG100 clone. *Molecules*, 23(2), 426.
- Porto, P. R., Sakita, A. E. N., Nakaoka, S. M. (2007). Efeito da aplicação do extrato pirolenhoso na germinação e no desenvolvimento de mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. IF-Série Registros, 31, 15-19.
- Ramos, D. M., Valls, J. F., Borghetti, F., Ooi, M. K. (2019). Fire cues trigger germination and stimulate seedling growth of grass species from Brazilian savannas. *American Journal of Botany*, 106(9), 1190-1201
- Salaiin, J., & Bairtr, M. (1995). Biologically active cyclopropanes and cyclopropenes. *Curr. Med. Chem*, 2, 511-542.
- Silva, J. F., Fariñas, M. R., Felfili, J. M., Klink, C. A. (2006). Spatial heterogeneity, land use and conservation in the cerrado region of Brazil. *Journal of biogeography*, 33(3), 536-548.
- Souza-Silva, A., Zanetti, R., Carvalho, G. A., & Mendonça, L. A. (2006). Qualidade de mudas de eucalipto tratadas com extrato pirolenhoso. *Cerne*, 12(1), 19-26.
- Sun, P., Heng, M., Sun, S. H., & Chen, J. (2011). Analysis of liquid and solid products from liquefaction of paulownia in hot-compressed water. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 924-933.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2003). *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 954 p.,
- Tang, L., Jiang, J., Song, G., Wang, Y., Zhuang, Z., Tan, Y., ... & Feng, X. (2021). Design, synthesis, and biological evaluation of novel urolithins derivatives as potential phosphodiesterase II inhibitors. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.

- Tormo, J., Moreira, B., Pausas, J. G. (2014). Field evidence of smoke-stimulated seedling emergence and establishment in Mediterranean Basin flora. *Journal of vegetation science*, 25(3), 771-777.
- Van Staden, J., Jager, A. K., Light, M. E., & Burger, B. V. (2004). Isolation of the major germination cue from plant-derived smoke.
- Vieira, R. F., Agostini-Costa, T. D. S., Silva, D. B., Sano, S. M., & Ferreira, F. R. (2016). Espécies alimentícias nativas da região centro-oeste. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial plantas para o futuro-região centro-oeste. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 109-118.
- Yang, H. W., & Craven, B. M. (1998). Charge density study of 2-pyridone. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 54(6), 912-920.
- Yang, H. et al. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, v. 86, p. 1781–1788, 2007.
- Zhang, Y., Silcock, P., Jones, J. R., & Eyres, G. T. (2020). Changes in wood smoke volatile composition by manipulating the smoke generation conditions. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 148, 104769.
- Yorgun, S., & Yıldız, D. (2015). Slow pyrolysis of paulownia wood: Effects of pyrolysis parameters on product yields and bio-oil characterization. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 114, 68-78.
- Zeferino, I., de Lima, E. A., & Vieira, E. S. N. (2018). Uso do extrato pirolenhoso como adjuvante de herbicida..

**Sistema enzimático antioxidante de sementes de *Senna macranthera* (DC. ex Collad.)
H.S.Irwin & Barneby após exposição ao fogo e fumaças gasosa e líquida**

Resumo

Condições de estresse durante a germinação podem levar a diversas alterações metabólicas, afetando a germinação e a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio. Nosso objetivo foi analisar as alterações no metabolismo antioxidativo durante a germinação de sementes de *Senna macranthera* após estresse causado pelo fogo, fumaças gasosa (por defumação) e líquida (por ácido pirolenhoso -PA). Foram realizadas análises da atividade das enzimas de SOD, APX, CAT e POX. A metodologia aplicada para APX não funcionou nesta espécie. A atividade da SOD apresentou aumento significativo nas sementes após a exposição ao PA de eucalipto na concentração 1:75 e exposição ao fogo. As atividades da CAT e POX foram reduzidas após embebição em PA de angico (F2- 1:50 e 1:100) e fumaça. A exposição à fumaça gasosa reduziu a atividade de todas as enzimas antioxidantes, indicando que dos estresses testados, este é mais prejudicial para germinação de *S. macranthera*. A enzima POX pode atuar como molécula sinalizadora de estresse da parede celular de *S. macranthera*, sendo necessários mais estudos nesta linha de pesquisa.

Abstract

Stressful conditions during germination can lead to several metabolic changes, affecting germination and excessive production of reactive oxygen species. Our objective was to analyze changes in antioxidant metabolism during *Senna macranthera* seed germination after stress caused by fire, gaseous (by smoking) and liquid smoke (by pyrolygneous acid -PA). Analyzes of the activity of SOD, APX, CAT and POX enzymes were carried out. The methodology applied for APX did not work in this species. SOD activity showed a significant increase in seeds after exposure to eucalyptus PA at a concentration of 1:75 and exposure to fire. CAT and POX activities were reduced after soaking in angico PA (F2- 1:50 and 1:100) and smoke. Exposure to gaseous smoke reduced the activity of all antioxidant enzymes, indicating that of the stresses tested, this one is more harmful for *S. macranthera* germination. The POX enzyme can act as a cell wall stress signaling molecule in *S. macranthera*, more studies are needed.

1. Introdução

Senna macranthera (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica e Cerrado (Lorenzi, 2021). Árvore de porte médio, pioneira muito útil na recuperação de áreas degradadas e na arborização. É considerada uma espécie indicadora de biodiversidade em planos de manejo. Possui sementes ortodoxas, pequenas e com dormência física superada por escarificação mecânica ou química (Ferreira et al., 2004). A faixa de

temperatura para a germinação da *S. macranthera* está entre 9 e 39 °C (Cassaro-Silva, 2001) e uma vez superada a dormência, as sementes germinam em até sete dias com mais de 90% de germinação (Ferreira et al., 2004). A rápida germinação é vantajosa uma vez que permite a colonização da área em menor tempo e aumenta as vantagens na competição com outras espécies (De Luis et al., 2008; Sparg et al., 2005). Sendo assim, espécies cuja germinação seja estimulada pelo fogo (calor danificando o tegumento ou efeitos químicos da fumaça) possuirão vantagem sobre as demais no estabelecimento no ambiente após a ocorrência de um incêndio.

Seu habitat natural, o Cerrado, é considerado um *hotpost* de biodiversidade e as espécies desse ecossistema estão adaptadas a um regime definido de queima (Miranda et al., 2010). Porém, a frequência e época de ocorrência do fogo nesse bioma vem sendo ameaçado por incêndios florestais recorrentes (Myers et al., 2000; Silva et al., 2006). Isso resulta em um desequilíbrio entre os episódios de fogo e a recuperação da floresta, o que leva a fragmentação da paisagem e sua degradação (Alcañiz et al., 2018). As novas clareiras causadas pelos incêndios no Cerrado geralmente proporcionam mudanças no microclima, com aumento das flutuações diárias de temperatura pós-fogo (Fidelis e Blanco, 2014; Daibes et al., 2018), o que também pode levar à quebra de dormência em algumas espécies (Santana et al., 2013; Daibes et al., 2017) e mudanças da fitossociologia (Daibes et al., 2018).

A germinação das sementes começa com a absorção de água e termina com a emergência da raiz primária (PR) através dos tecidos da semente (Bewley e Black., 2013), e é uma consequência da interação competitiva entre o potencial de crescimento do embrião (EGP) e a força mecânica limitante dos tecidos de seu entorno (Zhang et al., 2014). É amplamente aceito que durante a germinação da semente tanto o alongamento da PR e o enfraquecimento da EGP requerem afrouxamento da parede celular por hidrolases de parede e/ou transglicosilases, um processo referido como um mecanismo enzimático.

Durante a germinação diversos processos metabólicos ocorrem, de forma que pode haver a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres, como oxigênio singleto ($1O_2$), superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou radical hidroxila ($\cdot OH$), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que não é um radical livre (Bailly, 2019). O peróxido de hidrogênio é considerado a principal ERO envolvida na sinalização celular, pois é bastante estável e em condições celulares e é capaz de atravessar membranas biológicas (Petrov e Van Breusegem, 2012). Embora as EROs tenham propriedades químicas distintas, todas elas são altamente reativas e podem causar danos a outras biomoléculas. O estresse oxidativo em geral, ocorre quando há estresses bióticos e abióticos e pode levar à morte celular (Demidchik, 2015). No entanto as EROs também são reconhecidas

como importantes intermediários de sinalização em uma ampla gama de respostas das plantas e como reguladores do desenvolvimento (Waszczak et al., 2018; Mittler, 2017).

A germinação pós fogo pode ser desencadeada por diferentes mecanismos, sendo o calor e a fumaça os principais propulsores (Keeley e Fotheringham, 2000; Van Staden et al., 2000). Os estudos sobre a germinação estimulada pelo fogo concentraram-se no papel do calor na quebra de dormência das sementes (Sweeney, 1956; Mott e McKeon, 1979; Jefferey et al., 1988; Trabaud e Oustric, 1989a; Trabaud e Oustric, 1989b), e da fumaça estimulando a germinação de sementes e o crescimento das plântulas (Light et al., 2009; Tormo et al., 2014; Çatav et al., 2018). Sendo esta, rica em compostos químicos (por exemplo, butenolídeos e compostos nitrogenados), substâncias conhecidas por estimular a germinação em sementes de espécies de uma ampla gama de famílias de plantas de ecossistemas propensos ou não ao fogo (Ghebrehiwot et al., 2008; Nelson et al., 2012; Downes et al., 2014; Keeley e Pausas, 2018). Porém, sua utilização depende de fatores como material vegetal (Ferraz et al., 2013; Stirk et al., 2016) e concentração da solução (Minorsky, 2000; Arruda et al., 2012), uma vez que a fumaça também é conhecida por ter um efeito tóxico, inibindo a germinação em altas concentrações (Light et al., 2002).

As plantas possuem um sistema de defesa bem desenvolvido, que envolve a limitação da formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e sua remoção (Alscher et al., 2002). Nos últimos anos, muita ênfase tem sido dada ao papel das EROs relacionadas na função da planta, devido ao seu desempenho no controle de processos como crescimento, desenvolvimento e, principalmente, respostas a estímulos ambientais bióticos e abióticos (Smirnoff e Arnoud, 2019). Os membros da família EROs incluem radicais livres, como O_2 e $OH\bullet$, bem como não radicais, como H_2O_2 e O_2 . As plantas produzem EROs principalmente no cloroplasto, mitocôndrias e peroxissomos (Halliwell, 2006). Os locais secundários incluem o retículo endoplasmático, a membrana celular, a parede celular e o apoplasto (Das e Roychoudhury, 2014). Embora as EROs atuem como mensageiras secundárias em vários fenômenos fisiológicos importantes, elas também induzem dano oxidativo sob várias condições de estresse ambiental, como salinidade, seca, frio, metais pesados, irradiação UV e assim por diante (Miller et al., 2010). Quando um delicado equilíbrio entre produção e eliminação de EROs é interrompido, acontece perturbação na homeostase celular normal (Bailly, 2019). O dano celular se manifesta como a degradação de biomoléculas como pigmentos, proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA, que culmina na morte celular vegetal (Apel e Hirt, 2004; Foyer e Noctor, 2005).

As plantas desenvolveram uma maquinaria antioxidante eficiente com duas vias: componentes enzimáticos (i) como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), e peroxidase (POX); E não enzimáticos (ii) como ácido ascórbico (AA), glutathiona reduzida (GSH), α -tocoferol, carotenóides, flavonoides entre outros (Das e Roychoudhury, 2014). Essas duas vias trabalham juntas para eliminar EROs. De acordo com Jeevan Kumar et al. (2015) os estádios de dessecação e hidratação das sementes exigem que a produção e acumulação de EROs sejam rigorosamente controladas para garantir sua sobrevivência. Dentre as enzimas do sistema antioxidante, a SOD é a primeira a atuar, realizando a dismutação do radical superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Yao et al., 2012). As enzimas de SOD são produzidas nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e demais células em condições normais e em condições de estresse (Mittler, 2002). Sua atuação não deve ser avaliada individualmente, tendo em vista que o acúmulo de H_2O_2 produzido por ela é tóxico para as células, podendo facilmente permear-se pelas membranas (Meloni et al., 2003). Portanto, é necessário que sua atividade seja sincronizada com a de outras enzimas, como por exemplo a catalase (CAT) e a peroxidase (POX) que liberaram H_2O_2 através dos peroxissomos (Smirnoff e Arnoud, 2018), e possuem papel na degradação das reservas de armazenamento e na proteção contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (Bailly et al., 2019).

Diante da baixa quantidade de estudos relacionados ao metabolismo antioxidante de *Senna macranthera* e sua importância na composição da flora nativa, alguns questionamentos se fazem relevantes para melhor entender a ecologia dessa espécie mediante os diferentes estresses aos quais ela pode ser exposta. Para isso, testamos a germinação das sementes de *S. macranthera* após exposição ao fogo (calor), fumaça gasosa (por defumação) e líquida (utilizando ácido pirolenhoso - PA, um subproduto do carvão vegetal), a fim de responder as seguintes questões: (1) Como o sistema enzimático antioxidante (SEA) das sementes é alterado após exposição ao fogo e à fumaça? (2) Como o SEA das sementes é alterado após exposição ao PA de eucalipto? (3) Como o SEA das sementes é alterado após exposição ao PA de angico.

2. Material e métodos

2.1 Procedência das sementes

As sementes de *Senna macranthera* foram coletadas de duas árvores matrizes no Campus da Universidade Federal de Viçosa - UFV (20°45'14" S 42°52'54" W), em 2019 pela Sociedade de Investigação Florestal - SIF e doadas ao Departamento de Engenharia Florestal da UFV. Três quilos de sementes (cada quilo contendo entre 20 e 28 mil sementes) foram coletados e armazenados por um ano em sacos de plástico em câmara fria a 5 °C no Laboratório de Análise de Sementes Florestais da UFV de acordo com Brasil (2013), até o início dos testes. O teor de água inicial e a viabilidade do lote foram determinados de acordo com as Regras para Análise de Sementes Florestais do Brasil - RAS (Brasil, 2013). O desponte lateral para a quebra de dormência das sementes foi adotado no tratamento controle, e o teste de germinação realizado com 400 sementes, em quatro repetições de 100 sementes cada, ao final de sete dias a porcentagem de germinação foi quantificada (Tabela 1).

2.2 Exposição das sementes ao fogo e fumaças

Cem (100) sementes despontadas foram dispostas em areia na profundidade de cinco centímetros. Galhos e folhas secas de palmeiras foram utilizados como material combustível e o fogo foi aplicado com duração de 10 minutos com temperatura final de 63.5 °C (Tabela 1). Para a defumação (fumaça gasosa), as sementes foram dispostas em grades no alto de uma chaminé improvisada em um tambor de ferro. A fumaça gerada no interior deste tambor se deu pela queima de feno e durou dois minutos com a temperatura final de 64.3 °C (Tabela 1). As temperaturas foram aferidas com auxílio do termopar digital Minipa MT-600.

O teste de embebição em fumaça líquida se deu pela utilização de ácidos pirolenhosos (PA) de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), e angico (*Adenantha macrocarpa*). Foi realizado um ensaio preliminar com estes PAs, que foram produzidos pela combustão da madeira em mufla sob quatro temperaturas para eucalipto (100, 200, 300 e 400 °C), e cinco para angico (250, 300, 350, 400, 450 °C). As temperaturas foram estabelecidas de acordo com a mudança de coloração do extrato obtido. Os extratos coletados das fumaças geradas em cada temperatura foram diluídos em seis proporções (1:10, 1:25, 1:50, 1:75, 1:100 e 1:1000). Mereceram atenção o PA de eucalipto produzido a partir da combustão da madeira a 200 °C (Fase 2) e os PAs de angico das Fases 2 e 3 (300 e 350 °C, respectivamente). Quando diluídos na proporção de 1 mL de PA para 50, 75 e 100 mL de água destilada, desencadearam mudanças significativas na performance germinativa das sementes, e portanto escolhidos para este experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos tratamentos testados em sementes de *Senna macranthera*

	TRATAMENTO	Resultados de bioensaios preliminares *	Elemento estressante
1	Sementes secas	-	Nenhum - Controle
2	Embebição em água destilada (testemunha)	96.2 a – Alta %G	Nenhum - Controle
3	Fogo em sementes despontadas enterradas, posteriormente embebidas em água destilada	73.7 b - Alta %G	Fogo
4	Fumaça em sementes inteiras, posteriormente embebidas em água destilada	0 %G	Fumaça gasosa
5	Embebição em PA de eucalipto F2-1:50	35.0 c - Baixa %G	Fumaça líquida
6	Embebição em PA eucalipto F2-1:75	4.9 b – Alto IVG	Fumaça líquida
7	Embebição em PA eucalipto F2-1:100	97.7 a – Alta %G	Fumaça líquida
8	Embebição em PA angico F2-1:50	0.9 c - Baixo IVG	Fumaça líquida
9	Embebição em PA angico F2-1:100	46.2 c - Baixa %G	Fumaça líquida
10	Embebição em PA angico F3-1:100	73.7 b - Alta %G	Fumaça líquida

*G%: porcentagem de raízes emitidas após sete dias, em condições de laboratório (dados não mostrados). IVG: Índice de Velocidade de Germinação (Maguire, 1962)

Letras diferentes nas colunas indicam que há diferença entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p < 0.05$)

2.3 Ensaios enzimáticos

Na avaliação da atividade enzimática, após a aplicação do fogo ou fumaça nas sementes, essas foram desinfestadas com Captan® (1%) por 2 minutos. Cinquenta sementes de cada tratamento foram dispostas em placas de Petri com tampa, sobre duas camadas de papel

filtro específico para germinação, previamente desinfestados por 12h em estufa a 40 °C. As sementes foram embebidas em água destilada ou ácido pirolenhoso, conforme o tratamento (Tabela 1) e incubadas em câmara de germinação do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand), com temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro. Após 36 horas foram retirados cotilédones inteiros de 30 sementes, que foram congelados em nitrogênio líquido, liofilizados e armazenados em freezer (-20°C), até o momento das análises.

Os extratos enzimáticos usados para determinar as atividades da superóxido dismutase (SOD), do ascorbato peroxidase (APX), da catalase (CAT) e da peroxidase (POX), foram obtidos pelo método descrito por [Hodges \(1997\)](#) com adaptações. Amostras de 100 mg dos cotilédones foram pesadas, maceradas e homogeneizadas com 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 e 1% (m/v) polyninylpolypyrrolidona (PVPP). Este extrato foi centrifugado a 14.000 RPM por 20 min a 4 °C e o sobrenadante coletado foi usado como extrato enzimático. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4 °C.

Atividade da SOD: A atividade da superóxido dismutase foi determinada pelo ensaio contendo 50 µL do extrato enzimático bruto e 2,95 mL de um meio de reação constituído de 1500 µL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,5, 780 µL de metionina 50 mM, 225 µL de azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 1 mM, 60 µL de EDTA 5 mM, 60 µL de riboflavina 2 µM e 325 µL de água destilada (adaptado de Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C em câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após cinco minutos de exposição à luz, a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm. A leitura obtida em 560 nm foi subtraída da amostra que recebeu iluminação ([Giannopolitis e Ries, 1977](#)). O controle foi determinado sob as mesmas condições citadas anteriormente, porém mantendo a reação no escuro. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT ([Beauchamp e Fridovich, 1971](#)).

Atividade da APX: A atividade da ascorbato peroxidase foi determinada pelo ensaio contendo 50 µL do extrato enzimático bruto e 2,95 mL de um meio de reação constituído de 1900 µL de tampão de fosfato 50 mM, pH 7,8, 200 µL de ácido ascórbico 0,25 mM contendo EDTA 0,1 mM, 100 µL de H₂O₂ 0,3 mM e 640 µL de água destilada. O decréscimo na absorbância a 290 nm, à temperatura de 25 °C, foi medido durante dois minutos com intervalo de 10 segundos entre cada leitura, sendo a atividade da APX determinada com base na inclinação da reta após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ ([Nakano e Asada, 1981](#)). Uma unidade de

atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 nmol de substrato em produto por minuto, por mL, nas condições do ensaio.

Atividade da CAT: A atividade da catalase foi determinada pelo ensaio contendo 30 μL do extrato enzimático bruto e 2970 μL de um meio de reação constituído de 1500 μL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,8, 500 μL de H_2O_2 0,97 M e 950 de água destilada μL (adaptado de Hodges, 1997). O decréscimo na absorbância a 240 nm, à temperatura de 25 °C foi medido durante dois minutos de reação a cada 10 s, sendo a atividade da CAT determinada com base na inclinação da reta após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 mmol de substrato em produto por minuto, por mL, nas condições do ensaio.

Atividade da POX: A atividade da peroxidase de fenóis (POX) foi determinada conforme Kar & Mishra (1976). Aliquotas de 50 μL do extrato foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0.82 mL de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), 600 μL de ácido pirogálico 100 mM, 600 μL de H_2O_2 20 mM e 930 μL de água destilada. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 1 min e a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de H_2SO_4 0,5% (v/v). Em seguida, as leituras foram realizadas a 420 nm e a atividade de POX foi expressa em nmol purpurogalina $\text{g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$.

2.4 Análise dos dados

As atividades enzimáticas foram expressas em atividade específica (SOD - $\text{U SOD min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$; APX - $\text{nmol ASC min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$; CAT- $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$) e POX- $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1}$). A concentração de proteínas para todas as amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se uma curva-padrão construída com albumina sérica bovina (BSA), de 2,5 a 50 μg de proteína. Todas as análises enzimáticas e de proteínas de cada tratamento foram repetidas cinco vezes com duas replicatas. A Análise de Variância - ANOVA foi aplicada para comparar as médias de germinação e índice de velocidade de germinação das sementes, calculado de acordo com Maguire (1962). O teste de Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para registrar a diferença entre as médias utilizando o programa SISVAR 5.6 (Ferreira, 2019).

3. Resultados

Houve alterações enzimáticas em todos os tratamentos, porém em nenhum deles a metodologia aplicada para análise da atividade da APX funcionou, de modo que para *S. macranthera* a quantificação da atividade dessa enzima não foi possível com a metodologia testada. Os estresses causados pela exposição ao fogo e fumaça gasosa desencadearam nas sementes diferentes performances do sistema antioxidante (Figura 1). As atividades da SOD apresentaram aumento significativo após exposição ao fogo em sementes enterradas quando comparadas com o controle e fumaça, enquanto as atividades da CAT reduziram, e as da POX mantiveram-se estáveis (Figuras 1-A, 1-B e 1-C, respectivamente). Apesar da mesma temperatura alcançada em ambos os tratamentos utilizando fogo ou fumaça (± 65 °C), no caso de sementes defumadas, houve baixa atividade de todas as enzimas testadas, sendo significativas na CAT e POX (Figura 1).

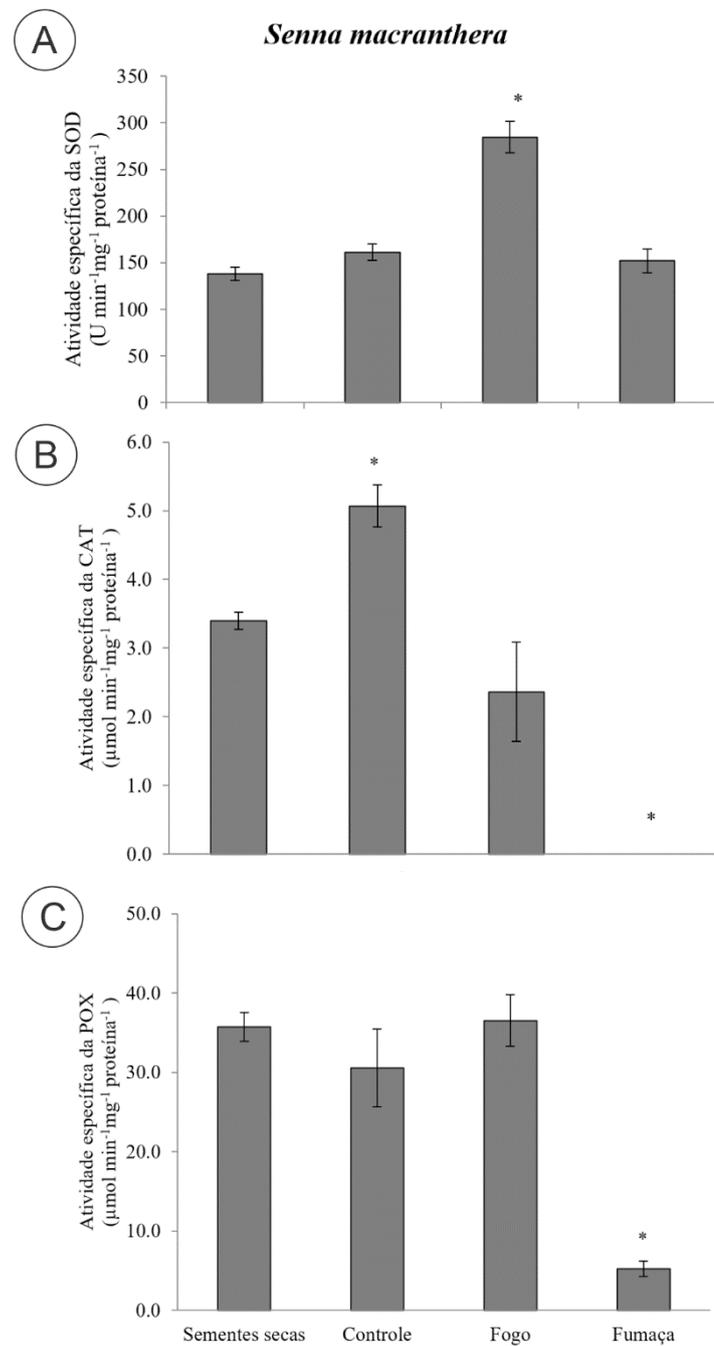


Figura 1. Atividades específicas das enzimas: superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e peroxidase (POX) (C) em cotilédones de sementes de *Senna macranthera* durante o período de germinação, sob efeito da exposição ao fogo e fumaça. * diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p < 0,05$), $n = 4 \pm sd$

No caso das sementes embebidas com ácido pirolenhoso de eucalipto, as atividades da SOD variaram principalmente com a concentração do extrato, apresentando aumento significativo após PA de eucalipto na concentração 1:75 (Figura 2-A). Por outro lado, as atividades da CAT e POX mantiveram-se estáveis independente da dose (Figuras 2-B e 2-C, respectivamente).

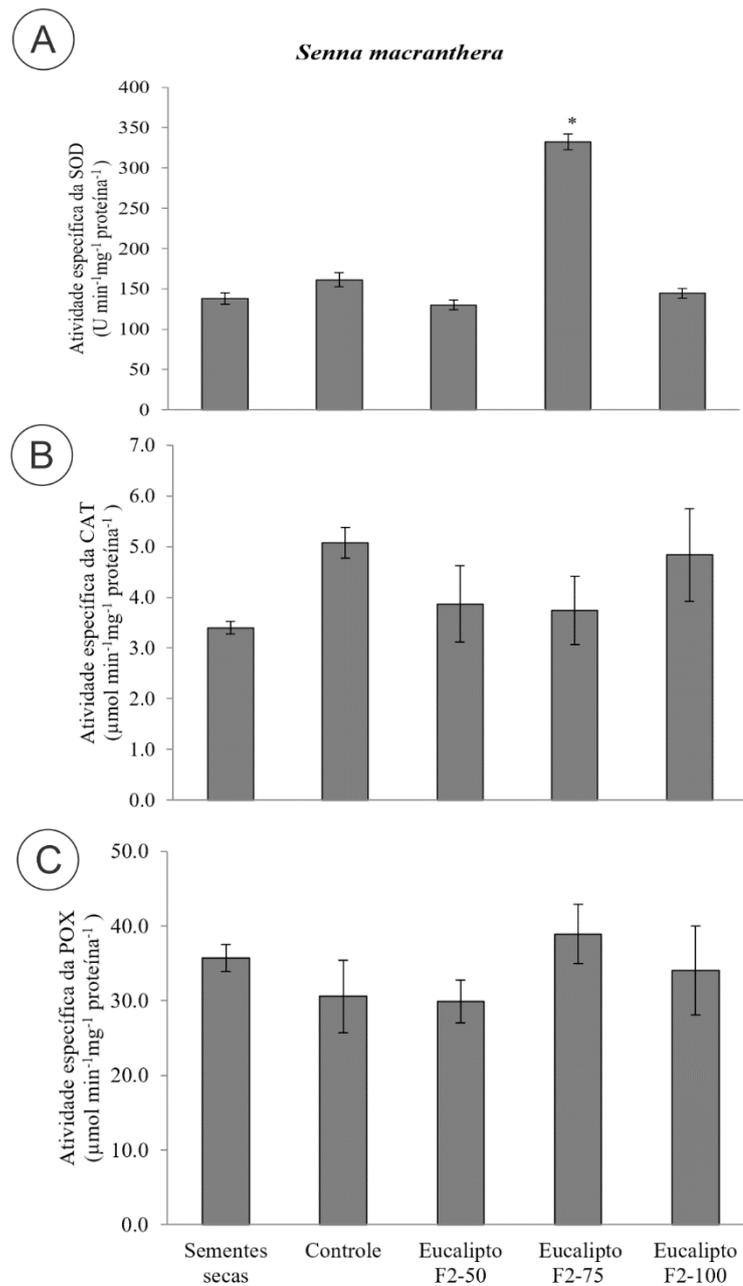


Figura 2. Atividades específicas das enzimas: superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e peroxidase (POX) (C) em cotilédones de sementes de *Senna macranthera* durante o

período de germinação, após embebição em ácido pirolenhoso de eucalipto em diferentes concentrações. * diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p < 0,05$), $n = 4 \pm sd$

As atividades do sistema antioxidante das sementes após embebição com ácido pirolenhoso de angico também dependeram da concentração do extrato. As atividades de SOD foram semelhantes nas sementes expostas ao PA de angico nas duas fases de carbonização (Figura 3-A). Por outro lado, as atividades da CAT reduziram nas sementes embebidas com o PA mais concentrado (1:50) (Figura 3-B). E as da POX aumentaram após angico da fase 3 e reduziram após o da fase 2 nas duas concentrações (Figuras 3-C).

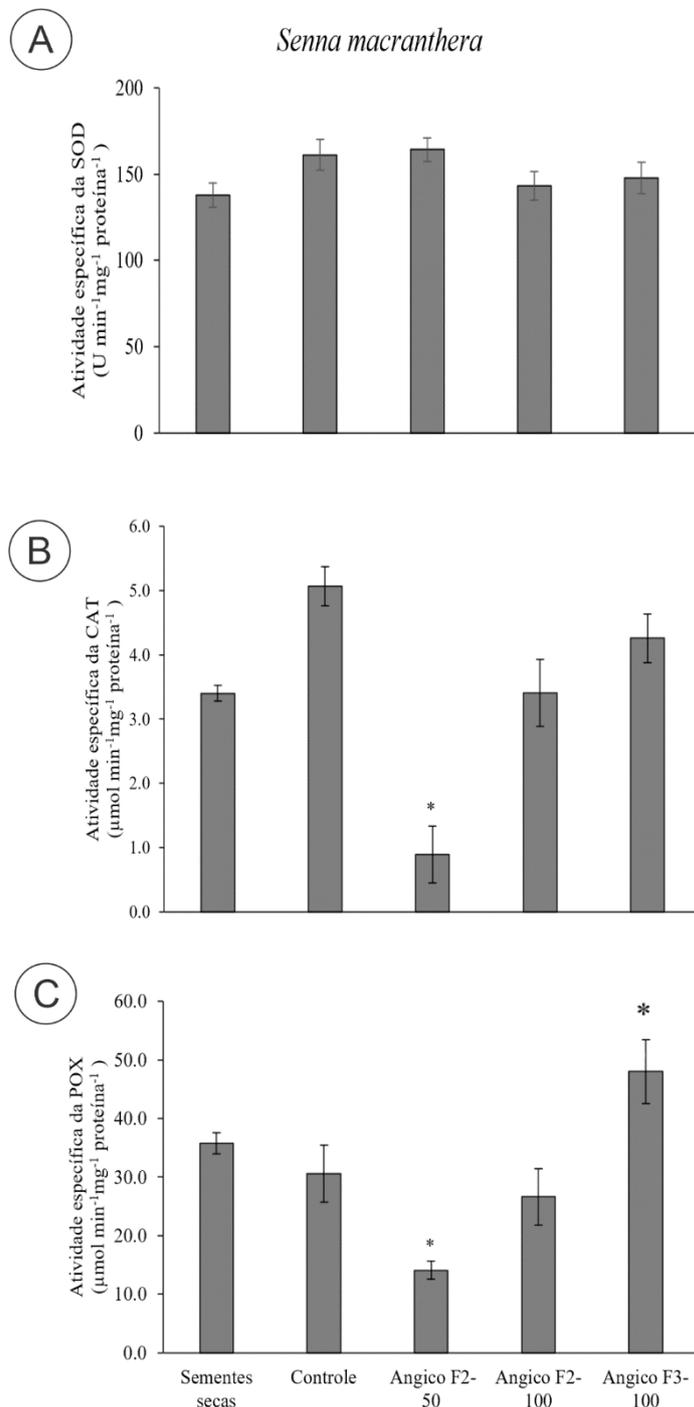


Figura 3. Atividades específicas das enzimas: superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e peroxidase (POX) (C) em cotilédones de sementes de *Senna macranthera* durante o período de germinação, sob efeito da exposição ao ácido pirolenhoso de angico em duas fases de carbonização. * diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p < 0,05$), $n = 4 \pm sd$

De um modo geral, quando comparamos todos os tratamentos juntos, os maiores valores de atividade da SOD ocorreram nas sementes submetidas ao fogo ou embebidas em PA de eucalipto (Tabela 2). Os demais tratamentos apresentaram decréscimo nessa atividade (Tabela 2). A maior atividade da CAT também ocorreu nas sementes embebidas em PA de eucalipto, no entanto isso variou com a concentração utilizada, sendo maior na de 1:100 e reduzindo nas de 1:75 e 1:50 (Tabela 2). Sementes defumadas ou embebidas em PA de angico da fase 2 apresentaram as menores atividades de CAT e POX (Tabela 2). Porém, sementes embebidas em PA de angico da fase de 350°C na concentração de 1:100 apresentaram maior atividade de POX (Tabela 2).

Tabela 2. Análise do sistema enzimático antioxidante de sementes de *Senna macranthera* submetidas a tratamentos com fogo e fumaças

TRATAMENTO	G (%)	SOD	CAT	POX
Sementes secas	0 c	137,99 b	3,40 bc	35,73 ab
Controle	96.2 a	161,18 b	5,06 a	30,56 b
Fogo em sementes enterradas	73.7 a	284,77 a	2,36 cd	36,52 ab
Fumaça	0 c	151,96 b	0 e	5,29 c
Eucalipto F2-50	35.0 b	130,17 b	3,86 bc	29,89 b
Eucalipto F2-175	85.0 a	332,22 a	3,45 bc	38,92 ab
Eucalipto F2-100	97.7 a	137,68 b	4,18 a	34,02 b
Angico F2-50	26.2 b	164,11 b	0,89 de	14,06 c
Angico F2-100	46.2 b	143,18 b	3,40 bc	26,61 b
Angico F3-100	73.7 a	147,70 b	4,25 a	48,00 a

Letras iguais na coluna identificam que não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

4. Discussão

Os incêndios florestais destroem milhares de hectares de florestas do Cerrado todos os anos, e sua recuperação é lenta e desuniforme (Myers et al., 2000; Silva et al., 2006). Compreender os processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na dinâmica da recuperação de plantas piroendêmicas após episódios de incêndios, pode auxiliar em planos silviculturais de espécies de interesse. Ao compararmos a performance germinativa das sementes de *Senna macranthera* em cada tratamento testado, percebemos que as alterações enzimáticas nas linhas de defesa aos danos oxidativos seguem um padrão de degradação. Pois os tratamentos utilizando fogo e embebição em ácidos pirolenhosos que foram menos prejudiciais às sementes do que a fumaça gasosa, foram também os que desencadearam as maiores atividades de SOD, CAT e POX (Tabela 2). Esse estudo revelou que a maquinaria antioxidante de *S. macranthera* responde ao estresse de calor, mas só responderá ao estresse da fumaça quando essa for líquida. Apesar da mesma temperatura alcançada em ambos os tratamentos ($\pm 65^{\circ}\text{C}$) com fogo e fumaça, quando defumadas, as sementes apresentaram baixíssima ou nenhuma atividade enzimática antioxidante (Tabela 2). Indicando que para a espécie *S. macranthera* a exposição à fumaça gasosa é muito mais prejudicial para germinação das sementes do que o calor e/ou compostos químicos da fumaça líquida.

Ambientes incendiados apresentam baixa oxigenação, sobretudo onde há mais fumaça (Fidelis e Blanco, 2014; Daibes et al., 2018), e no caso deste estudo, a anoxia, e não a temperatura, pode ter sido o motivo da morte das sementes. A redução do oxigênio prejudica a respiração e desencadeia uma série de processos que culminarão na morte celular. No caso das sementes defumadas, a exposição à fumaça reduziu seu conteúdo de água em pelo menos 6% (Apêndice A). Ao iniciarem a germinação nestas condições, as sementes podem sofrer por danos de embebição, caracterizado por perdas irreparáveis ao sistema de membranas, o que leva à lixiviação de conteúdos celulares, afetando negativamente a germinação (Prodanovic et al., 2007). Quando a estrutura semipermeável da parede celular é destruída, isso resulta em dano à expansão celular. As paredes celulares primárias são compostas principalmente por microfibrilas, hemiceluloses, pectinas e proteínas estruturais (Velasquez et al., 2011; Nguema-Ona et al., 2014; Xiong et al., 2015). As EROs podem contribuir para o afrouxamento da parede celular, e acredita-se que esse mecanismo seja causado pela reticulação dos seus componentes (Kim et al., 2014). Níveis moderados de H_2O_2 são necessários para o crescimento da raiz, porém

em altos níveis inibe a expansão celular e pode ser diretamente tóxico, oxidando DNA, proteínas e metabólitos (Tenhaken, 2015; Kärkönen & Kuchitsu, 2015).

Neste estudo, as atividades da SOD foram maiores nas sementes do controle e nos tratamentos com alta performance germinativa (fogo e PA de eucalipto). E foram reduzindo à medida que o estresse ficou mais letal (fumaça e PAs nas concentrações de 1:75 e 1:50) (Tabela 2). Devido a maior atividade da SOD, espera-se que haja maior concentração de EROs, essa condição se torna apropriada para os melhores resultados de germinação observados, uma vez que o envolvimento das EROs na regulação da germinação de sementes se dá pela carbonilação de proteínas que auxiliam na quebra da dormência (Oracz et al., 2007). Ou seja, há presença de EROs como janela oxidativa para germinação, porém seu excesso, que é prejudicial à célula, é controlado pela ação da SOD. De acordo com Wojtyla et al. (2006) o aumento da atividade de SOD e dos níveis de EROs celular estão envolvidos em muitas etapas da vida das plantas, incluindo a germinação e o desenvolvimento. De acordo com pesquisas relacionadas à germinação em condições de estresse, as enzimas antioxidantes são ativadas apenas quando o nível de EROs excede um determinado valor, a fim de manter a homeostase ERO dentro da janela oxidativa para germinação (Bally, 2019). Quando as sementes germinam em condições de estresse, há uma correlação positiva entre a capacidade de eliminação de ERO por meio de sistemas antioxidantes, como a SOD, e a taxa de germinação. Pesquisas com sementes em condições de estresse demonstraram que as atividades das enzimas antioxidantes das sementes aumentam em resposta a altas temperatura (Liu et al., 2019) e estresse hídrico (Zhou et al., 2018), baixa temperatura (Luo et al., 2019), estresse salino (Guzmam-Murillo, 2013) ou agentes mutagênicos (Zhang, et al., 2018). Um estudo realizado com sementes de *Jatropha curcas* revelou que o aumento da atividade da SOD foi um dos mecanismos para evitar o estresse oxidativo durante a germinação (Cai et al., 2011). E em sementes de *Ceiba pentandra*, a atividade da SOD pode ser desencadeada tanto pelo aumento na produção de EROs quanto contra danos oxidativos (Kiran et al., 2012). No caso do calor provocado pelo fogo, o aumento de temperatura ajuda no rompimento do tegumento das sementes dormentes, facilitando a entrada de água e promovendo a germinação (Baskin e Baskin, 2021). Embora neste estudo as sementes do tratamento com fogo não estivessem dormentes, a exposição ao estresse até certo ponto pode ter sido necessária para ativação da enzima de defesa. No caso de *S. macranthera*, uma árvore nativa de ambiente suscetível a incêndios florestais (Lorenzi, 2021), a alta atividade de SOD pode indicar que essa espécie se defende dos efeitos do calor e fumaça líquida, portanto pode ser menos suscetível à redução nos biomas de origem quando submetidos ao fogo.

O sistema antioxidante funcionou bem nas sementes embebidas com PA de eucalipto (Figuras 2). O PA tem uma química complexa, e é notavelmente rico em compostos bioativos como fenóis, derivados de açúcar, álcoois, alcanos e ácidos orgânicos com ácido acético respondendo por 50% da solução (Grewal et al., 2018; Mathew e Zakaria, 2015; Crepier et al., 2018). Além disso, o PA contém um composto biologicamente ativo chamado butenólido, que pertence a um novo grupo de reguladores de crescimento recentemente conhecido como carriquinólido ou karrinkins (Flematti et al., 2009; Chiwochaet al., 2009). Esses reguladores encontrados em PA já foram relatados por estimular a germinação de sementes, crescimento e desenvolvimento de mudas, e seu mecanismo de sinalização (Ofoe et al., 2022; Dixon et al., 2009; Umehara et al., 2008). Assim, o uso de PA pode melhorar crescimento e desenvolvimento, logo a germinação, por ser um subproduto ambientalmente sustentável da pirólise pode ser utilizado como priming em germinação de sementes, podendo mitigar ações do estresse ambiental (Wang et al., 2019; Liu et al., 2021).

O PA utilizado neste estudo tem em sua composição grandes quantidades de D-alose e hidroxypiridona, que podem ter sido os responsáveis pela germinação das sementes de *S. macranthera* (Bastos et al., 2023 no prelo). Corroborando com pesquisas que indicam que os compostos nitrogenados resultantes da combustão de biomassa podem ter um papel na germinação de plantas com comportamento regenerativo estimulado pela fumaça líquida (Flematti et al., 2011, Downes et al., 2014). D-alose já demonstrou efeito na germinação das sementes e crescimento de plântulas (Kobayashi et al., 2010; Afach et al., 2006). Portanto, percebe-se que a composição do PA é ampla e seus compostos podem agir estimulando a germinação, e em determinadas concentrações inibindo-a. Um mecanismo de estimulação se relaciona à presença de álcoois no PA, este composto já foi relacionado à ativação do ciclo de Krebs e a glicólise para geração de energia durante a germinação e emergência de sementes (Miyoshi e Sato, 1997). Afetando positivamente o alongamento do hipocótilo e da raiz, volume de raízes e massa fresca total de mudas de tomate preparado com PA em comparação com o controle (Ofoe et al., 2022; Ghebrehiwot et al., 2008). Estes mesmos autores relataram que o condicionamento fisiológico de sementes de *Eragrostis tef* (Zucc.) com água-fumaça na concentração de 1:500 por 48 h aumentou a embebição e facilitou a germinação das sementes.

De forma oposta, o PA inibiu o crescimento da raiz por uma via independente da hexoquinase e afetou a doença da mancha bacteriana em *Oriza sativa*, regulando positivamente genes relacionados à defesa (Kano et al., 2013). Em ambas *Arabidopsis* e *O. sativa*, genes relacionados à defesa foram regulados após tratamento com D-alose (Kano et al 2010, Narusaka

et al., 2009). A hidroxipiridona é capaz de inibir ou retardar as reações de oxidação, neutralizando os efeitos prejudiciais da oxidação em tecidos vivos ([Medical Subject Headings](#)). Ambos os compostos encontrados no PA de eucalipto possuem ação antioxidante e podem ter refletido na alta atividade da SOD, CAT e POX das sementes desse tratamento. Além disso, esses resultados superiores de germinação podem estar associados não só aos compostos nitrogenados, mas ao estresse em si causado por estes tratamentos, pois a maior geração de ERO afeta diretamente os polissacarídeos da parede celular e promove o alongamento das células em sementes em germinação. São considerados agentes de afrouxamento da parede celular vegetal que pode clivar diretamente polissacarídeos de parede ([Bally, 2019](#)).

Por outro lado, o PA de angico, principalmente da fase 2 (300 °C), foi o que desencadeou as menores atividades do sistema enzimático antioxidante (Figura 3). As baixas atividades da CAT e POX nesta fase de carbonização pode indicar prejuízo no mecanismo de defesa das sementes aos compostos deletérios do extrato. Este comportamento negativo em relação ao PA e a germinação pode estar relacionado a concentração do PA e os componentes químicos, que apesar de serem estimulantes a germinação, a depender do composto pode inibi-la. Um estudo proteômico realizado por [Wang et al. \(2019\)](#), mostrou que o condicionamento de sementes com 1:900 (v/v) de PA desencadeou desidratação e mecanismos de defesa na raiz de mudas de trigo. O PA de angico, utilizado neste estudo, possui grandes quantidades de compostos fenólicos ([Bastos et al., 2023 no prelo](#)), que atuam na sua maioria como inibidores de crescimento vegetal ([Cardoso, 2004](#)), de forma que a composição e concentração do PA pode afetar também negativamente a germinação e o sistema antioxidante, como as enzimas do metabolismo antioxidante. A catalase é a enzima antioxidante mais eficaz na prevenção de danos celulares e, portanto, no aumento da resistência ao envelhecimento precoce ([Zhang et al., 2004](#)). Assim, o menor nível de atividade da catalase observado nas sementes tratadas com PA de angico mais concentrado (1:50) pode ser devido à redução da capacidade de hidrólise das reservas de armazenamento do endosperma das sementes, embebidos com grande quantidade de compostos fenólicos, o que reduziria a germinação das sementes, evidenciando os efeitos do estresse.

As atividades da POX nas diferentes fases de carbonização do PA de angico (Figura 3 C), também podem ter sido influenciadas pela composição do extrato. (Tetrahydrofuran-2-yl) methanol foi o composto encontrado em maior quantidade no PA de angico fase 3 (350 °C) em comparação com a fase 2 (300 °C) ([Bastos et al 2023 no prelo](#)). Tetrahydrofurano (THF), recentemente foi utilizado como inibidor de fosfodiesterase ([Tang et al., 2021](#)), que são enzimas

que hidrolisam o AMPc (adenosina monofosfato cíclico, um tipo de mensageiro da célula) (Conti e Beavo, 2007). A redução do nível de AMPc (decorrente da degradação) inibe a lipólise, isto é, a quebra de lipídios (Curi et al., 2001). *Senna macranthera* possui sementes cerosas com uma espessa camada lipídica no tegumento (De Paula et al, 2012). Nesse estudo, o fato das sementes dessa espécie apresentarem baixa atividade de POX (14 - 26) quando embebidas com o PA com baixa quantidade de THF (angico F2), mas aumentarem a atividade da POX (46) com o PA com quantidades maiores desse composto (angico F3) pode indicar que a quebra dessa camada lipídica, que favoreceu a embebição e o crescimento da raiz promovido pelo THF, pode ter refletido a alta atividade da POX. A peroxidação lipídica resulta em uma variedade de espécies eletrófilas reativas, que são moléculas sinalizadoras (Sminorf e Armoud, 2019). É possível que a enzima POX esteja localizada na parede celular das sementes de *S. macranthera*, já que sua atividade aumentou quando houve perda de lipídeos nessa estrutura, funcionando como sinalizadora de estresse nesta espécie.

5. Conclusão

Neste estudo fica revelado que, a resistência das sementes de *S. macranthera* aos estresses testados segue uma ordem de degradação, com tolerância ao calor e a embebição em ácidos pirolenhosos. A exposição à fumaça gasosa por dois minutos leva as sementes a um severo estresse oxidativo, no qual apenas a SOD, a primeira linha de defesa, é manifestada. Dos estresses testados, a defumação é a mais prejudicial no metabolismo e funções de sinalização antioxidante de sementes de *S. macranthera*. Em comparação com o controle, as sementes tratadas com fogo e PAs de eucalipto e angico da fase 3 exibem aumento da atividade das principais enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e POX, resultando em níveis reduzidos de peróxido de hidrogênio e peroxidase lipídica, mostrando que os extratos pirolenhosos podem ajudar a regular a homeostase redox. Com relação a atuação da POX como molécula sinalizadora de estresse da parede celular de *S. macranthera*, mais estudos são necessários.

6. Referências Bibliográficas

Afach, G., Kawanami, Y., Kato-Noguchi, H., & Izumori, K. (2006). Practical production of 6-O-octanoyl-D-allose and its biological activity on plant growth. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(8), 2010-2012.

- Alcañiz, M., Outeiro, L., Francos, M., & Úbeda, X. (2018). Effects of prescribed fires on soil properties: A review. *Science of the Total Environment*, 613, 944-957.
- Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1331-1341.
- Anderson, M. D.; Prasad, T. K.; Stewart, C. R. (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 109, p. 1247-1257.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Arruda, Y. M. B. et al. (2012). Sources and concentrations of smoke-water on the seed germination and seedling vigor of tomato. *Horticultura Brasileira*, v. 30, n. 2, p. 293-299.
- Brasil. (2013). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instruções para análise de sementes de espécies florestais, de 17 de janeiro de 2013, Brasília.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2021). The great diversity in kinds of seed dormancy: a revision of the Nikolaeva–Baskin classification system for primary seed dormancy. *Seed Science Research*, 31(4), 249-277.
- Bailly, C. (2019). The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochemical Journal*, 476(20), 3019-3032.
- Beauchamp, C.; Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase improved as says and as say applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 44, p. 276-287.
- Bewley, J. D., & Black, M. (2013). *Seeds: physiology of development and germination*. Springer Science & Business Media.
- Bradford, M. M. (1976). .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.
- Cai, F.; Mei, L.; An, X.; Gao, S.; Tang, L.; Chen, F. (2011). Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. *Journal of Agriculture and Biology*, Oxford, v. 13, p. 25-30,
- Cardoso, V. J. M. (2004). Dormência: estabelecimento do processo, in: Ferreira, A.G., Borghetti, F. (Eds.), *Germinação Do Básico Ao Aplicado*. Artmed, Porto Alegre, p. 323
- Cassaro-Silva, M. (2001). Efeito da temperatura na germinação de sementes de manduirana (*Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn. - CAESALPINIACEAE). *Revista Brasileira de Sementes*, 23(1), 92-99.
- Conti, M., & Beavo, J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 481-511.
- Curi, R., Pompeia, C., Miyasaka, C. K., & Procópio, J. (2001). *Entendendo a gordura: os ácidos graxos*. Barueri, SP: Manole

- Chiwocha, S.D.S., Dixon, K.W., Flematti, G.R., Ghisalberti, E.L., Merritt, D.J., Nelson, D.C., 602 Riseborough, J.-A.M., Smith, S.M., Stevens, J.C. (2009). Karrikins: a new family of plant growth 603 regulators in smoke. *Plant Science*, 177(4), 252-256.
- Crepier, J., Le Masle, A., Charon, N., Albrieux, F., Duchene, P., & Heinisch, S. (2018). Ultra-high performance supercritical fluid chromatography hyphenated to atmospheric pressure chemical ionization high resolution mass spectrometry for the characterization of fast pyrolysis bio-oils. *Journal of Chromatography B*, 1086, 38-46.
- Çatav, Ş.S. et al. (2018). Effect of fire-derived chemicals on germination and seedling growth in Mediterranean plant species. *Basic Applied Ecology*, v. 30, p. 65–75.
- Daibes, L. F., Zupo, T., Silveira, F. A., Fidelis, A. (2017). A field perspective on effects of fire and temperature fluctuation on Cerrado legume seeds. *Seed Science Research*, 27(2), 74-83.
- Daibes, L. F. et al. (2018). Gaps critical for the survival of exposed seeds during Cerrado fires. *Australian Journal of Botany*, v. 66, n. 2, p. 116-123.
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, 2, 53.
- De Luis, M., Raventós, J., Wiegand, T., Carlos González-Hidalgo, J. (2008). Temporal and spatial differentiation in seedling emergence may promote species coexistence in Mediterranean fire-prone ecosystems. *Ecography*, 31(5), 620-629.
- Demidchik, V. (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.* 109, 212–228 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- De Paula, A. S., Delgado, C. M. L., Paulilo, M. T. S., Santos, M. (2012). Breaking physical dormancy of *Cassia leptophylla* and *Senna macranthera* (Fabaceae: Caesalpinioideae) seeds: water absorption and alternating temperatures. *Seed Science Research*, 22(4), 259-267.
- Dixon, K.W., Merritt, D.J., Flematti, G.R., Ghisalberti, E.L. (2009). Karrikinolide—a phytoreactive 608 compound derived from smoke with applications in horticulture, ecological restoration and 609 agriculture. *Acta Horticulturae*, 813, 155-170.
- Downes, K. S., Light, M. E., Pošta, M., Kohout, L., van Staden, J. (2014). Do fire-related cues, including smoke-water, karrikinolide, glyconitrile and nitrate, stimulate the germination of 17 Anigozanthos taxa and *Blancoa canescens* (Haemodoraceae)? *Australian Journal of Botany*, 62(4), 347-358.
- Ferraz, I. D. K. et al. (2013). Smoke-water effect on the germination of Amazonian tree species. *South African Journal of Botany*, 87, 122-128.
- Ferreira, R. A., Davide, A. C., Motta, M. S. (2004). Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. e *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn.; num banco de sementes em solo de viveiro. *Revista Brasileira de Sementes*, 26(1), 24-31.
- Ferreira, D.F. (2019). SISVAR: A Computer Analysis System to Fixed Effects Split Plot Type Designs. *Revista Brasileira de Biometria*, 37(4), 529-535.
- Fidelis, A., Blanco, C. (2014). Does fire induce flowering in Brazilian subtropical grasslands?. *Applied Vegetation Science*, 17(4), 690-699.

- Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Trengove, R. D. (2009). Identification of alkyl substituted 2 H-furo [2, 3-c] pyran-2-ones as germination stimulants present in smoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9475-9480.
- Flematti, G. R., Merritt, D. J., Piggott, M. J., Trengove, R. D., Smith, S. M., Dixon, K. W., & Ghisalberti, E. L. (2011). Burning vegetation produces cyanohydrins that liberate cyanide and stimulate seed germination. *Nature Communications*, 2(1), 1-6.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The plant cell*, 17(7), 1866-1875.
- Ghebrehiwot, H. M., Kulkarni, M. G., Kirkman, K. P., Van Staden, J. (2008). Smoke-Water and a Smoke-Isolated Butenolide Improve Germination and Seedling Vigour of *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter under High Temperature and Low Osmotic Potential. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(4), 270-277.
- Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I, occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 59, p. 309-314.
- Grewal, A., Abbey, L., & Gunupuru, L. R. (2018). Production, prospects and potential application of pyrolygneous acid in agriculture. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 135, 152-159.
- Guzmán-Murillo, M. A., Ascencio, F., & Larrinaga-Mayoral, J. A. (2013). Germination and ROS detoxification in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) under NaCl stress and treatment with microalgae extracts. *Protoplasma*, 250, 33-42.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
- Hodges, D. M.; Andrews, C. J.; Johnson, D. A.; Hamilton, R. I. (1997). Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 48, n. 310, p. 1105-1113,
- Jeevan Kumar, S. P., Rajendra Prasad, S., Banerjee, R., & Thammineni, C. (2015). Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of botany*, 116(4), 663-668.
- Jeffery, D. J. et al. (1988). Effects of dry heat on seed germination in selected indigenous and alien legume species in South Africa. *South African Journal of Botany*, 54(1), 28-34.
- Kano A, Gomi K, Yamasaki-Kokudo, et al. (2010). A rare sugar, d-allose, confers resistance to rice bacterial blight with upregulation of defense-related genes in *Oryza sativa*. *Phytopathology* 100, 85–90
- Kano, A., Fukumoto, T., Ohtani, K., Yoshihara, A., Ohara, T., Tajima, S., ... & Akimitsu, K. (2013). The rare sugar D-allose acts as a triggering molecule of rice defence via ROS generation. *Journal of experimental botany*, 64(16), 4939-4951
- Kar, M.; Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, v.57, p.315-319.

- Kärkönen, A., & Kuchitsu, K. (2015). Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry*, 112, 22-32
- Keeley, J. E.; Fotheringham, C. J. (2000). Role of fire in regeneration from seed. *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*, 2, 311-330.
- Keeley, J. E., Pausas, J. G. (2018). Evolution of ‘smoke’induced seed germination in pyroendemic plants. *South African Journal of Botany*, 115, 251-255.
- Kiran, C. R.; Rao, D. B.; Sirisha, N.; Rao, T. R. (2012). Impact of Germination on Biochemical and Antioxidant Enzymes of *Ceiba pentandra* (Kapok) Seeds. *American Journal of Plant Sciences*, v. 3, n. 09, p. 1187,
- Kim, J. H., Lee, Y., Kim, E. J., Gu, S., Sohn, E. J., Seo, Y. S., & Chang, Y. S. (2014). Exposure of iron nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* enhances root elongation by triggering cell wall loosening. *Environmental science & technology*, 48(6), 3477-3485.
- Kobayashi, M., Ueda, M., Furumoto, T., & Kawanami, Y. (2010). Retarding activity of 6-O-acetyl-D-alloses against plant growth. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(1), 216-217
- Lorenzi, H. (2021). *Árvores Brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, Insitituto Plantarum, V. 3, 3ªEd, Nova Odessa.
- Light, M. E. et al. (2009). Smoke-derived butenolide: towards understanding its biological effects. *South African Journal of Botany*, 75(1), 1-7.
- Liu, X., Zhan, Y., Li, X., Li, Y., Feng, X., Bagavathiannan, M., Zhang, C., Qu, M., Yu, J. (2021). The use of wood vinegar as a non-synthetic herbicide for control of broadleaf weeds. *Industrial Crops and Products*, 173, 114105. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114105>
- Luo, T., Xian, M., Zhang, C., Zhang, C., Hu, L., & Xu, Z. (2019). Associating transcriptional regulation for rapid germination of rapeseed (*Brassica napus* L.) under low temperature stress through weighted gene co-expression network analysis. *Scientific Reports*, 9(1), 55.
- Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. U. L. T. A. N., & Mittler, R. O. N. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4), 453-467.
- Minorsky, P. V. (2002) .The hot and the classic. *Plant Physiology*, 130(2), 517.
- Mott, J. J.; Mckeon, G. M. (1979).Effect of heat treatments in breaking hardseededness in four species of *Stylosanthes*. *Seed Science and Technology*, 7(1), 15-25.
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2, 176-177.
- Mathew, S., & Zakaria, Z. A. (2015). Pyroligneous acid—the smoky acidic liquid from plant biomass. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 611-622.
- Medical Subject Headings (MeSH). <https://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>
- Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martinez, C. A., & Cambraia, J. (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and experimental botany*, 49(1), 69-76.

- Miranda, H. S. (2010). Efeitos do regime do fogo sobre a estrutura de comunidades de cerrado: Resultados do projeto Fogo. *Brasília-DF, Ibama*.
- Mittler, R. (2002). Estresse oxidativo, antioxidantes e tolerância ao estresse. *Tendências Plant Sci* . 7, 405-410. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9
- Mittler, R. (2017) ROS are good. *Trends Plant Sci*. 22, 11–19 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Miyoshi K, Sato T. (1997). The Effects of Ethanol on the Germination of Seeds of Japonica and Indica Rice (*Oryza sativa*L.) under Anaerobic and Aerobic Conditions. *Annals of Botany*. Apr 1;79(4):391-5.
- Nakano, Y.; Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867- 880.
- Narusaka Y, Narusaka M, Abe H, et al. (2009). High-throughput screening for plant defense activators using a β -glucuronidase reporter gene assay in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* 26, 345–349.
- Nelson, D. C., Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., Smith, S. M. (2012). Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. *Annual review of plant biology*, 63, 107-130.
- Nguema-Ona, E., Vické-Gibouin, M., Gotté, M., Plancot, B., Lerouge, P., Bardor, M., & Driouich, A. (2014). Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Frontiers in plant science*, 5, 499.
- Ofoe, R., Gunupuru, L. R., Qin, D., Thomas, R. H., & Abbey, L. (2022). Pyrolygneous Acid Increases Productivity and Nutritional Quality of Greenhouse Tomato. *Available at SSRN 4027336*.
- Prodanović, O., Prodanović, R., Bogdanović Pristov, J., Mitrović, A., Niilosavić, N., & Radotić, K. (2007). Antioxidative enzymes during germination of two lines of Serbian spruce [*picea omorika* (panc.) purkyae]. *Archives of Biological sciences*, 59(3), 209-216.
- Petrov, V.D. and Van Breusegem, F. (2012) Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB PLANTS* 2012, pls014 <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls014>
- Santana, V. M., Baeza, M. J., Blanes, M. C. (2013). Clarifying the role of fire heat and daily temperature fluctuations as germination cues for Mediterranean Basin obligate seeders. *Annals of botany*, 111(1), 127-134.
- Silva, J. F., Fariñas, M. R., Felfili, J. M., Klink, C. A. (2006). Spatial heterogeneity, land use and conservation in the cerrado region of Brazil. *Journal of biogeography*, 33(3), 536-548.
- Smirnoff, N., & Arnaud, D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221(3), 1197-1214.
- Sparg, S. G., Kulkarni, M. G., Light, M. E., Van Staden, J. (2005). Improving seedling vigour of indigenous medicinal plants with smoke. *Bioresource technology*, 96(12), 1323-1330.

- Stirk, W. A. et al. (2016). Effect of smoke-derived extracts on *Spirodela polyrhiza*, an aquatic plant grown in nutrient-rich and-depleted conditions. *Aquatic Botany*, 129, 31-34.
- Sweeney, J. R. (1956). Responses of vegetation to fire: a study of the herbaceous vegetation following chaparral fires. University of California Press.
- Tang, L., Jiang, J., Song, G., Wang, Y., Zhuang, Z., Tan, Y., ... & Feng, X. (2021). Design, synthesis, and biological evaluation of novel urolithins derivatives as potential phosphodiesterase II inhibitors. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.
- Tenhaken, R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in plant science*, 5, 771.
- Trabaud, L.; Oustric, J. (1989a) Heat requirements for seed germination of three *Cistus* species in the garrigue of southern France. *Flora*, 183(3-4), 321-325.
- Trabaud, L., Oustric, J. (1989b). Comparaison des stratégies de régénération après incendie chez deux espèces de ciste. *Revue d'écologie*.
- Tormo, J. et al. (2014). Field evidence of smoke-stimulated seedling emergence and establishment in Mediterranean Basin flora. *Journal of vegetation science*, 25(3), 771-777.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, et al. (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*. Sep;455(7210):195-200.
- Van Staden J. et al. (2000). Smoke as a germination cue. *Plant Species Biology* 15: 167–178.
- Velasquez, S. M., Ricardi, M. M., Dorosz, J. G., Fernandez, P. V., Nadra, A. D., Pol-Fachin, L., ... & Estevez, J. M. (2011). O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science*, 332(6036), 1401-1403.
- Waszczak, C., Carmody, M. and Kangasjärvi, J. (2018) Reactive oxygen species in plant signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 209–236 [https://doi.org/ 10.1146/annurev-arplant-042817-040322](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322)
- Wang, Y., Qiu, L., Song, Q., Wang, S., Wang, Y., Ge, Y. (2019). Root proteomics reveals the 714 effects of wood vinegar on wheat growth and subsequent tolerance to drought stress. *715 International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 943.
- Wojtyła, Ł.; Garnczarska, M.; Zalewski, T.; Bednarski, W.; Ratajczak, L.; Jurga, S. (2006). A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. *Journal of plant physiology*, v. 163, n. 12, p. 1207-1220,
- Xiong, J., Yang, Y., Fu, G., & Tao, L. (2015). Novel roles of hydrogen peroxide (H₂O₂) in regulating pectin synthesis and demethylesterification in the cell wall of rice (*Oryza sativa*) root tips. *New Phytologist*, 206(1), 118-126.
- Yao, Z.; Liu, L.; Gao, F.; Rampitsch, C.; Reinecke, D. M.; Ozga, J. A.; Ayele, B. T. (2012). Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea. *Journal of Plant Physiology*, v.169, p.1477-1488.
- Zhou, Z. H., Wang, Y., Ye, X. Y., & Li, Z. G. (2018). Signaling molecule hydrogen sulfide improves seed germination and seedling growth of maize (*Zea mays* L.) under high temperature by inducing antioxidant system and osmolyte biosynthesis. *Frontiers in plant science*, 9, 1288.

Zhang, H. J., Doctrow, S. R., Xu, L., Oberley, L. W., Beecher, B., Morrison, J., ... & Kregel, K. C. (2004). Redox modulation of the liver with chronic antioxidant enzyme mimetic treatment prevents age-related oxidative damage associated with environmental stress. *The FASEB journal*, 18(13), 1547-1549.

Zhang, Y., Chen, B., Xu, Z., Shi, Z., Chen, S., Huang, X. & Wang, X. (2014). Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. *Journal of experimental botany*, 65(12), 3189-3200.

Zhang, Y., Shi, H., & Deng, B. (2018). Mutagen-induced phytotoxicity in maize seed germination is dependent on ROS scavenging capacity. *Scientific reports*, 8(1), 14078.

CONCLUSÃO GERAL

Os gatilhos de incêndio florestal que podem levar a quebra de dormência de sementes de *Senna macranthera* são o calor do fogo e a fumaça líquida, não concentrada. No entanto, essa espécie apresenta respostas germinativas diferentes a depender do tipo de gatilho (calor ou fumaça) e das condições do incêndio (tempo de exposição e temperatura, por exemplo). Apesar de *S. macranthera*, quando dormente, apresentar baixa germinação sob fumaça líquida, a resistência a esse estresse indica que a composição química dos extratos é decisiva para a sobrevivência das sementes. A promoção da germinação através da quebra lipídica da parede celular das sementes pode ter sido desencadeada pelo composto TFH, em extratos pirolenhosos (EP) de angico. E a Hidroxipiridona e D-Alose podem ter contribuído para a proteção antioxidante nas sementes embebidas em extrato de eucalipto. A embebição nesses extratos aumenta a atividade das principais enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e POX, resultando em níveis reduzidos de peróxido de hidrogênio e peroxidase lipídica, mostrando que os extratos pirolenhosos podem ajudar a regular a homeostase redox.

Senna macranthera é uma espécie resistente aos efeitos da exposição do calor (~90 °C) e fumaça líquida, e, portanto, menos suscetível à redução nos biomas de origem quando submetidos ao fogo. Entretanto, a exposição dessa espécie à fumaça gasosa por dois minutos leva as sementes a um severo estresse oxidativo, prejudicando o metabolismo e funções de sinalização antioxidante, causado por danos de embebição. Visando a propagação da espécie, este trabalho indica o uso de extrato pirolenhoso de eucalipto (carbonizado a 200 °C) e de angico (carbonizado a 350 °C) no tratamento de sementes de *S. macranthera* nas concentrações de 1:75 e 1:100, como prática silvicultural, com a finalidade de aumentar sua resistência antioxidante. Do ponto de vista fisiológico, é possível que a POX atue na parede celular das sementes reduzindo peróxido, sinalizando dano oxidativo e removendo espécies reativas de oxigênio. E estudos nessa área são encorajados.

APÊNDICE A – BIOENSAIOS PRELIMINARES PARA ANÁLISE DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Senna macranthera* (FEDEGOSO) APÓS EXPOSIÇÃO A EXTRATOS PIROLENHOSOS

Preparação do extrato pirolenhoso (EP)

A carbonização da madeira de eucalipto e angico para elaboração dos extratos foi realizada de acordo com as recomendações do Laboratório de Painéis e Energia da Madeira – LAPEM da UFV, através da pirólise em mufla, utilizando um condensador acoplado a kitassatos para recuperação dos gases condensáveis (extrato pirolenhoso). Após a coleta, os extratos foram diluídos em água e embebidos pelas sementes de fedegoso através de dois métodos, aplicando-se teste de germinação em seguida, conforme descrito mais adiante.

Caracterização das madeiras

Três árvores de *Eucalyptus* spp. cultivadas em espaçamento de 3 x 2 m, com 7 anos de idade, na cidade de Viçosa-MG, foram seccionadas em toretes de 30 cm de comprimento e divididas em classes de diâmetros de 6, 10 e 14 (± 2) cm. Os toretes foram levados para o Laboratório de Painéis e Energia da Madeira - LAPEM da Universidade Federal de Viçosa - UFV, onde retirou-se quatro discos de 2,5 cm de espessura, seccionados em quatro cunhas opostas e em seguida pesados e levados à estufa de secagem à temperatura de 103 ± 2 °C, até massa constante, para determinar o teor de umidade inicial. A densidade básica da madeira foi determinada pelo método de imersão em água, de acordo com a norma NBR 11941 (ABNT, 2003).

A madeira de angico foi recuperada após uma forte chuva que aconteceu no campus da UFV em 2019. O reaproveitamento foi realizado cortando-se a madeira em toretes em dimensões idênticas a do eucalipto para posterior carbonização em mufla.

Pirólise da madeira em mufla

As carbonizações das madeiras foram realizadas em forno elétrico do tipo mufla, modelo *GP Científica-2000*, com controle manual de temperatura. Utilizaram-se amostras de toras de madeira com 30 cm de comprimento, inseridas em um recipiente de aço inoxidável com dimensões nominais de 0,430 x 0,160 x 0,160 m.

A temperatura final e taxa de aquecimento da mufla foram respectivamente, 400 °C a 1,66 °C min⁻¹. Estabeleceu-se que a carbonização fosse finalizada 60 min após todos os termopares atingirem a temperatura de 400 °C para eucalipto e 450 °C (descrito mais adiante). O monitoramento e medidas das temperaturas foram realizados manualmente, em intervalos de 10 minutos.

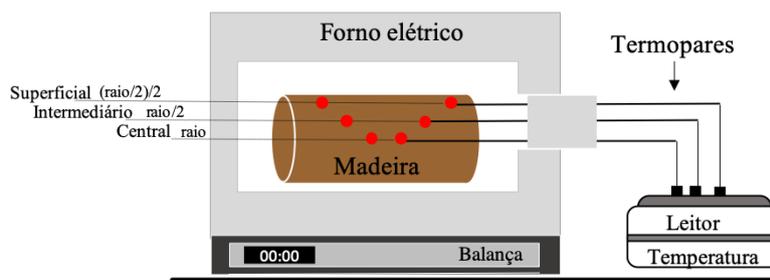


Figura 1. Layout do sistema de carbonização da madeira e acompanhamento da temperatura.

Recuperação dos gases condensáveis

Na saída da mufla foi conectado um sistema de recuperação dos gases condensáveis utilizando um condensador tubular resfriado à água e acoplado aos 2 recipientes de coleta, denominados condensadores (kitassatos). Os gases condensáveis gerados durante a carbonização da madeira foram coletados e quantificados por fase. Cada fase foi caracterizada por um intervalo de temperatura, como indicado anteriormente.

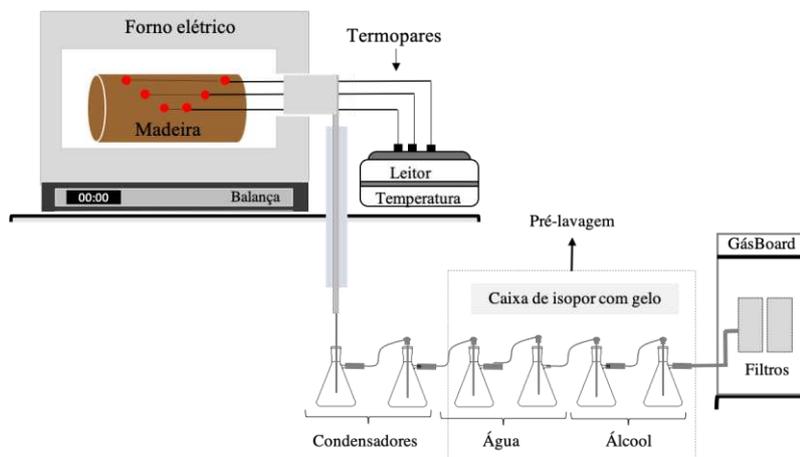


Figura 2. Sistema de recuperação dos gases condensáveis.

Após a recuperação do extrato, o mesmo ficou estagnado por 6 meses para decantação do alcatrão, que é extremamente tóxico, e em recipiente vedado e escuro, para que as substâncias do extrato não reagissem com a luz e se precipitassem.

PRÉ-TESTE 1

O primeiro pré-teste realizado dia 19/11/2019 com a espécie florestal nativa da mata atlântica fedegoso (*S. macranthera*), foi realizado com o objetivo de testar três concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto em quatro fases de carbonização de madeira na germinação das sementes.

As 4 fases de carbonização correspondem às seguintes temperaturas:

- (i) Fase 1 (F1): endotérmica - secagem (25-100°C), onde ocorre a secagem da madeira e retirada da água livre.
- (ii) Fase 2 (F2): endotérmica - decomposição primária (101-200°C), onde ocorre a degradação da hemicelulose.
- (iii) Fase 3 (F3): exotérmica - decomposição secundária (201-300°C), onde ocorre a degradação da celulose.
- (iv) Fase 4 (F4): exotérmica - fixação de carbono (301-400°C), onde ocorre a degradação da lignina, mais celulose e fixação do carbono.

Preparação das concentrações de EP e Quebras de dormência das sementes

Os extratos obtidos em cada fase de carbonização (F1, F2, F3 e F4) foram diluídos em água deionizada nas proporções de 1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v). As soluções foram acondicionadas em recipientes de vidro, identificados e guardados na geladeira com temperatura constante de 5 °C.

As sementes foram submetidas à quebra de dormência de acordo com a Instrução Normativa de 2013 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2013) adaptada, trocando-se o hipoclorito de sódio (NaClO) por ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄), durante 20 minutos, sob agitação constante. Em seguida, foram lavadas por três vezes em água

corrente e colocadas para secar sobre papel toalha por 30 minutos. Todas as sementes foram colocadas em solução de Captan® (0,5%) antes do teste de germinação, por 60s.

Teste de germinação

O teste de germinação foi conduzido em placas de Petri transparente de 9 cm de diâmetro com tampa e semeadura sobre duas folhas de papel germitest®, previamente desinfestado em estufa a 70 °C por 3 horas. Em seguida, os substratos foram umedecidos com 3 ml da diluição ou com água destilada (controle). As placas foram mantidas em câmaras de germinação à temperatura de 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro (Brasil, 2013). O reumedecimento foi realizado com água destilada, quando necessário. As avaliações foram diárias, sendo consideradas germinadas as sementes que tiverem protrusão da raiz primária. O tempo final do teste de germinação foi de 10 dias

Análise estatística

As seguintes variáveis foram calculadas ao final do teste de germinação: Germinação Total (G%), Tempo Médio de Germinação (TMG) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG). O IVG é a soma de sementes germinadas (G_i) na primeira, segunda e última contagem dividida pelo número de dias (D_i) após a semeadura na primeira, segunda e última contagem: $IVG = G_1 / D_1 + G_2 / D_2 \dots + G_{10} / D_{10}$ (Maguire, 1962).

O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições de 20 sementes para em cada tratamento. Os tratamentos foram distribuídos em esquema fatorial 4x4, sendo quatro extratos provenientes das quatro fases de carbonização (F1, F2, F3 e F4) testados nas concentrações 1:10; 1:100; 1:1000 e o tratamento controle (água destilada). As variáveis de germinação total, tempo médio e índice de velocidade de germinação foram analisadas e submetidas ao teste de homogeneidade e normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk e aplicada análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias. Os dados foram analisados em software Sisvar (Ferreira, 2011).

RESULTADOS

A concentração de 1:10 a partir da fase 2 inibiu a germinação de sementes de fedegoso (Figura 3).

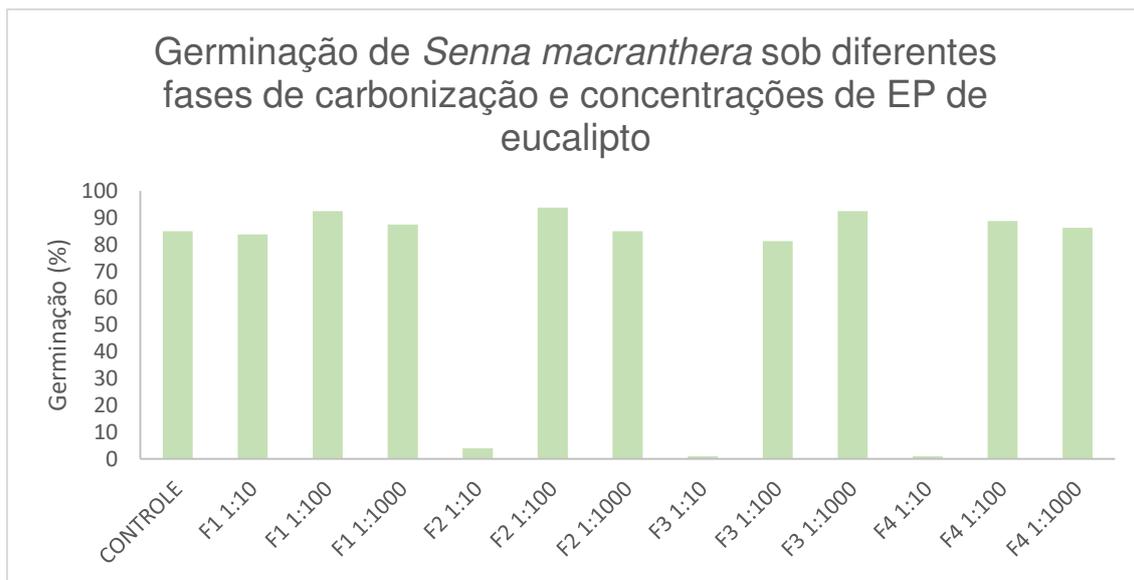


Figura 3. Germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização e concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto.

O tratamento com EP na concentração de 1:100 estimulou a germinação de sementes nas fases 1, 2 e 4 (Figura 4).

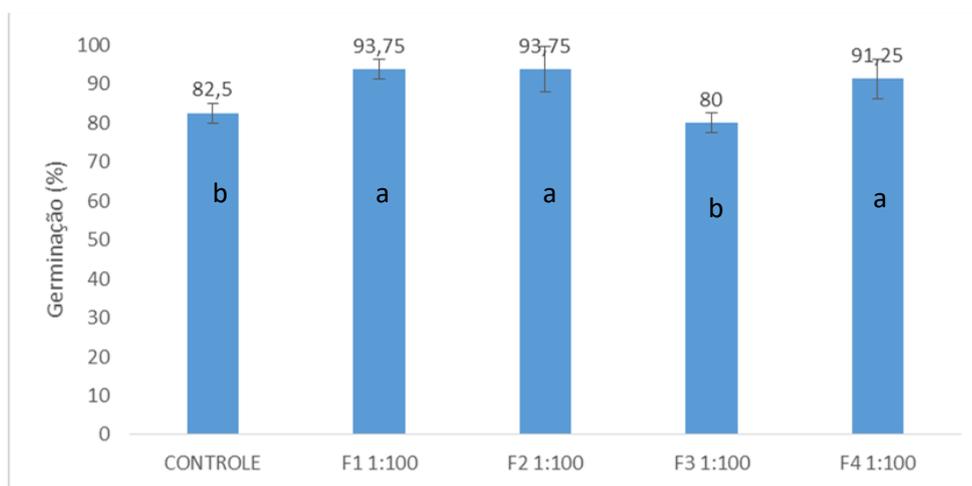


Figura 4. Germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização na concentração de 1:100 de extrato pirolenhoso de eucalipto.

O tratamento com EP na concentração de 1:1000 estimulou a germinação de sementes em todas as fases de carbonização (Figura 5)

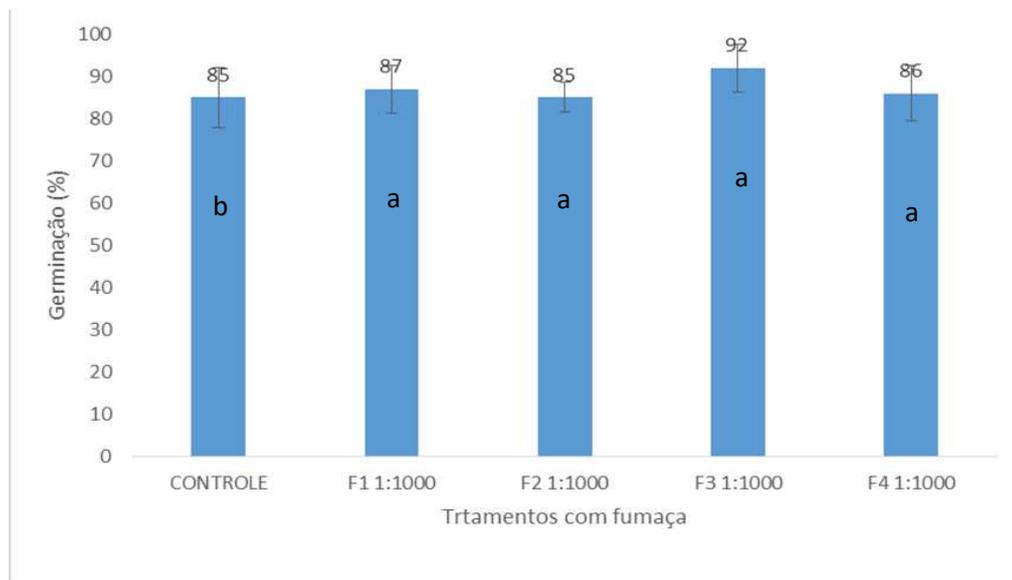


Figura 5. Germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização na concentração de 1:1000 de extrato pirolenhoso de eucalipto.

Seis dias pode ser considerado o tempo final de germinação para fedegoso. Os extratos nas fases 1 e 2 não reduziram o tempo de germinação, no entanto os EPs das fases finais de carbonização (F3 e F4) inibiram o tempo da germinação de sementes em todas as concentrações testadas (Figura 6).

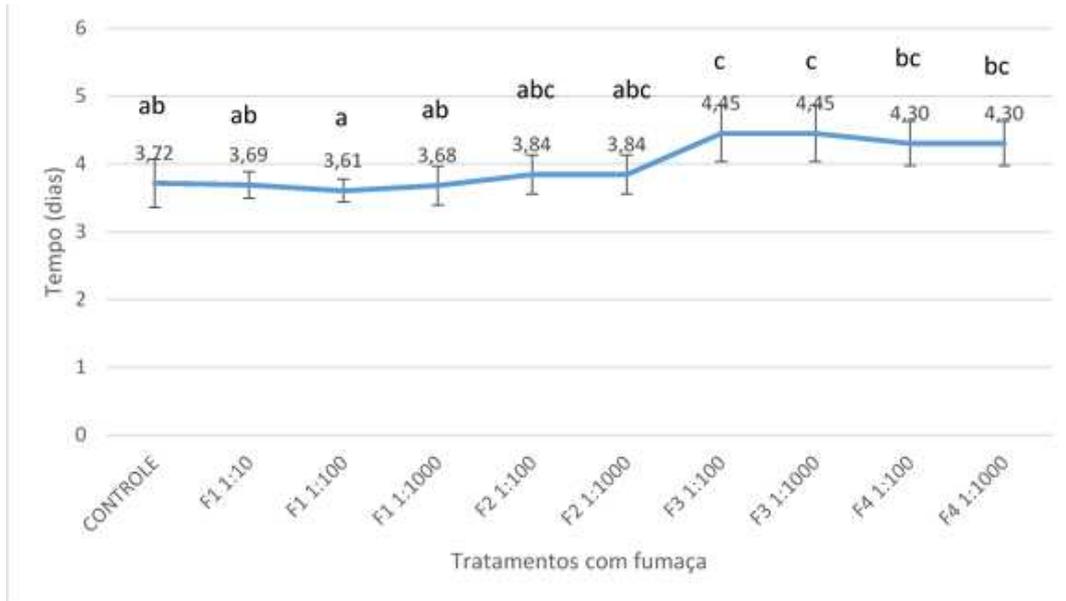


Figura 6. Tempo médio de germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização e concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto.

No tratamento F3 1:100 a velocidade de germinação (IVG) foi a menor (Figura 7).

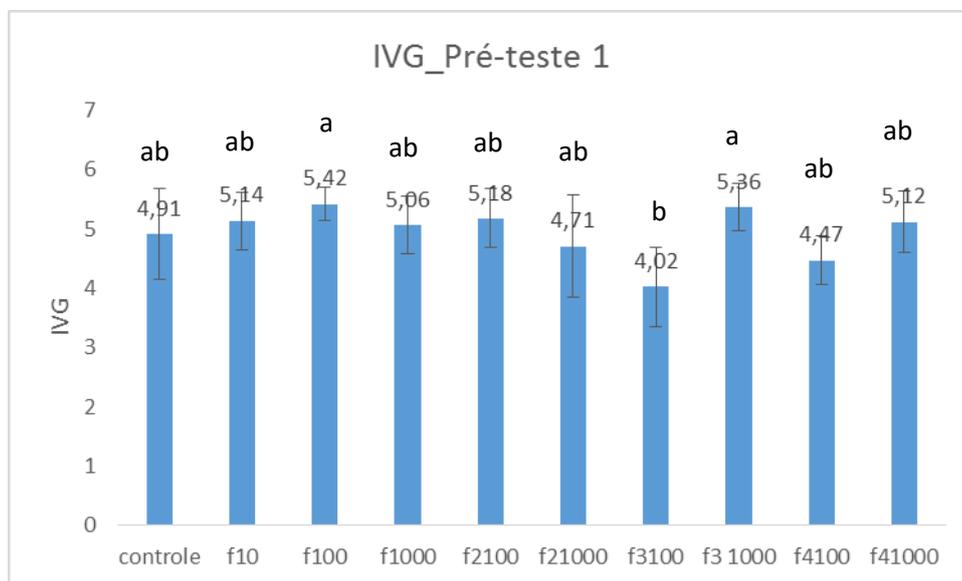


Figura 7. Índice de velocidade de germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização e concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto.

PRÉ-TESTE 2

O segundo pré-teste foi realizado no dia 9/12/2019 com objetivo de investigar a germinação de sementes de fedegoso nas quatro fases de carbonização de eucalipto, produzindo os extratos nas concentrações já citadas, sendo a concentração de 1:10 utilizada somente na F1.

A diferença desse teste para o primeiro é que o reumedecimento das sementes não foi feito com água destilada, e sim com o próprio extrato, trocando-se o papel germitest a cada nova aplicação das soluções, quando necessário.

RESULTADOS

O reumedecimento com extrato de eucalipto não inibiu a germinação de sementes de fedegoso (figura 8).

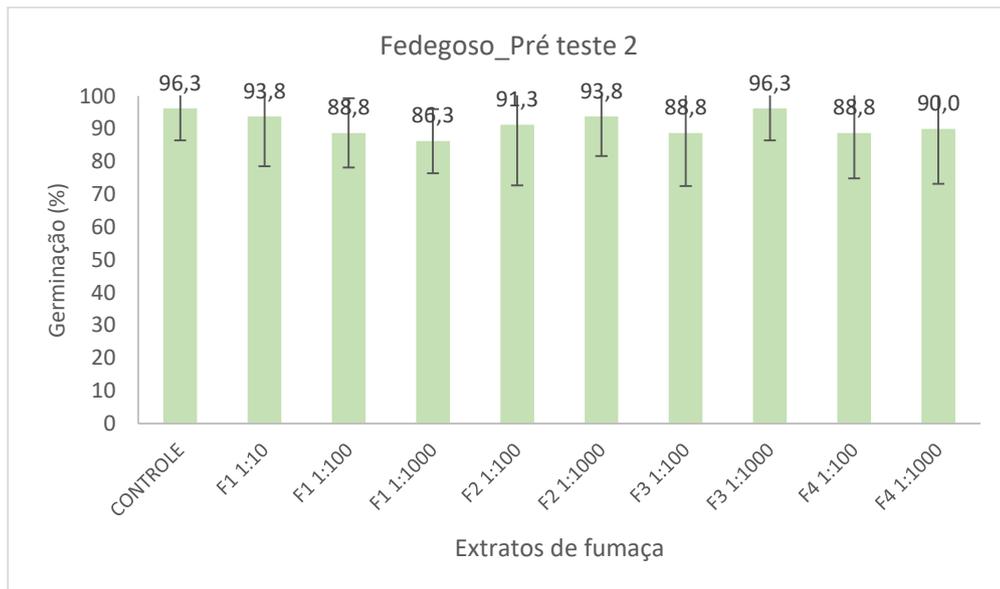


Figura 8. Germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização e concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto, reumedecidas com o próprio extrato.

No entanto, reduziu a velocidade de germinação na concentração de 1:100 em todas as fases testadas. (Figura 9)

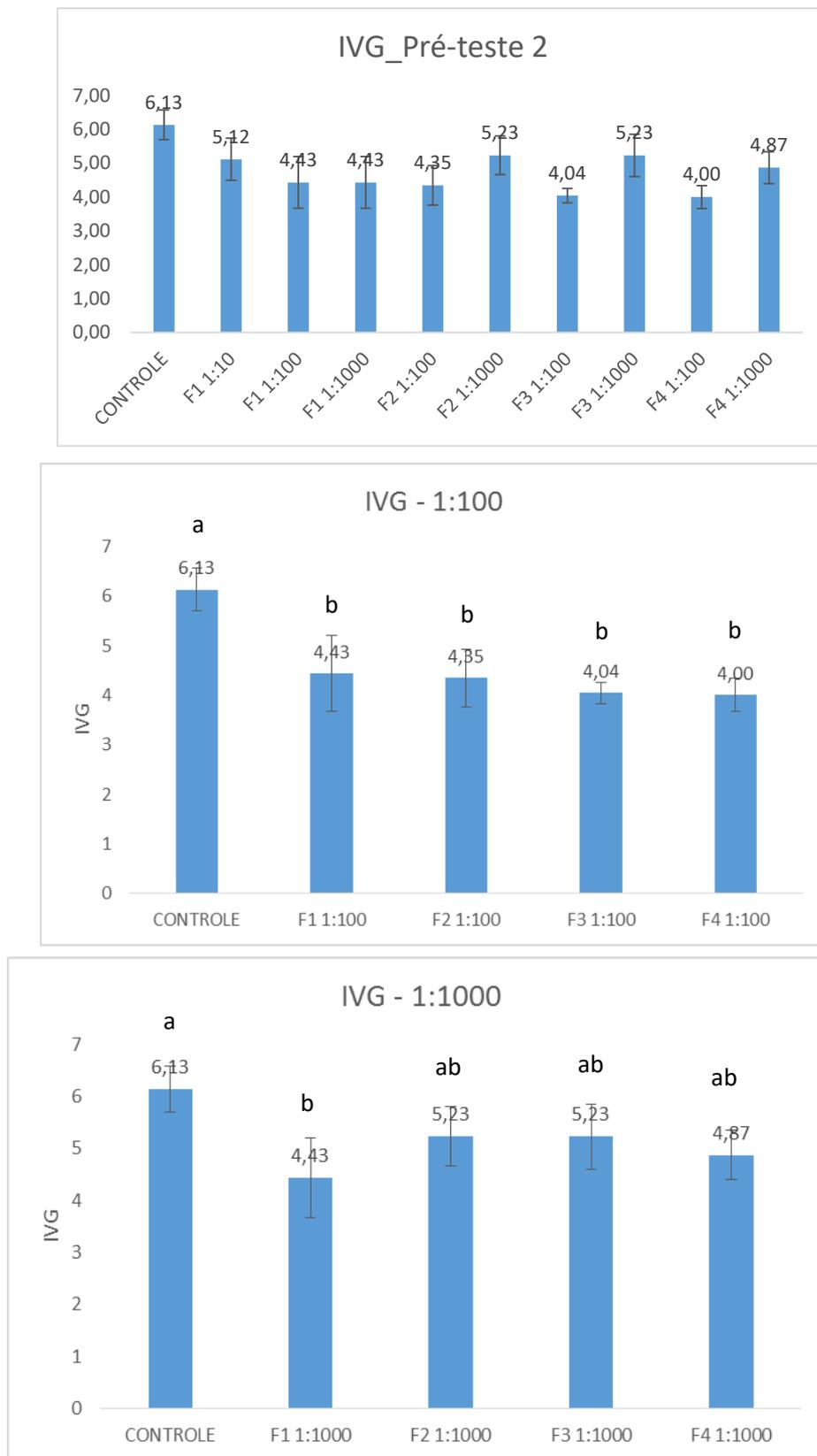


Figura 9. Índice de velocidade de germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização e concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto, reumedecidas com o próprio extrato.

O reumedecimento das amostras com EP de eucalipto reduziu o tempo médio de germinação na maioria dos tratamentos testados (Figura 10).

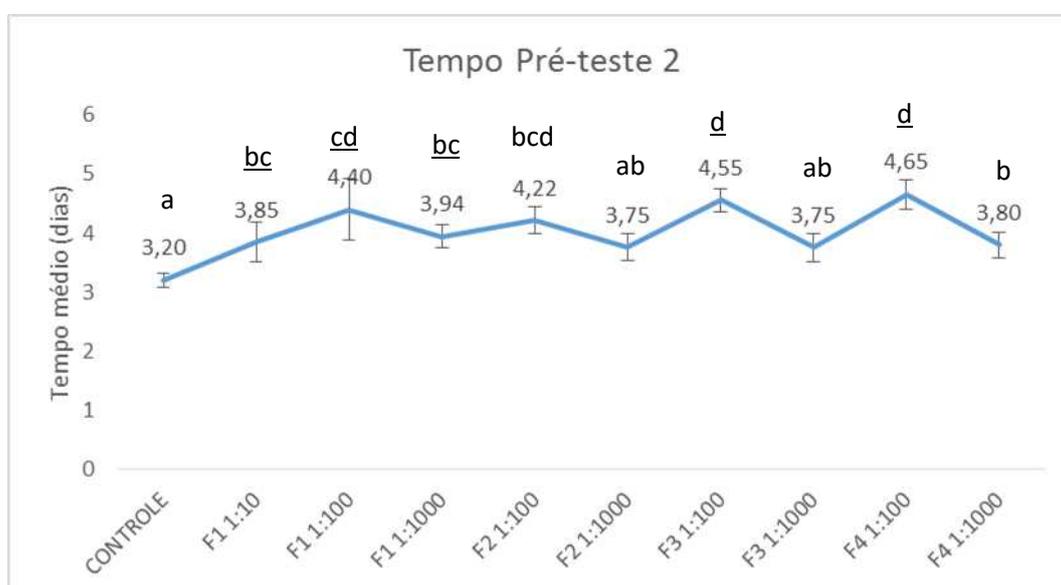


Figura 10. Tempo médio de germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização e concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto, reumedecidas com o próprio extrato.

PRÉ-TESTE 3

O terceiro pré-teste foi realizado no dia 15/01/2020 com o objetivo de investigar se o tegumento restringia a embebição de algum inibidor do extrato pirolenhoso de eucalipto para a germinação de sementes.

Os extratos foram produzidos a partir das quatro fases de carbonização em concentrações diferentes das anteriores, são elas: 1:25, 1:50 e 1:75, e repetimos a 1:100.

Quebra de dormência e embebição do EP pelas sementes

As sementes foram submetidas à quebra de dormência por meio de desponte lateral (Brasil, 2013). Em seguida, foram imersas em béqueres contendo os tratamentos e submetidas a vácuo na pressão 5 MPa por 30 minutos. Após o vácuo, foram deixadas nas soluções por 10 minutos. Todas as sementes foram colocadas em solução de Captan® (0,5%) antes do teste de germinação, por 60s.

O delineamento experimental foi feito conforme os anteriores, e o reumedecimento foi feito com água destilada quando necessário.

RESULTADOS

O EP produzido a partir da carbonização da madeira de eucalipto em 200°C (F2), somente quando mais concentrado (F21:50), inibiu a germinação das sementes de fedegoso (Figura 5 e Tabela 2). No entanto, em todas as concentrações testadas, o IVG foi reduzido após embebição das sementes neste EP (Tabela 2 e Figura 6). Na Fase 2 de carbonização (200 °C) a germinação das sementes foi inibida na concentração de 1:25, no entanto o mesmo não ocorreu nas F3 e F4. Portanto, o teste nessa concentração foi descartado.

O EP na concentração de 1:50 reduziu a germinação de sementes a partir da fase 3 de carbonização (Figura 11).

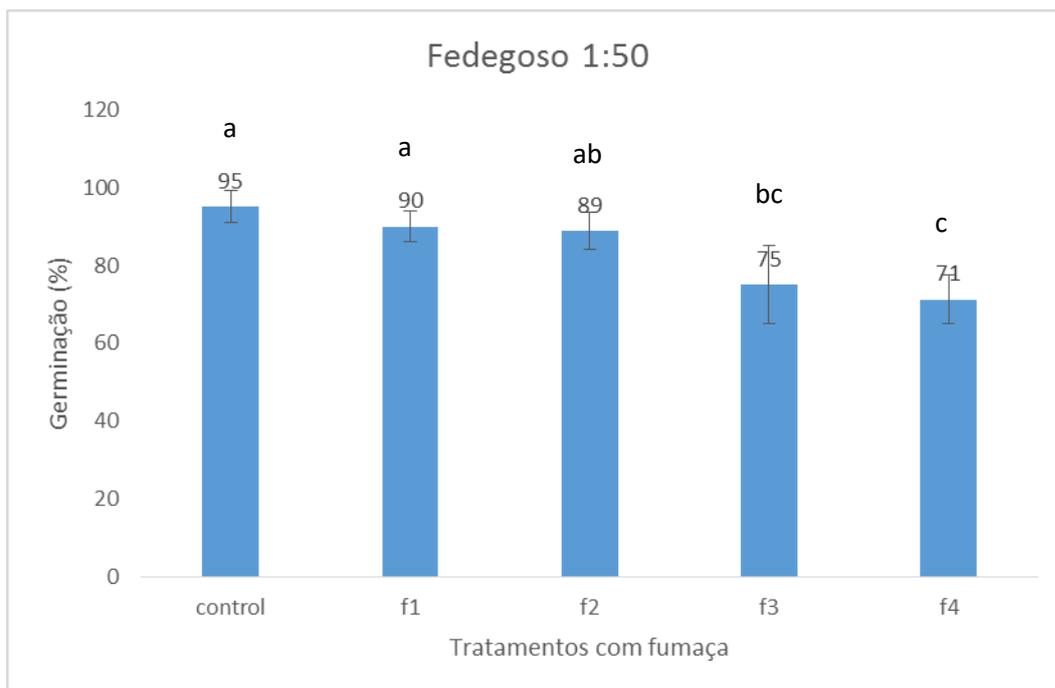


Figura 11. Germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização de extrato pirolenhoso de eucalipto, submetidas à vácuo.

A concentração de 1:75 não inibiu a germinação de sementes, mas reduziu na F2 (Figura 12).

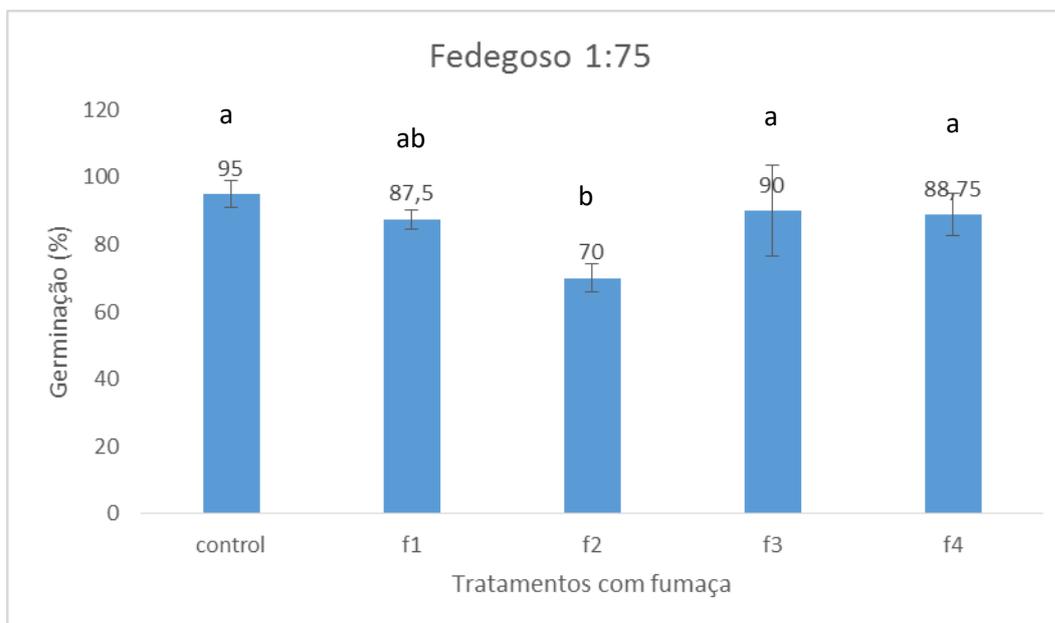


Figura 12. Germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização de extrato pirolenhoso de eucalipto, submetidas à vácuo.

Na concentração de 1:100 as sementes foram tratadas com hipoclorito por 1 minuto, entretanto os fungos apareceram nos tratamentos F3 e F4. Contudo, a alta germinabilidade nos tratamentos F1 e F2 mostram que as sementes suportam o extrato mesmo no vácuo (Figura 13).

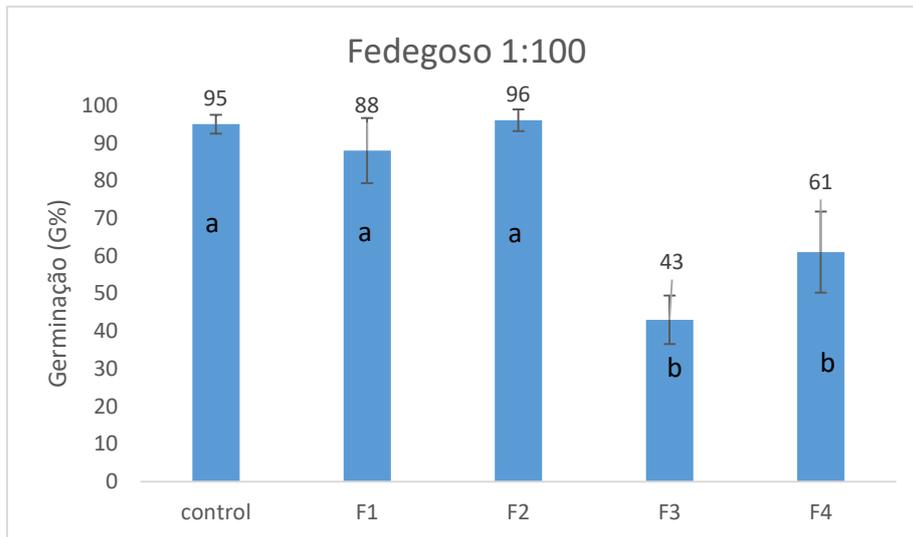
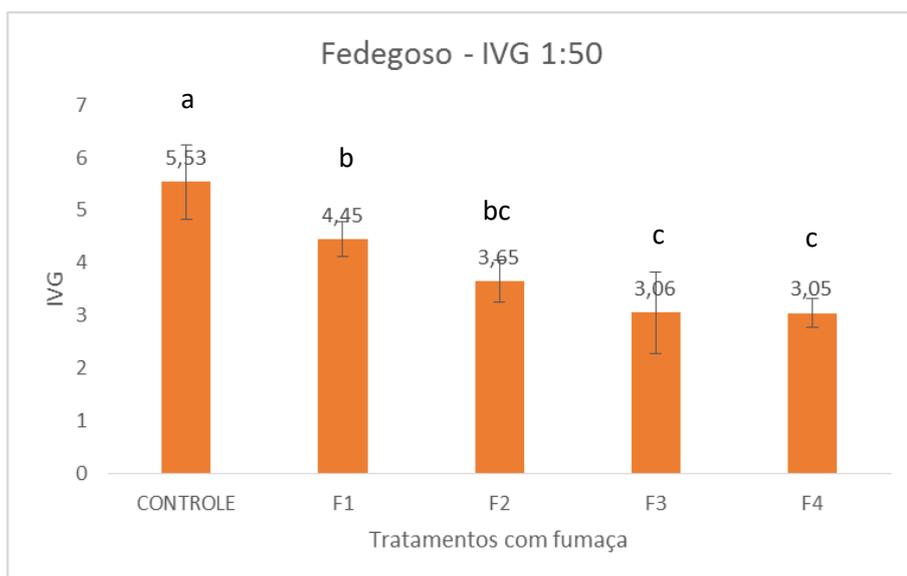


Figura 13. Germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização de extrato pirolenhoso de eucalipto, submetidas à vácuo.

A velocidade de germinação em todas as concentrações foi reduzida com o tratamento com extrato à vácuo, exceto na fase 1 em 1:75 (Figura 14).



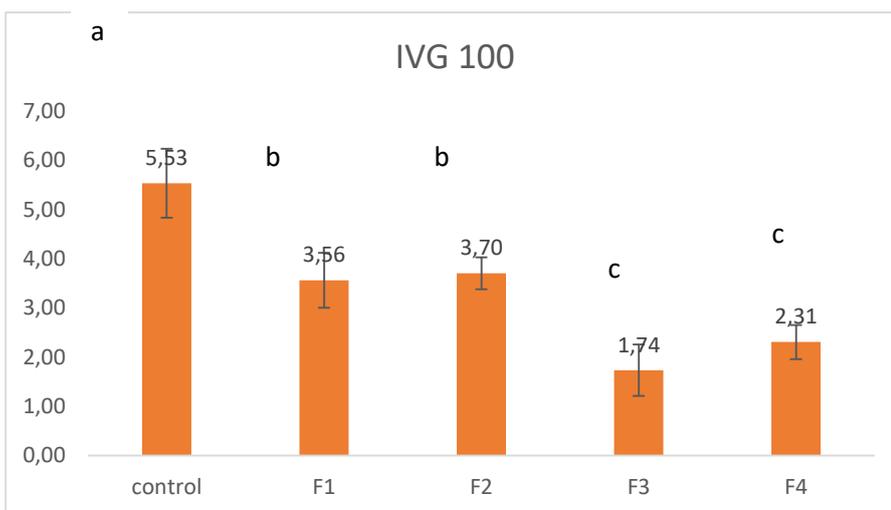
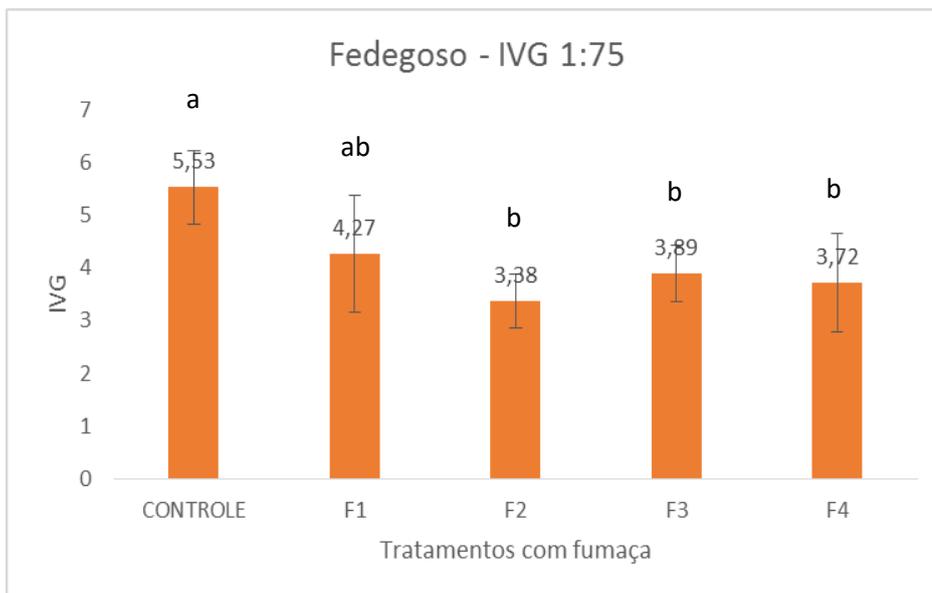


Figura 14. Índice de Velocidade de Germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização e concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto, submetidas à vácuo.

O tempo médio de germinação aumentou a partir da Fase 2 de carbonização para todas as concentrações testadas (Figura 15).

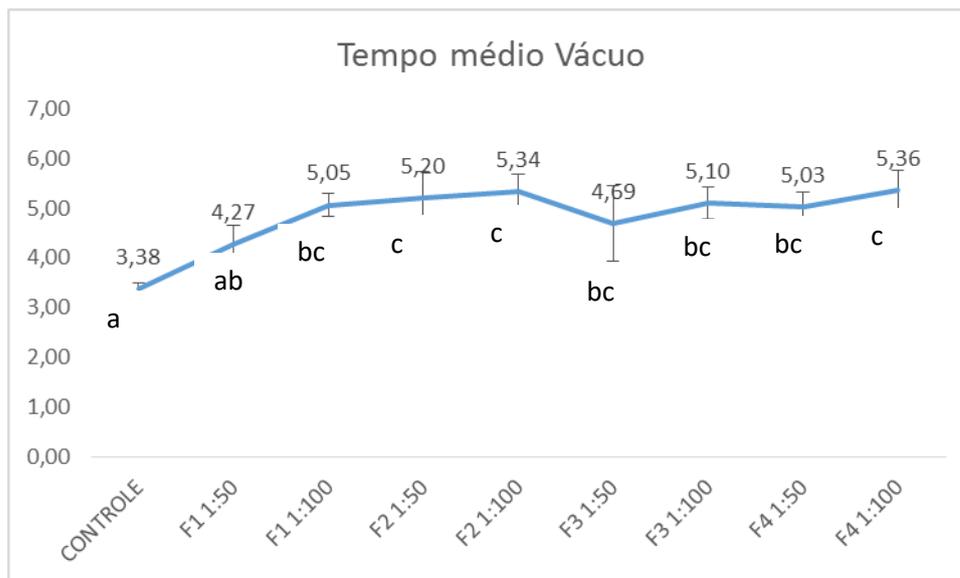


Figura 15. Germinação de *Senna macranthera* sob diferentes fases de carbonização de extrato pirolenhoso de eucalipto, submetidas à vácuo.

PRÉ-TESTE 4

O quarto pré-teste foi realizado dia 13/07/2020 a fim de testar o EP de angico, produzido em cinco fases de carbonização com intervalos a cada 50 °C após a decomposição primária, devido a observação de mudança de coloração do EP obtido.

As cinco fases de carbonização do angico correspondem às seguintes temperaturas:

- (vi) Fase 1 (F1): endotérmica - secagem (25-250 °C)
- (vii) Fase 2 (F2): endotérmica - decomposição primária (251-300 °C)
- (viii) Fase 3 (F3): exotérmica - decomposição secundária (301-350 °C)
- (ix) Fase 4 (F4): exotérmica - fixação de carbono (351-400 °C)
- (x) Fase 5 (F5): exotérmica - (401-450 °C)

Duas fases de carbonização: F2 – 300 °C e F3 – 350 °C resultaram em maiores rendimentos, portanto escolhido para o teste. Todos os extratos foram diluídos em água destilada, sendo 1ml de EP para cada 100 (100), 75 (175) ou 50 (150) ml de água destilada.

RESULTADOS

O EP produzido a partir da carbonização da madeira de angico vermelho em 350°C (F3) inibiu menos a germinação das sementes do que o EP da temperatura de 300°C (F2), mas isso dependeu da diluição utilizada (Figura 3). Além disso, o aumento de 50 °C na faixa de temperatura de carbonização da madeira influenciou a velocidade de germinação das sementes (Tabela 1, Figura 16). Porém, nenhum dos EPs de angico superou a performance germinativa das sementes do controle (Tabela 1).

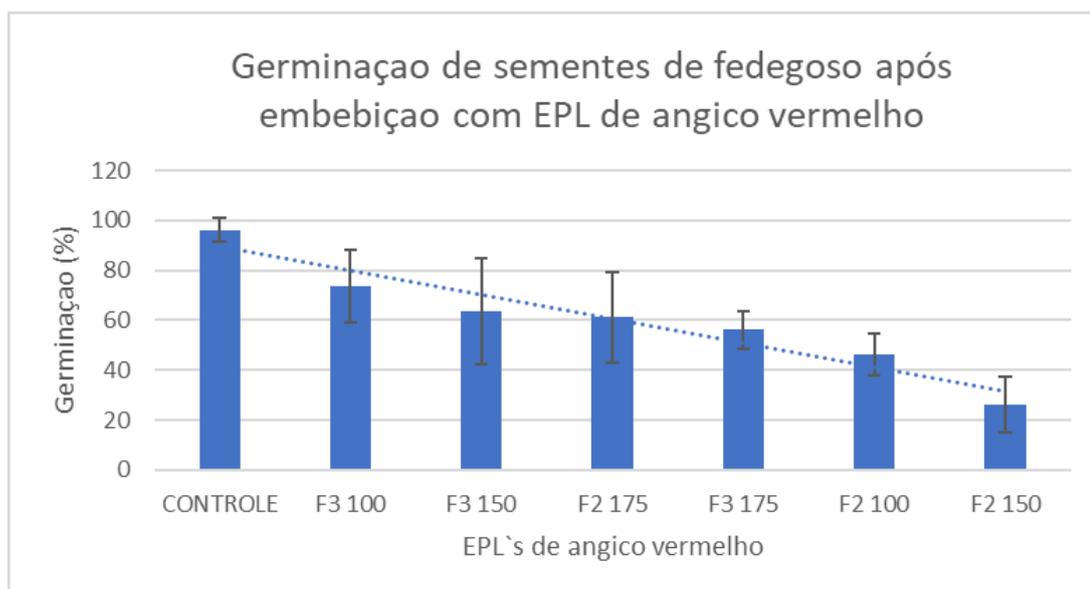


Figura 16. Germinação de sementes de fedegoso após desponte seguido de vácuo por 30 minutos em solução de extrato pirolenhoso (EP) de angico vermelho. O EP foi produzido a partir da combustão da madeira em 300 °C (F2) e 350° C (F3) e diluído em água destilada na proporção de 1:100 (100), 1:75(175) e 1:50 (150).

Tabela 1. Análise de variância da médias de Germinação, IVG e Tempo de germinação das sementes de *S. macranthera* após embebição com EP de angico vermelho. Letras diferentes indicam que há diferença entre os tratamentos com 95% de confiabilidade pelo Teste Tukey ($p < 0.05$).

Tratamento	Germinação (%)	IVG	Tempo (dias)
CONTROLE	96,2 a	6,6 a	3,18 a
F3 100	73,7 ab	3,3 b	4,59 b
F3 150	63,7 b	2,4 b	5,45 bc
F2 175	61,2 b	2,4 b	5,12 bc

F3 175	56,2 bc	2,2 bc	5.31 bc
F2 100	46,2 bc	1,9 bc	4.86 b
F2 150	26,2 c	0,9 c	5,93 c

O uso de EP à base de madeira de angico não influenciou o tempo de germinação das sementes, no entanto quanto mais concentrado for a solução, maior a tendência de demora germinativa (Figura 4). Essa tendência foi evidenciada também pelo índice de velocidade de germinação. No entanto, mesmo quando mais concentrado (F3 1:50), o EP desta faixa de temperatura foi menos prejudicial a performance germinativa (IVG) das sementes de fedegoso do que o EP da Fase 2 (300 C) (Tabela 1 e Figura 17).

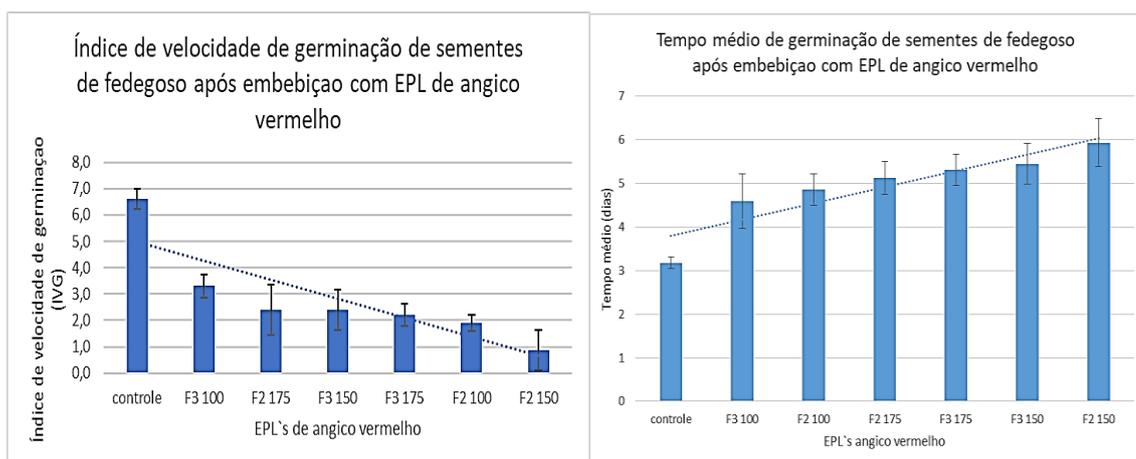


Figura 17. Índice de velocidade de germinação (IVG) e Tempo médio de germinação (TM) de sementes de *S. macranthera* (fedegoso) após desponte seguido de vácuo por 30 minutos em solução de extrato pirolenhoso (EPL) de angico vermelho.

PRÉ-TESTE 5

O quinto pré-teste foi realizado dia 18/07/2020 a fim de testar o EP comercial EPB-106, comercializado pela Brasil extrato pirolenhoso. Esse EP é produzido a partir do carvão de

eucalipto e é amplamente utilizado diluído em água (20ml/L) incorporado ao solo para melhorar enraizamento e desenvolvimento de mudas. Era de interesse da empresa ampliar seu uso no tratamento de sementes florestais.

Realizamos os mesmos testes com as mesmas diluições descritas anteriormente, para esse extrato.

O desponte lateral nas sementes de fedegoso foi utilizado para a quebra de dormência. Em seguida as sementes foram desinfestadas com captam 0,01% por 2 minutos e submetidas à vácuo por 30 minutos em solução de EPB-106 ou água destilada (controle).

O teste de germinação ocorreu em B.O.D. com temperatura controlada e constante de 25°C e fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro. A avaliação durou 7 dias e a protrusão da raiz foi utilizada como critério germinativo. As sementes foram reumedecidas com solução teste ou água destilada, quando necessário.

Todos os extratos foram diluídos em água destilada, sendo 1ml de EPB-106 para cada 100 (100), 75 (175) ou 50 (150) ml de água destilada.

Utilizamos 5 repetições de 20 sementes. A ANOVA foi aplicada para comparar as médias de germinação, índice de velocidade de germinação e tempo médio de germinação das sementes. O teste Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para registrar a diferença entre as médias.

RESULTADOS

O extrato reduziu a porcentagem de germinação e IVG das sementes nas concentrações de 1:100, 1:75 e 1:50, em comparação com o controle (Figura 18, Tabela 2). Porém, nas concentrações de 1:75 e 1:50 o tempo de germinação não foi afetado.

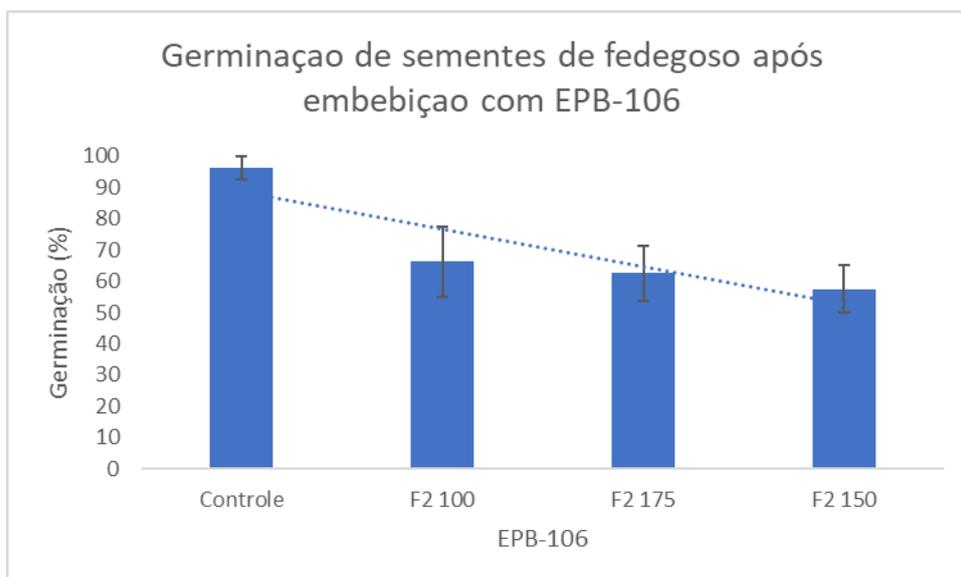


Figura 18. Germinação de sementes de fedegoso após desponte seguido de vácuo por 30 minutos em solução de extrato pirolenhoso comercial, o EPB-106. O EP foi produzido a partir da combustão da madeira de eucalipto e diluído em água destilada na proporção de 1:100 (100), 1:75(175) e 1:50 (150).

Tabela 2. Análise de variância da médias de Germinação, IVG e Tempo de germinação das sementes de fedegoso após embebição com EPB-106. Letras diferentes indicam que há diferença entre os tratamentos com 95% de confiabilidade pelo Teste Tukey ($p < 0.05$).

Treatmento	Germinação (%)	IVG	Tempo (dias)
Controle	96,2 a	6,2 a	3,1 a
F2 100	66,2 b	3,4 b	4 b
F2 175	62,5 b	3,2 b	4 ab
F2 150	57,5 c	2,8 b	3,7 ab

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA

O teor de água inicial foi determinado de acordo com as Regras para Análise de Sementes Florestais do Brasil - RAS (Brasil, 2009). A determinação foi realizada nas sementes do lote, que compuseram o tratamento controle, nas sementes despontadas tratadas apenas com água, e nas sementes defumadas despontadas e não despontadas (inteiras). As sementes

submetidas a defumação (fumaça gasosa) apresentaram uma redução de até 6,4% no teor de água em relação ao controle (Tabela 3).

Tabela 3. Teor de água das sementes de *Senna macranthera*

Tratamento	Peso úmido	Peso seco	Teor de água	Media	Diferença
fumaça/DESP	0,57	0,54	5,263158		
fuma/DESP	0,61	0,57	6,557377	5,910267	5,819037
fuma/INT	0,55	0,51	7,272727		
fuma/INT	0,53	0,5	5,660377	6,466552	4,666518
Contro/DESP	0,59	0,52	11,86441		
Contro/DESP	0,69	0,61	11,5942	11,7293	
Contro/LOTE	0,66	0,58	12,12121		
Contro/LOTE	0,69	0,62	10,14493	11,13307	

APÊNDICE B - RESULTADOS ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

O objetivo da análise cromatográfica foi identificar os compostos químicos existentes nos extratos pirolenhosos (EP) obtidos da carbonização da madeira de 6 espécies florestais.

No total foram 5 EP de espécies nativas (castanha sapucaia, sibipiruna, 7 cascas, angico e balsamo) e 1 EP de eucalipto. Sendo que esses extratos foram coletados em diferentes fases de carbonização da madeira a depender da temperatura.

Segundo a literatura, o composto químico karrikin da família dos butenolídeos (Figura 1) seria o responsável, da combustão de material vegetal, pela germinação de sementes de algumas espécies piro endêmicas, ou seja, aquelas que tem comportamento germinativo estimulado pela fumaça e/ou pelo fogo. Neste estudo, o karrikin não foi encontrado em grande quantidade em nenhum EPL obtido (ver anexo 1).

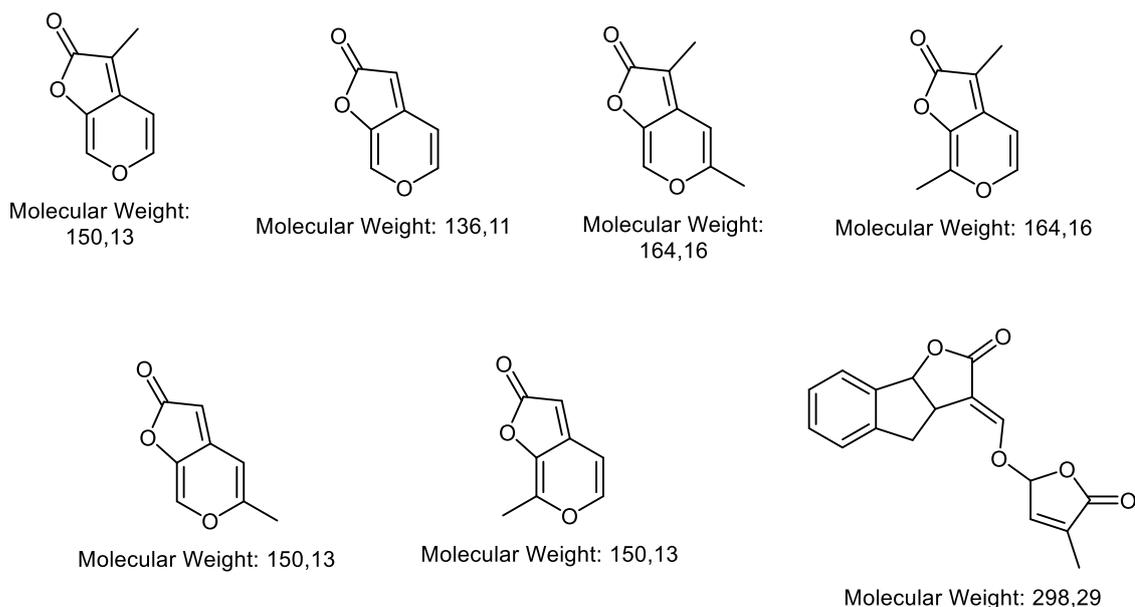


Figura 1. Diferentes arranjos da molécula de karrikin

O teste realizado com sementes de fedegoso indicou que o EP de eucalipto da primeira fase de combustão de madeira (F1) não influenciou na germinação das sementes, provavelmente pela grande quantidade de água que esse EP possui. Sendo assim, o F1 não diferiu do controle. Entretanto, na fase 2 de combustão (F2), a quantidade de água no EP diminuiu, porém, a germinação das sementes de fedegoso utilizando esse EP também não diferiu do controle.

Apesar dos resultados de cromatografia terem sido insuficientes para o EP da Fase 1, foi possível comparar os compostos das fases seguintes entre si. A tabela abaixo mostra os cinco maiores compostos químicos encontrados no EP de eucalipto das Fase 2, Fase 3 e Fase 4. (Tabela 1). A coluna **Area** corresponde a porcentagem que o composto ocupa dentro do EPL; a coluna **Similarity** corresponde a porcentagem de similaridade desse composto com o da literatura; a coluna **Molecular Weight** indica o peso dessa molécula. A amostra contou com um endorf de 2 ml.

Tabela 1. Composição química dos cinco compostos com maior área no extrato pirolenhoso de eucalipto em diferentes fases de carbonização

Trat	Area %	Compound	Similarity (%)	Molecular Weight
F2	20,7	3-hydroxypyridin-2(1H)-one	84	111
F2	13,37	D-Allose	95	180
F2	9,78	2,6-dimethoxyphenol	96	154

F2	8,59	Cyclopropylmethanol	87	72
F2	6,88	1,2,4-Trimethoxybenzene	84	168
Trat	Area %	Compound	Similarity (%)	Molecular Weight
F3	13,85	D-Allose	94	180
F3	8,78	3-hydroxypyridin-2(1H)-one	83	111
F3	7,6	1,2,4-Trimethoxybenzene	83	168
F3	6,99	Furan, 2,3-dihydro-4-(1-methylethyl)-	73	112
F3	6,14	Tridecane	91	184
Trat	Area %	Compound	Similarity (%)	Molecular Weight
F4	49,21	D-Allose	95	180
F4	6,46	1,4:3,6-Dianhydro-.alpha.-d-glucopyranose	95	144
F4	4,46	1,2,4-Trimethoxybenzene	82	168
F4	4,05	1-Nitro-.beta.-d-arabinofuranose, tetraacetate	84	363

De acordo com os resultados obtidos da tabela 1, apenas dois compostos, **D-Allose** e **1,2,4-Trimethoxybenzene**, são encontrados nas três fases de combustão do EP de eucalipto. E nas Fases 2 e 3, soma-se ainda o **3-hydroxypyridin-2(1H)-one**.

Na fase 2 onde ocorreu germinação igual ao do controle, os níveis de **D-Allose** foram um pouco mais de 13%. Nas fases 3 e 4 a porcentagem de D-Allose aumenta consideravelmente, alcançando mais que 49% na fase 4.

O EP de angico vermelho revelou que a faixa de temperatura de carbonização desta espécie muda conforme a composição química da madeira, pois um aumento de 50°C surtiu efeito na germinação de sementes de fedegoso (Figura 2).

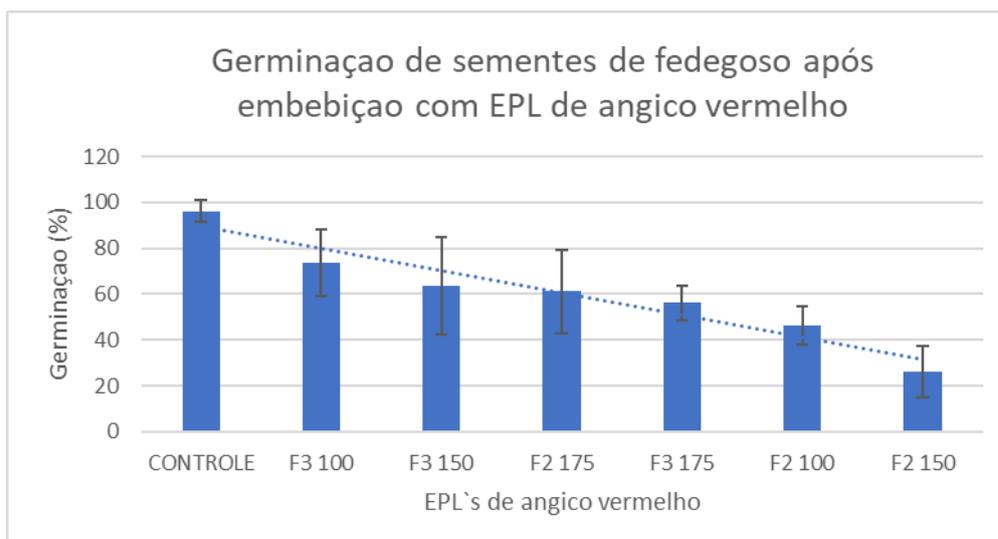


Figura 2. Germinação de sementes de *Senna macranthera* (fedegoso) embebidas com extrato pirolenhoso de angico (F2: combustão da madeira até 300°C e F3: combustão da madeira até 350°C; diluição em água destilada em 1:50; 1:74 e 1:100) após sementes submetidas à quebra de dormência com desponte e vácuo.

A tabela abaixo mostra os dez maiores compostos químicos encontrados no EP de angico vermelho das Fase 2 e Fase 3 (Tabela 2).

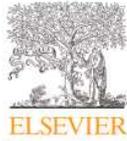
Tabela 2. Composição química dos cinco compostos com maior área no extrato pirolenhoso de angico em diferentes fases de carbonização

Trat	Area %	Compound	Similarity (%)	Molecular Weight
F2	12,83	Cyclopropylmethanol	87	72
F2	11,87	2-methoxyphenol	98	124
F2	11,69	2,6-dimethoxyphenol	96	154
F2	7,12	(tetrahydrofuran-2-yl)methanol	94	102
F2	6,08	3-hydroxypyridin-2(1H)-one	84	111
F2	5,55	2-methoxy-4-methylphenol	95	138
F2	4,68	1,2,4-Trimethoxybenzene	83	168
F2	3,57	1,2,3-trimethoxy-5-methylbenzene	81	182
F2	3,06	Pyridin-4-yl formate	80	125
F2	2,85	4-ethyl-2-methoxyphenol	92	152

Trat	Area %	Compound	Similarity (%)	Molecular Weight
F3	18.93	Cyclopropylmethanol	87	72
F3	6.70	2,6-dimethoxyphenol	95	154
F3	5.08	2-methoxy-4-methylphenol	93	138
F3	3.52	1,4:3,6-Dianhydro-.alpha.-d-glucopyranose	94	144
F3	2.88	3-methylcyclopentane-1,2-dione	95	112
F3	2.85	1,2,4-Trimethoxybenzene	83	168
F3	2.71	D-Allose	95	180
F3	2.01	1,2,3-trimethoxy-5-methylbenzene	82	182
F3	1.89	2,5-dimethoxytetrahydrofuran	94	132

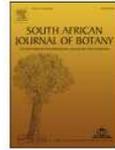
ANEXO

South African Journal of Botany 154 (2023) 1–6



Contents lists available at ScienceDirect

South African Journal of Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sajb

General

Germination of *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby in response to heat and smoke



Lydiane Lucia de Sousa Bastos^{a,*}, Eduardo Euclides de Lima e Borges^b,
Genáina Aparecida Souza^b, Lausanne Soraya de Almeida^b, Fillipe Tamiozzo Pereira Torres^b

^a Department of Forest Engineering, Postgraduate Program in Forest Science, Federal University of Viçosa, Avenue Peter Henry Rolfs, w/n - University Campus, Viçosa - MG, 36570-900 Brazil

^b Department of Forest Engineering, Federal University of Viçosa, Brazil

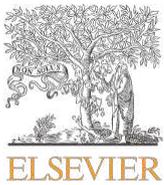
ARTICLE INFO

Article History:
Received 2 August 2022
Revised 9 January 2023
Accepted 17 January 2023

Edited by M. Kulkarni

ABSTRACT

Fire can trigger the germination of several forest species, as heat and smoke can break the dormancy of seeds buried in the ground. In this study, we applied heat, smoke and pyroligneous acid (PA) to dormant seeds of *Senna macranthera* (Fabaceae), a Brazilian Cerrado native tree, in order to evaluate the effect of forest fire triggers on its germination. We used dormant seeds soaked in distilled water, without the application of fire and smoke, as a control treatment. The test lasted seven days and root protrusion was used as a germination criterion. After this period, a viability test based on the longitudinal section was performed on the non-germinated seeds. The control germination after seven days was 0% but the viability test confirmed that they were



Contents lists available at ScienceDirect

South African Journal of Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sajb

General

Germination of *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby in response to heat and smokeLydiane Lucia de Sousa Bastos^{a,*}, Eduardo Euclides de Lima e Borges^b,
Genaína Aparecida Souza^b, Lausanne Soraya de Almeida^b, Fillipe Tamiozzo Pereira Torres^b^a Department of Forest Engineering, Postgraduate Program in Forest Science, Federal University of Viçosa, Avenue Peter Henry Rolfs, w/n - University Campus, Viçosa - MG, 36570-900 Brazil^b Department of Forest Engineering, Federal University of Viçosa, Brazil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2 August 2022

Revised 9 January 2023

Accepted 17 January 2023

Edited by M. Kulkarni

Keywords:

Dormancy breaking
Post fire germination
Pyroligneous acid
Pioneer forest species
Smoked

ABSTRACT

Fire can trigger the germination of several forest species, as heat and smoke can break the dormancy of seeds buried in the ground. In this study, we applied heat, smoke and pyroligneous acid (PA) to dormant seeds of *Senna macranthera* (Fabaceae), a Brazilian Cerrado native tree, in order to evaluate the effect of forest fire triggers on its germination. We used dormant seeds soaked in distilled water, without the application of fire and smoke, as a control treatment. The test lasted seven days and root protrusion was used as a germination criterion. After this period, a viability test based on the longitudinal section was performed on the non-germinated seeds. The control germination after seven days was 0%, but the viability test confirmed that they were alive (integument swelling and green color cotyledons). There was a positive effect of fire on the germination of burnt seeds buried at a depth of 5 cm soaked in PA (14.0%), followed by burnt seeds buried at a horizon of 2 cm (11.2%) and those that were not soaked in PA (10.0%). Smoked seeds showed swelling of the tegument by the viability test, but they were dead, indicating that there was a negative effect (0%) of the gaseous smoke on germination. We conclude that the strong promotional effect of heat and liquid smoke (using PA) on dormancy breaking and seed germination of *S. macranthera* suggests that this species is fire-adapted. However, the gaseous smoke was lethal, revealing that this species has different responses depending on the type of trigger (heat or smoke) and fire conditions.

© 2023 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Considered a biodiversity hotspot, the Cerrado is home to a great diversity of endemic species, and despite being one of the richest biomes in Brazil, it is also one of the most threatened ecosystems in the world (Myers et al., 2000; Silva et al., 2006). The influence of fire on the phytophysognomy of the Cerrado is complex and poorly understood, and responses to heat and smoke have only recently been addressed, with no response to fire stimuli, but with consistent heat tolerance between species (Lamont et al., 2019; Ramos et al., 2019; Dairel and Fidelis, 2020).

Although the seeds of some species of this habitat can withstand temperatures above 100 °C without affecting germination, the time of exposure to these temperatures for more than five minutes already compromises their survival (Ramos et al., 2019). The new clearings caused by fires in the Cerrado generally provide changes in the microclimate, with increased daily post-fire temperature fluctuations (Fidelis and Blanco, 2014; Daibes et al., 2018), which can also lead to

dormancy breaking in some areas, species (Santana et al., 2013; Daibes et al., 2017) and changes in phytosociology (Daibes et al., 2018).

The fire presents an important role as a disturbance agent and plays a role in ecosystem organization, affecting vital processes such as flowering, fruiting and seed germination (Bradshaw et al., 2011; Keeley et al., 2011; Daibes et al., 2018). Species that exhibit germination behavior stimulated by fire may have this process triggered by different mechanisms, with heat and smoke being the main drivers (Keeley and Fotheringham, 2000; Van Staden et al., 2000). The effect of heat has been shown to damage the impermeable seed coat, allowing water to enter it, what triggers germination (Baskin and Baskin, 2014).

Furthermore, species that are adapted to high temperatures are able to survive the heat of fires, mainly because they persist by maintaining a seed bank in the soil (Overbeck et al., 2006; Ribeiro and Borghetti, 2014; Fichino et al., 2016; Ramos et al., 2016). On the other hand, smoke is rich in cyanohydrins and karrikins, substances that stimulate germination in seeds of species from a wide range of plant families in fire-prone and non-fire-prone ecosystems (Ghebrehiwot et al., 2008; Nelson et al., 2012; Downes et al., 2014; Keeley and Pausas, 2018).

* Corresponding author.

E-mail address: lbastos@ufv.br (L.L.d.S. Bastos).

Physical and physiological dormancy are the most common in species from seasonal rainfall ecosystems, which include many fire-prone environments (Baskin and Baskin, 2014), and are strongly influenced by environmental signals such as temperature, humidity, and solar radiation (Willis et al., 2014; Collette and Ooi, 2017). However, in humid tropical regions, when the heat of fires breaks seed dormancy, seed vigor decreases (Soares et al., 2021). This mainly explains the effect of smoke on the regeneration of the seed bank of the burnt or unburnt soil (Rokich et al., 2002; Abedi et al., 2018), and on the seed dormancy breaking of this seed bank (Merritt et al., 2007; Ramos et al., 2019), but not the effect of heat on them.

Liquid smoke treatments are based on the principle of condensation of smoke from fires with atmospheric moisture. These treatments can derive from different plant sources and preparation methodologies (Campos, 2007) and can provide ecological and physiological signals of the species to respond to different stimuli. Studies have revealed that the with both smoke and charred wood combustion of a wide variety of woody plants in California chaparral and South African fynbos will stimulate germination of species restricted to post fire environments (Brown, 1993; Keeley and Bond, 1997; Van Staden et al., 2000).

Pyrolytic acid (PA), or aqueous extract of smoke, has been tested in a wide range of species from fire prone environments (Keeley and Fotheringham, 2000; Crosti et al., 2006; Brown et al., 2003) and non-fire-prone environments (Ferraz et al., 2013). Studies on forest species from fire and non-fire-prone environments reported a reduction in the development of eucalyptus clones using PA (Souza-Silva et al., 2006) and an increase in root and leaf growth of pine seedlings (Porto et al., 2007). No changes were observed in the development of phoenix palm seedlings when irrigated with PA alone (Wanderley et al., 2012). Yet, there is still a gap in relation to researches on the use of PA in the germination of forest seeds, and existing studies show that there are different responses of the species submitted to PA, which reinforces the need of further studies in this area.

Senna macranthera (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby is a tree species of the Fabaceae, native of the Cerrado, with potential use in urban afforestation and in projects for the recovery of degraded areas, as it is a pioneer, fast growing and indicator of biodiversity species (Lorenzi, 2021). They have small and waxy seeds which give them a physical dormancy caused by the impermeability of the tegument (Carvalho and Nakagawa, 2000) and it is not yet known which germination trigger can promote their germination. The seed dormancy can be overcome by chemical scarification or cutting opposite the hilum (Brasil, 2013). Once this dormancy is overcome, the seeds germinate in up to seven days with a high percentage (Ferreira et al., 2004).

In newly burnt environments, the rapid germination is advantageous as it allows the colonization of the area in less time and increases the advantages in competition with other species (Sparg et al., 2005; De Luis et al., 2008). Thus, species whose germination is stimulated by fire (heat damages to the integument or chemical effects of smoke) can have an advantage over the others in establishing in the environment after the occurrence of a fire.

In this study, we analyzed the germination, dormancy and viability of *Senna macranthera* seeds in relation to heat, smoke and pyrolytic acid (liquid smoke). We tried to answer the following questions: (i) Is the dormancy of the seeds of this species overcome by heat and smoke?; (ii) Are the effects of heat more pronounced than the effects of smoke on seed germination? and (iii) Can the smoke treatment method influence germination responses?

2. Material and methods

2.1. Origin of seeds

Senna macranthera seeds were collected from two mother trees on the Campus of the Federal University of Viçosa - UFV (20°45'14" S 42°

52°54'00" W), in 2019, by the Forest Research Society - SIF and donated to the UFV Department of Forest Engineering. A total of three kilos of seeds were collected (each kilo containing between 20,000 and 28,000 seeds, according to Brasil, 2013) that remained stored in plastic bags in a cold chamber at 5 °C in the Laboratory of Analysis of Forest Seeds of the UFV for one year until the start of the analysis. The initial moisture content and lot viability were determined according to the Rules for the Analysis of Forest Seeds of Brazil - RAS (Brasil, 2013). Lateral cut was adopted to break dormancy in a preliminary test carried out with 400 seeds arranged in a Petri dish with two layers of paper, in order to obtain the germination percentage of the lot.

2.2. Simulation of fire and seed germination

Dormant seeds were placed in a sandbox at depths of two and five centimeters (Table 1). Dried palm branches and leaves were used as combustible material and the fire was applied for 10 min with an initial temperature of 22.8 °C (SM 1). During the experiment, temperatures were measured using a digital thermocouple Minipa MT-600 (SM 2). For smoked purposes, the seeds were placed on grids at the top of an improvised chimney in an iron drum (SM 3). The smoke generated inside this drum was caused by the burning of hay and lasted two minutes with an initial temperature of 19 °C.

The liquid smoke imbibition test was performed using eucalyptus pyrolytic acid (PA) (SM 4). A preliminary test was carried out with this PA, which was produced by the combustion of eucalyptus wood in a muffle furnace under four temperatures (100, 200, 300 and 400 °C) (SM 5). The extracts collected from the smoke generated at each temperature were diluted in three proportions: 1:50, 1:75 and 1:100. The PA produced from the combustion of wood at 200 °C and diluted in distilled water in the proportion of 1 ml of PA to 75 ml of distilled water (1:75) was what triggered the highest germination speed (4.9 Germination Speed Index - GSI) and higher germination percentage (85.0%) of *S. macranthera* seeds (data not shown), and therefore chosen for this experiment.

After fire or smoke was applied to the dormant seeds, they were disinfected with Captan® (1%) for 2 min. The germination trials were performed in incubators (Biochemical Oxygen Demand) under constant temperature at 25 °C (± 2 °C) with a 12 h photoperiod (fluorescent light with about 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) and 12 h of dark. Seeds were placed on two layers of germination paper (SM 6), in 9 cm Petri dishes and moistened with 3 mL of solution test (Table 1). Germination (root protrusion \geq 5 mm with geotropic curvature) (SM 7) was assessed every day for seven days and the substrate was re-moistened with destilate water when necessary.

At the end of the observation period, a viability test, by longitudinal sectioning was performed on all non-germinated seeds to distinguish the non-dormant viable ones (living non-germinated seeds) from the dead seeds (mushy seed with fungi) (Brasil, 2009). One visual observation consisted of verifying if the green color of the cotyledons, which indicated life, was present on the living non-

Table 1
Identification of treatments tested on *Senna macranthera* seeds.

Treatments
1- Control - without applying fire or smoke, using dormant seeds soaked only in distilled water
2- Smoke in the seeds, later soaked in distilled water
3- Fire in seeds buried at 5 cm, later soaked in PA
4- Fire in seeds buried at 5 cm, later soaked in distilled water
5- Fire in seeds buried at 2 cm, later soaked in distilled water

germinated seeds (Figure colored) and also if there was an increase in the size of the seeds, showing their swelling (Noronha et al., 2019).

2.3. Data analysis

Completely Randomized Design was applied for each germination test, according to the treatments evaluated (Table 1). For each treatment, five replications of 20 seeds each were used ($N_i=100$). The Analysis of Variance - ANOVA was applied to compare the germination averages and germination speed index - GSI, calculated according to Maguire (1962). Tukey's test ($p<0.001$) was used to record the difference between the means using the SISVAR 5.6 program (Ferreira, 2019). The comparison of germinated, live non-germinated and dead seeds was evaluated through the percentage of germination.

3. Results

The seed lot used in this study had an initial moisture content of 10.9% and the viability tested with lateral cut for break dormancy at the end of seven days was 96.2%. The effect of fire in breaking the dormancy of *Senna macranthera* seeds was evidenced by the difference in the germination of the seeds of the control group (0%), in relation to the other treatments with fire and fire + pyroligneous acid (PA) (Fig. 1A). The temperatures reached in these treatments ranged from 63 to 90 °C for 10 min. And under these conditions, seeds buried at a depth of 5 cm, later soaked in PA, had higher germination (14.0%), followed by seeds buried at 2 cm (11.2%) and those burned at 5 cm without imbibition with PA (10.0%). All fire and fire + PA treatments triggered the highest germination speeds (GSI) compared to control and smoke (Fig. 1B).

Seeds smoked at a maximum temperature of 64.3 °C (52 °C) showed an increase in size with integument swelling. However, there was no effect (0%) of smoking on germination (Fig. 1A). This same

temperature (63.5 ± 2 °C) did not prevent germination (10–14%) of burnt seeds buried at 5 cm.

The seeds not germinated until the final count of the germination test were all swollen, with a visible increase in their size, being classified as living non-germinated seeds or dead by the viability test. The living non-germinated seeds had the cotyledons visibly green, appearing to be alive, while the dead ones had the cotyledons brown/black (Fig. 2, Figure color). Although there was imbibition of the burnt seeds (treated with fire or smoke), evidenced by the swelling of the integument, the germination of germinated or living non-germinated seeds was very small compared to dead seeds (Fig. 2).

Figure Colored. Viability test results showing living non-germinated (green cotyledons) and dead (brown/black cotyledons) *Senna macranthera* seeds subjected to simulated fire for 10 and 2 min (fire and smoke, respectively).

4. Discussion

The hypothesis that heat would break the dormancy of *Senna macranthera* seeds was accepted, as at least 10% of the seeds germinated (Fig. 1). In this study, we also observed that the survival of *S. macranthera* seeds after fire indicates that this species can withstand high temperatures (up to 90 °C). However, exposure time for up to 10 min compromised its survival, as predicted by Ramos et al. (2019) for plant species from the Cerrado biome.

Senna macranthera seeds, when germinated at 50 °C for seven days, had their dormancy broken by heat (De Paula et al., 2012). The heat removed the entire layer of wax from the tegument, exposing the cells with a lignified testa wall, which allowed the seed to absorb water, favoring germination. In this sense, the heat acted to loosen the physical barrier that surrounds the seeds, allowing the entry of water and subsequent germination (De Paula et al., 2012). In the case of wildfires, heat can act as a thermal shock, breaking seed dormancy and triggering the germination of post-fire species buried in the soil of several regions of the world, for example temperate (Keeley and Fotheringham, 2000) and Mediterranean regions (Tormo et al., 2014; Moreira et al., 2010; Moreira and Pausas, 2016).

In addition, heat can act on the adaptive behavior of the species, since seeds that germinate even after exposure to high temperatures gain an evolutionary advantage in fire scenarios (Simon et al., 2009). Our study showed that despite the damage caused by high temperature (> 90 °C) in seeds buried closer to the soil surface (2 cm), the germination speed achieved in this treatment was high (Fig. 1B). Indicating that *S. macranthera* has germinal resilience since, even under stress, it manages to germinate. Germination resilience can be interpreted as the ability of plants to temporarily survive difficulties, in addition to generating opportunities for them to establish themselves elsewhere, away from the mother plant (Kesseler and Stuppy, 2006).

On the other hand, the effects of heat were not more pronounced than the effects of smoke on seed germination of *S. macranthera*. Imbibition with pyroligneous acid (liquid smoke) increased the germination of seeds after the fire compared to the control (Fig. 1), corroborating studies related to liquid smoke with native species from the same region. Recruitment of seedlings after fire in a seed bank in Cerrado soil (Campo rupestre) was tested by Fernandes et al. (2020), who applied heat shock (80 and 100 °C for 5 min) and liquid smoke (1:10) on seeds of nine shrub species native of the region. Liquid smoke increased germination in most species tested compared to heat shock. These authors concluded that ecological implications would explain the increase in the germination rate caused by the smoke exhibited by the Campo rupestre species. It can allow the recruitment of seedlings right after the fire, during the rainy season, when there is greater availability of resources and competition is low (Alvarado et al., 2017). Liquid smoke also interacted with the seeds in the dark and promoted the germination of two species from the Cerrado soil seed bank (Ramos et al., 2019). The smoke extract at a

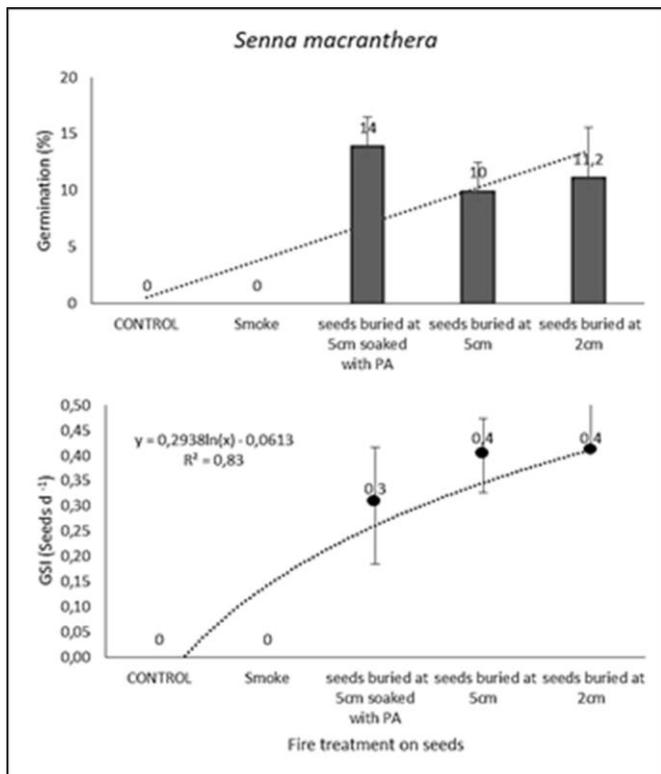


Fig. 1. Germination (A) and Germination Speed Index (B) of *Senna macranthera* seeds subjected to simulated fire for 10 and 2 min (fire and smoke, respectively). Equal letters identify that there was no significant difference between treatments by the Tukey test ($p<0.001$).

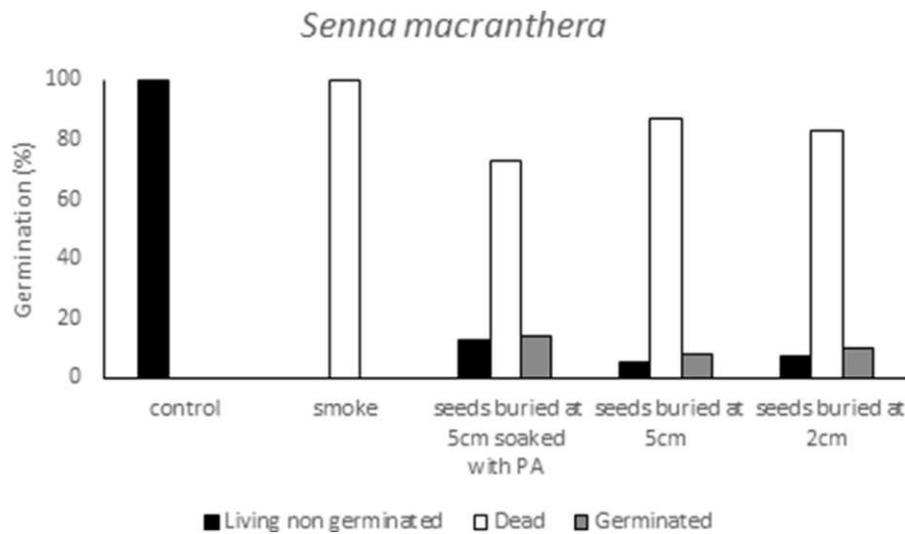


Fig. 2. Germinated seeds, living non-germinated and dead after viability test performed on *Senna macranthera* subjected to simulated fire for 10 and 2 min (fire and smoke, respectively).

concentration of 1:10 increased the germination rate of *Aristida riparia* and *Aristida recurvata* in the dark, indicating that the liquid smoke overcomes the photoinhibition of these species, acting as a signal that the fire has already occurred and that now the seeds can germinate (Ramos et al., 2019).

On the other hand, exposure of *S. macranthera* seeds to smoked for two minutes resulted in embryo death (Fig. 1). The maximum temperature reached in this treatment (64.3 \pm 2 $^{\circ}$ C) was similar to that observed in the fire treatment (63.5 \pm 2 $^{\circ}$ C), which allowed at least 10% of the seeds to germinate, indicating that, for this species, fire responses may depend on more factors than temperature. However, the results with smoked in this study contrast with what is found in the literature. In a forest in northern Iran, aerosol smoke increased the germination of legumes and perennial grasses by up to twice as compared to liquid smoke (1:1000), indicating that the type of smoke can alter regeneration patterns in distinct functional groups (Abedi et al., 2018). For, while perennial species allocate resources to structures that increase their chance of surviving the next fire, annuals accumulate seeds in the soil seed bank as a way of ensuring post-fire survival (Bond and Midgley, 2003; Pausas et al., 2004).

Although abiotic factors – mainly light and temperature (heat) – can alleviate seed dormancy and induce germination (Baskin and Baskin, 2014) and resilience favors survival under adverse conditions (Kessler and Stuppy, 2006), the plant needs to experience proper signals to settle down. These signals need to inform that the environment is favorable to germinate in large quantities, aligning the environment with the germination requirements for each species. Often exposure to a stressful condition can be too much, even for a vigorous plant. The extent of germinal damage depends on the species, the initial water content of the seed, the temperature, the duration of

exposure to stress and the period of germination during which the exposure occurred (Lopes and Franke, 2011).

In this study, the fire simulation for up to 10 min, testing heat and smoke, allowed the loss of the tegumentary waxiness of the seeds that gave them physical dormancy, triggering germination. However, visible damage to the embryo revealed that both heat and smoke reduced its vigor (Fig. 2). Furthermore, exposure to these stresses reduced seed moisture content by at least 3% (data not shown). When germinating under these conditions, seeds can suffer imbibition damage, characterized by irreparable losses to the membrane system, which leads to leaching of cellular contents, negatively affecting germination (Prodanovic et al., 2007). Therefore, even though *S. macranthera* seeds have accelerated their germination process after the fire, it is notable that the reduction in their viability is a concern, especially in scenarios of recurrent forest fires in the Cerrado (Daibes et al., 2018), habitat of this species.

5. Conclusion

We conclude that the positive effect of heat and liquid smoke (using PA) on dormancy breaking and seed germination of *Senna macranthera* seeds suggests that this species is adapted to fire. However, the gaseous smoke can be lethal, reducing the vigor of the seeds. This species has different responses depending on the type of germination trigger (heat or smoke) and fire conditions (exposure time and temperature, for example). In relation of the imbibition with pyrolytic acid, the possible protection of the embryo to the heat is a stimulus for more detailed studies.



Figure Colored. Viability test results showing living non-germinated (green cotyledons) and dead (brown/black cotyledons) *Senna macranthera* seeds subjected to simulated fire for 10 and 2 minutes (fire and smoke, respectively).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the help of professor Yêda Maria Boaventura Arruda for constructive comments on smoke extract preparation. Helpful contributions were made by staff at the Wood Panel and Energy Laboratory from UFV coordinated by Professor Angelica de Cassia Carneiro, for preparation of eucalyptus pyrolygneous extract. We also thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support of this study (Finance Code 001). Comments from the anonymous referees substantially helped to improve the paper.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.sajb.2023.01.032.

References

- Abedi, M., Zaki, E., Erfanzadeh, R., Naqinezhad, A., 2018. Germination patterns of the scrublands in response to smoke: the role of functional groups and the effect of smoke treatment method. *S. Afr. J. Bot.* 115, 231–236.
- Alvarado, S.T., Fornazari, T., Cóstola, A., Morellato, L.P.C., Silva, T.S.F., 2017. Drivers of fire occurrence in a mountainous Brazilian cerrado savanna: tracking long-term fire regimes using remote sensing. *Ecol. Indic.* 78, 270–281.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2014. Seeds: ecology, biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination, 2nd ed. Elsevier/Academic Press, San Diego.
- Bradshaw, S.D., Dixon, K.W., Hopper, S.D., Lambers, H., Turner, S.R., 2011. Little evidence for fire-adapted plant traits in Mediterranean climate regions. *Trends Plant Sci.* 16 (2), 69–76.
- Brasil, 2013. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instruções para Análise De Sementes De Espécies Florestais. de 17 de janeiro de 2013, Brasília.
- Bond, W.J., Midgley, J.J., 2003. The evolutionary ecology of sprouting in woody plants. *Int. J. Plant Sci.* 164 (3), 103–114.
- Brown, N.A.C., 1993. Seed germination in the fynbos fire ephemeral, *Syncarpha vestita* (L.) B. Nord. is promoted by smoke, aqueous extracts of smoke and charred wood derived from burning the ericoid-leaved shrub, *Passerina vulgaris* Thoday. *Int. J. Wildland Fire* 3, 203–206.
- Brown, N.A.C., Van Staden, J., Daws, M.I., Johnson, T., 2003. Patterns in the seed germination response to smoke in plants from the Cape Floristic Region. *S. Afr. J. Bot.* 69 (4), 514–525.
- Campos, A.D., 2007. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. Embrapa Clima Temperado-Circular Técnica (INFOTECA-E). Pelotas.
- Carvalho, N.M., Nakagawa, J., 2000. Sementes: ciência, Tecnologia e Produção, 4.ed FUNEP, Jaboticabal.
- Collette, J.C., Ooi, M.K.J., 2017. Germination ecology of the endangered species *Asterolasia buxifolia* (Rutaceae): smoke response depends on season and light. *Aust. J. Bot.* 65 (3), 283–291.
- Crosti, R., Ladd, P.G., Dixon, K.W., Piotto, B., 2006. Post-fire germination: the effect of smoke on seeds of selected species from the central Mediterranean basin. *For. Ecol. Manage.* 221 (1–3), 306–312.
- Daibes, L.F., Zupo, T., Silveira, F.A., Fidelis, A., 2017. A field perspective on effects of fire and temperature fluctuation on Cerrado legume seeds. *Seed Sci. Res.* 27 (2), 74–83.
- Daibes, L.F., Gorgone-Barbosa, E., Silveira, F.A., Fidelis, A., 2018. Gaps critical for the survival of exposed seeds during Cerrado fires. *Aust. J. Bot.* 66 (2), 116–123.
- Dairel, M., Fidelis, A., 2020. How does fire affect germination of grasses in the Cerrado? *Seed Sci. Res.* 30 (4), 275–283.
- De Luis, M., Raventos, J., Wiegand, T., Carlos González-Hidalgo, J., 2008. Temporal and spatial differentiation in seedling emergence may promote species coexistence in Mediterranean fire-prone ecosystems. *Ecography* 31 (5), 620–629.
- De Paula, A.S., Delgado, C.M.L., Paulilo, M.T.S., Santos, M., 2012. Breaking physical dormancy of *Cassia leptophylla* and *Senna macranthera* (Fabaceae: caesalpinioideae) seeds: water absorption and alternating temperatures. *Seed Sci. Res.* 22 (4), 259–267.
- Downes, K.S., Light, M.E., Pošta, M., Kohout, L., van Staden, J., 2014. Do fire-related cues, including smoke-water, karrikinolide, glyceronitrile and nitrate, stimulate the germination of 17 Anigozanthos taxa and *Blancoa canescens* (Haemodoraceae)? *Aust. J. Bot.* 62 (4), 347–358.
- Ferraz, I.D.K., Arruda, Y.M.B.C., Van Staden, J., 2013. Smoke-water effect on the germination of Amazonian tree species. *S. Afr. J. Bot.* 87, 122–128.
- Ferreira, D.F., 2019. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Revista Brasileira de Biometria* 37 (4), 529–535.
- Ferreira, R.A., Davide, A.C., Motta, M.S., 2004. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. e *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn.; num banco de sementes em solo de viveiro. *Revista Brasileira de Sementes* 26 (1), 24–31.
- Fichino, B.S., Dombroski, J.R., Pivello, V.R., Fidelis, A., 2016. Does fire trigger seed germination in the Neotropical Savannas? Experimental tests with six Cerrado species. *Biotropica* 48 (2), 181–187.
- Fidelis, A., Blanco, C., 2014. Does fire induce flowering in Brazilian subtropical grasslands? *Appl. Veg. Sci.* 17 (4), 690–699.
- Ghebrehiwot, H.M., Kulkarni, M.G., Kirkman, K.P., Van Staden, J., 2008. Smoke-water and a smoke-isolated butenolide improve germination and seedling vigour of *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter under high temperature and low osmotic potential. *J. Agron. Crop. Sci.* 194 (4), 270–277.
- Keeley, J.E., Bond, W.J., 1997. Convergent seed germination in South African fynbos and Californian chaparral. *Plant Ecol.* 133, 153–167.
- Keeley, J.E., Pausas, J.G., Rundel, P.W., Bond, W.J., Bradstock, R.A., 2011. Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. *Trends Plant Sci.* 16 (8), 406–411.
- Keeley, J.E., Fotheringham, C.J., 2000. Role of fire in regeneration from seed. *Seeds* 2, 311–330.
- Keeley, J.E., Pausas, J.G., 2018. Evolution of 'smoke'-induced seed germination in pyroendemic plants. *S. Afr. J. Bot.* 115, 251–255.
- Kesseler, R., Stuppy, W., 2006. Seeds: Time Capsules of Life. Papadakis Publisher.
- Lamont, Byron B., Tianhua, H.E., Zhaogui, Y.A.N., 2019. Evolutionary history of fire-stimulated resprouting, flowering, seed release and germination. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 94 (3), 903–928.
- Lopes, R.R., Franke, L.B., 2011. Aspectos técnico-biológicos da germinação de sementes de cornichão anual sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40, 2091–2096.
- Lorenzi, H., 2021. Árvores Brasileiras, Manual De Identificação e Cultivo De Plantas Arbóreas Nativas Do Brasil, 3. Insitituto Plantarum, Nova Odessa. V3ªEd.
- Maguire, J.D., 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2, 176–177.
- Merritt, D.J., Turner, S.R., Clarke, S., Dixon, K.W., 2007. Seed dormancy and germination stimulation syndromes for Australian temperate species. *Aust. J. Bot.* 55 (3), 336–344.
- Moreira, B., Tormo, J., Estrelles, E., Pausas, J., 2010. Disentangling the role of heat and smoke as germination cues in Mediterranean Basin flora. *Ann. Bot.* 105 (4), 627–635.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403 (6772), 853–858.
- Nelson, D.C., Flematti, G.R., Ghisalbetti, E.L., Dixon, K.W., Smith, S.M., 2012. Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 107–130.
- Noronha, B.G.D., Medeiros, A.D.D., Pereira, M.D., 2019. Incremento de área em sementes de moringa durante a embebição por meio da análise de imagens. *Ciência Florestal* 29, 221–232.
- Overbeck, G.E., Müller, S.C., Pillar, V.D., Pfadenhauer, J., 2006. No heat-stimulated germination found in herbaceous species from burned subtropical grassland. *Plant Ecol.* 184 (2), 237–243.
- Pausas, J.G., Bradstock, R.A., Keith, D.A., Keeley, J.E., 2004. Plant functional traits in relation to fire in crown-fire ecosystems. *Ecology* 85 (4), 1085–1100.
- Porto, P.R., Sakita, A.E.N., Nakaoka, S.M., 2007. Efeito da aplicação do extrato pirolenhoso na germinação e no desenvolvimento de mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. *IF-Série Registros* 31, 15–19.
- Prodanović, O., Prodanović, R., Bogdanović, J., Mitrović, A., Niilosavić, N., Radotić, K., 2007. Antioxidative enzymes during germination of two lines of Serbian spruce [*Picea omorika* (panc.) purkyae]. *Arch Biol Sci* 59 (3), 209–216.
- Ramos, D.M., Liaffa, A.B., Diniz, P., Munhoz, C.B., Ooi, M.K., Borghetti, F., Valls, J.F., 2016. Seed tolerance to heating is better predicted by seed dormancy than by habitat type in Neotropical savanna grasses. *Int. J. Wildland Fire* 25 (12), 1273–1280.
- Ramos, D.M., Valls, J.F., Borghetti, F., Ooi, M.K., 2019. Fire cues trigger germination and stimulate seedling growth of grass species from Brazilian savannas. *Am. J. Bot.* 106 (9), 1190–1201.
- Ribeiro, L.C., Borghetti, F., 2014. Comparative effects of desiccation, heat shock and high temperatures on seed germination of savanna and forest tree species. *Austral. Ecol.* 39 (3), 267–278.
- Rokich, D.P., Dixon, K.W., Sivasithamparan, K., Meney, K.A., 2002. Smoke, mulch, and seed broadcasting effects on woodland restoration in Western Australia. *Restor. Ecol.* 10 (2), 185–194.
- Santana, V.M., Baeza, M.J., Blanes, M.C., 2013. Clarifying the role of fire heat and daily temperature fluctuations as germination cues for Mediterranean Basin obligate seeders. *Ann. Bot.* 111 (1), 127–134.
- Simon, M.F., Grether, R., de Queiroz, L.P., Skema, C., Pennington, R.T., Hughes, C.E., 2009. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (48), 20359–20364.
- Silva, J.F., Fariñas, M.R., Felfili, J.M., Klink, C.A., 2006. Spatial heterogeneity, land use and conservation in the cerrado region of Brazil. *J. Biogeogr.* 33 (3), 536–548.
- Soares, V.C., Scremin-Dias, E., Daibes, L.F., Damasceno-Junior, G.A., Pott, A., de Lima, L.B., 2021. Fire has little to no effect on the enhancement of germination, but buried seeds may survive in a Neotropical wetland. *Flora* 278, 151801.
- Souza-Silva, A., Zanetti, R., Carvalho, G.A., Mendonça, L.A., 2006. Qualidade de mudas de eucalipto tratadas com extrato pirolenhoso. *Cerne* 12 (1), 19–26.

- Sparg, S.G., Kulkarni, M.G., Light, M.E., Van Staden, J., 2005. Improving seedling vigour of indigenous medicinal plants with smoke. *Bioresour. Technol.* 96 (12), 1323–1330.
- Tormo, J., Moreira, B., Pausas, J.G., 2014. Field evidence of smoke-stimulated seedling emergence and establishment in Mediterranean Basin flora. *J Veg Sci* 25 (3), 771–777.
- Van Staden, J., Brown, N.A., Jäger, A.K., Johnson, T.A., 2000. Smoke as a germination cue. *Plant Species Biol.* 15 (2), 167–178.
- Wanderley, C.D.S., Faria, R.T.D., Ventura, M.U., 2012. Chemical fertilization, organic fertilization and pyroligneous extract in the development of seedlings of areca bamboo palm (*Dyopsis lutescens*). *Acta Scientiarum. Agronomy* 34 (2), 163–167.
- Willis, C.G., Baskin, C.C., Baskin, J.M., Auld, J.R., Venable, D.L., Cavender-Bares, J., NES-Cent Germination Working Group, 2014. The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytol.* 203 (1), 300–309.