

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO - CÂMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -  
AGRONOMIA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM  
SEMENTES DE CAFEZINHO-DO-CERRADO  
(*Rhamnidium elaeocarpum* Reissek) E CURRIOLA (*Pouteria  
ramiflora* Mart. Radlk) SUBMETIDAS À SECAGEM E  
ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA SEMENTE E DO  
DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL**

Autora: Lílian Abadia da Silva  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Fátima Sales

RIO VERDE - GO  
Abril - 2013

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM  
SEMENTES DE CAFEZINHO-DO-CERRADO  
(*Rhamnidium elaeocarpum* Reissek) E CURRIOLA (*Pouteria  
ramiflora* Mart. Radlk) SUBMETIDAS À SECAGEM E  
ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA SEMENTE E DO  
DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL**

Autora: LÍlian Abadia da Silva  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Fátima Sales

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde – como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, Área de concentração Ciências Agrárias.

Rio Verde - GO  
Abril - 2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
Elaborada por Igor Yure Ramos Matos CRB1 - 2819**

S581a Silva, Lílian Abadia da.

Alterações Fisiológicas e Metabólicas em Sementes de Cafezinho-do-Cerrado (*Rhamnidium elaeocarpum* Reissek) e Curriola (*Pouteria ramiflora* Mart. Radlk) submetidas à secagem e aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento Pós-seminal / Lílian Abadia da Silva. - 2013.

125 f.: il., figs, tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Fátima Sales.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2013.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Sementes. 2. Cerrado. 3. Mudanças. 4. Cafezinho-do-Cerrado. 5. Curriola. I. Título. II. Autor. III. Assunto.

CDU: 581.141 (251.3) (81)

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO -  
CÂMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM  
SEMENTES DE CAFEZINHO-DO-CERRADO  
(*Rhamnidium elaeocarpum* Reissek) E CURRIOLA (*Pouteria  
ramiflora* Mart. Radlk) SUBMETIDAS À SECAGEM E  
ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA SEMENTE E DO  
DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL**

Autora: Lílian Abadia da Silva  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Fátima Sales

TITULAÇÃO \_\_\_\_\_, APROVADA em \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 2013.

Prof. Dr. Marcos Antônio Soares  
Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Vania Sardinha dos Santos Diniz  
IFGoiano - Campus Iporá

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Fátima Sales  
IFGoiano - Campus Rio Verde  
(Orientadora)

RIO VERDE - GO  
ABRIL DE 2013

*Aos meus amados pais, Eurípedes Caetano da Silva e Dilair de Fátima Oliveira da Silva, pelo exemplo e apoio, pelos exaustivos sacrifícios em função desta conquista, pelo amor incondicional, pela simplicidade e pelos mais sábios ensinamentos.*

***Dedico!***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre abençoar e guiar os meus passos.

Aos meus pais, Eurípedes Caetano da Silva e Dilair de Fátima Oliveira da Silva, pelo apoio, incentivo, por terem dado a oportunidade de estudar e por não medirem esforços para minha formação acadêmica.

Ao meu namorado, Marcos Douglas do Carmo Mariano, que tanto estimo, pelo apoio, pela paciência, companheirismo e estímulo em nunca me deixar desistir. Por sempre compreender a distância e minha ausência e estar ao meu lado apoiando.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pela oportunidade de cursar o mestrado e pela infraestrutura disponibilizada.

Em especial, a minha Orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Juliana de Fátima Sales, pela confiança depositada em meu trabalho, pelas valiosíssimas orientações prestadas, pela atenção em cada etapa deste trabalho, e principalmente pela grandiosa contribuição para meu crescimento profissional e por me ensinar que as coisas sempre terminam bem. Obrigada por me conduzir a esta conquista!

Aos colegas do Mestrado em Ciências Agrárias, pelos bons momentos juntos, em especial a Deborah Amorim Martins, Glicélia Pereira Silva e Maíra Paixão Resende, que compartilharam comigo alegrias e angústias, pelas caronas e pela convivência muito rica e harmoniosa.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pela contribuição em minha formação, em especial ao Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva, por não medir esforços em conquistar melhorias para o programa e para a pesquisa de um modo geral, permitindo assim, que os discentes desfrutem de laboratórios bem equipados e de total apoio durante as investigações científicas.

Aos amigos do Laboratório de Sementes: Aurélio, Glicélia, Bethânia, Pedro Henrique, Sabrina, Lucas e Lorena, pelo companheirismo no laboratório e pela valiosa ajuda em todas as etapas dos experimentos, mesmo em dias ou horários tão inusitados. A vocês, um agradecimento mais do que especial.

A todos os moradores da “pensão da Jussa”, Josiane, Jussara, Ludmila, Matheus, Mayli, Rhuanna e Vinícius, por terem me acolhido nesta “grande família”, por proporcionarem um ambiente de companheirismo e pelos momentos de descontração.

A equipe do Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial a doutoranda Heloísa Oliveira e ao Prof. Dr. João Almir Oliveira, pela grandiosa colaboração durante a execução dos experimentos.

A Percília Lourenço, da Fazenda Padre Galileu, pela coleta dos frutos de cafezinho e ao Senhor João Adalberto Rodrigues, da Fazenda Gameleira, pelo auxílio durante a coleta e por disponibilizar os frutos de curriola.

À banca de avaliação da defesa de Dissertação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Fátima Sales (Orientadora e Presidente da banca examinadora), Prof. Dr. Marcos Antônio Soares (membro externo - UFMT) e a Prof. Dra. Vania Sardinha dos Santos Diniz (IFGoiano – Campus Iporá).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pela concessão da bolsa.

A todas as pessoas e instituições que, direta ou indiretamente, também me auxiliaram, apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

*Ao proteger um bioma  
Muito se faz, na verdade  
Não se congela em redoma  
Sua biodiversidade*

*Frutos, SEMENTES ou goma  
Dali se pode extrair  
Com o cuidado que se toma  
Para nada destruir*

**Geovane Ales de Andrade**

## BIOGRAFIA DO AUTOR

LÍLIAN ABADIA DA SILVA, filha de Eurípedes Caetano da Silva e Dilair de Fátima Oliveira da Silva, nasceu em Iporá, Goiás, no dia 27 de abril de 1990.

No ano de 2006, concluiu o nível médio pela rede estadual de ensino, no Colégio Estadual “Getúlio Vargas”, em Jaupaci, Goiás.

Em 2007, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Goiás (UEG), Unidade Universitária de Iporá. Em agosto de 2009, ainda no terceiro ano do curso de graduação, ingressou na rede Estadual de ensino como professora, temporária, no ensino fundamental e médio do Colégio Estadual “Getúlio Vargas”, em Jaupaci, Goiás, onde lecionou até o ano de 2010, ano em que concluiu o curso de graduação.

Em agosto de 2011, iniciou o mestrado em Ciências Agrárias pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, realizando a pesquisa para a Dissertação na área de sementes. Concluiu o mestrado acadêmico em 25 de abril de 2013, com a defesa da Dissertação intitulada: Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de cafezinho-do-cerrado (*Rhamnidium elaeocarpum* Reissek) e curriola (*Pouteria ramiflora* Mart. Radlk) submetidas à secagem e aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento pós-seminal.

Atualmente, é professora, em caráter temporário, do IF Goiano-Campus Iporá, lecionando a disciplina Biologia para os Cursos Técnico em Informática e em Agropecuária Integrado ao Ensino Médio.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
1. Domínio Cerrado .....	1
2. Família Rhamnaceae .....	2
2.1 Cafezinho-do-Cerrado ( <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek).....	3
3. Família Sapotaceae .....	3
3.1 Curriola [ <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.].....	4
4. Caracterização morfológica.....	5
5. Desenvolvimento das sementes e conteúdo de água .....	5
6. Tolerância à dessecação .....	6
6.1 Sementes ortodoxas .....	6
6.2 Sementes recalcitrantes.....	7
6.3 Aquisição de tolerância à dessecação .....	8
6.4 Proteínas resistentes ao calor – <i>Heat Shock Proteins</i> (HSPs) .....	9
6.5 Proteínas LEA – ( <i>Late Embryogenesis Abundant</i> ).....	10
6.6 Sistemas antioxidantes (enzimas removedoras de radicais livres).....	11
6.7 Açúcares não redutores.....	13
REFERÊNCIAS.....	14
<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>21</b>

<b>CAPÍTULO 1. Tolerância à dessecação em sementes de cafezinho-do-cerrado, <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek (Rhamnaceae).....</b>	<b>22</b>
Resumo.....	22
Abstract .....	22
Introdução .....	23
Material e métodos .....	26
Resultados e discussão .....	31
Conclusões .....	37
Referências.....	37
<b>CAPÍTULO 2. Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk., colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas à secagem.....</b>	<b>43</b>
Resumo.....	43
Abstract .....	44
Introdução .....	44
Material e métodos .....	47
Resultados e discussão .....	54
Conclusões .....	62
Referências.....	62
<b>CAPÍTULO 3. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de cafezinho-do-cerrado, <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek (Rhamnaceae) .....</b>	<b>68</b>
Resumo.....	68
Abstract .....	68
Introdução .....	69
Material e métodos .....	70
Resultados e discussão .....	72
Conclusões .....	79
Referências.....	80
<b>CAPÍTULO 4. Estudos morfo-anatômicos de sementes e morfológicos de frutos, sementes e plântulas de curriola [<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. - Sapotaceae] 83</b>	
Resumo.....	83
Abstract .....	84
Introdução .....	84
Material e métodos .....	86

Resultados e discussão .....	88
Conclusões .....	96
Referências .....	96
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>99</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1.</b> Tolerância à dessecação em sementes de cafezinho-do-cerrado, <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek (Rhamnaceae).....	20
<b>Tabela 1.</b> Comparação entre os valores médios para índice de velocidade de germinação (IVG); porcentagem de germinação; índice de velocidade de emergência (IVE); porcentagem de emergência em sementes de <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek com diferentes teores de água.....	30
<b>Tabela 2.</b> Comparação entre os valores médios para condutividade elétrica (CE) e taxa respiratória (TR) das sementes de <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek com diferentes teores de água.....	31
<b>CAPÍTULO 2.</b> Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk., colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas à secagem.....	42
<b>Tabela 1.</b> Índice de velocidade de germinação (IVG); porcentagem de germinação (% G); índice de velocidade de emergência (IVE) e porcentagem de emergência de plântulas (% E) para sementes de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água .....	53
<b>Tabela 2.</b> Condutividade elétrica (CE) e taxa respiratória (TR) de sementes de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água.....	56
<b>Tabela 3.</b> Concentrações de açúcares redutores (AR); açúcares solúveis totais (AST) e de sacarose (S) em sementes de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água .....	57
<b>CAPÍTULO 3.</b> Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de cafezinho-do-cerrado, <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek (Rhamnaceae) .....	68

<b>Tabela 1.</b> Comprimento, largura e espessura de frutos de <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek.....	72
<b>Tabela 2.</b> Comprimento, largura e espessura de sementes de <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek.....	73
<b>CAPÍTULO 4.</b> Estudos morfo-anatômicos de sementes e morfológicos de frutos, sementes e plântulas de curriola [ <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. - Sapotaceae] ....	82
<b>Tabela 1.</b> Valores médios de comprimento, largura e espessura em sementes de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Padrão eletroforético de diferentes enzimas em sementes de <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek, submetidas a secagem à temperatura de 35°C, e com diferentes teores de água; A - $\alpha$ -amilase; B - catalase; C - esterase; D - peroxidase. (U.I.- umidade inicial - 37% b.u.; 20% b.u.; 12% b.u.). Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012.....	32
<b>Figura 2:</b> Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes de <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek com diferentes teores de água. (37% b.u; 20% b.u.; 12% b.u.). *Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Barra: Erro padrão da média. Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012.....	34
<b>Figura 3.</b> Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> Reissek com diferentes teores de água. (M – marcador de peso molecular; U.I – umidade inicial 37% b.u.; 20% b.u.; 12% b.u.). Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012 .....	35
<b>CAPÍTULO 2.</b> Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk., colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas à secagem.....	42
<b>Figura 1.</b> Imagens radiográficas de sementes de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água. Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012 .....	55
<b>Figura 2.</b> Padrão eletroforético das enzimas $\alpha$ -amilase (A) e esterase (B) em sementes de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água. (U.I – Umidade Inicial – 38%; M – madura; V – verde). Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012 .....	59

**Figura 3.** Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água. Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012. Barra: Erro padrão da média..... 61

**CAPÍTULO 3.** Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de cafezinho-do-cerrado, *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek (Rhamnaceae) ..... 68

**Figura 1.** Frutos de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek. A – Ramos com frutos verdes e maduros; B – Infrutescência com frutos maduros; C – Frutos em diferentes estádios de maturação; D; E; F – Frutos maduros; G – Fruto/corte longitudinal. (en – endocarpo; ep – epicarpo; me – mesocarpo; s – semente) ..... 73

**Figura 2.** Sementes de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek; A – Sementes inteiras; B – Semente/Corte transversal; C; D – Semente/Corte longitudinal; E; F – imagens radiográficas das sementes. (c – cotilédone; ehr – eixo hipocótilo radicular; en – endosperma; h – hilo; mi – micrópila; t – tegumento). Barra 1,0 cm..... 74

**Figura 3.** Cortes transversais em semente de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek. A – visão geral do tegumento; B – visão geral do endosperma; C – endosperma com células amiláceas e destaque para célula com drusas; D – endosperma com destaque dos ductos oleíferos; E – conteúdo tanífero no tegumento; F – células ricas em material lipídico. (Ag – ácidos graxos; Ca – células com conteúdo amilífero; Cr – Cristais retangulares; D – drusas; Do – ductos oleíferos; Ep – epiderme; Es – Esclerênquima; Tn - conteúdo tanífero no tegumento)..... 76

**Figura 4.** Aspectos da germinação de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek; A - intumescimento da semente e protrusão radicular; B; C; D – Alongamento da raiz primária e desenvolvimento de raízes secundárias; E – Aparecimento do epicótilo; F – Expansão do epicótilo. (c – cotilédone; co – coifa; ep – epicótilo; hp – hipocótilo; p – pelos absorventes; rp – raiz primária; rs – raiz secundária; s – semente; t – tegumento); Barra: 1,0 cm para A e B; 2,0 cm para E e F..... 77

**Figura 5.** Desenvolvimento de plântulas de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek; A – Aparecimento dos protofilos de 1ª ordem; B a D - Desenvolvimento de raízes secundárias e terciárias; E – Expansão dos protofilos; F – Plânta jovem completamente formada. (ca – caule; cj - caule jovem; ep – epicótilo; f – folha; hp – hipocótilo; pro – protofilo; ps – plântula secundária; rp – raiz primária; rs – raiz secundária; rt – raiz terciária). Barra: 3,0 cm para A; 5,0 cm para E e F..... 78

**CAPÍTULO 4.** Estudos morfo-anatômicos de sementes e morfológicos de frutos, sementes e plântulas de curriola [*Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. - Sapotaceae] .... 82

**Figura 1.** Frutos de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. A – ramos com frutos verdes; B;C – frutos maduros; D– fruto maduro/corte longitudinal; E – frutos em diferentes estádios de maturação/corte longitudinal. (ap – ápice; ba – base; en – endocarpo; fv – feixe vascular; ep – epicarpo; me – mesocarpo; pd – pedúnculo; s – semente). Barra 3,0 cm..... 88

**Figura 2.** Sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. A – sementes inteiras em diferentes estádios de maturação; B – semente/vista frontal; C – semente/vista lateral; D - cotilédones; E; F – sementes/Corte longitudinal; G – sementes/Corte longitudinal lateral; H – Cotilédone com destaque para o eixo hipocótilo-radicular/corte longitudinal; I; J – imagens radiográficas das sementes. (ap – ápice; ba – base; c – cotilédone; ehr – eixo hipocótilo-radicular; h – hilo; mi – micrópila; ra – rafe; t – tegumento). Barra 2,0 cm..... 90

**Figura 3.** Cortes transversais em semente de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. A – estratos externo e intermediário do tegumento; B – estrato interno do tegumento; C – tecidos do cotilédone com grãos de amido; D - célula com conteúdo tanífero em destaque; E – células com taninos evidenciada por coloração com vanilina clorídrica; F – células dos tecidos do cotilédone com ácidos graxos (material lipídico). (Ag – ácidos graxos; C – cutícula; Ca – células com conteúdo amilífero; Ct – Célula com conteúdo tanífero; Ep – epiderme; Es – Esclerênquima; Pa – parênquima) ..... 92

**Figura 4.** Germinação de sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. A - estádios sucessivos de desenvolvimento - intumescimento da semente, protrusão e alongamento da radícula; B; C; D – alongamento da raiz primária e surgimento do epicótilo; E – alongamento da raiz primária e desenvolvimento de raízes secundárias; F – expansão do epicótilo, do hipocótilo e da raiz primária. (c – cotilédone; co – coifa; ep – epicótilo; hp – hipocótilo; p – pelos absorventes; pro- protófilo; rp – raiz primária; rs – raiz secundária; t – tegumento). Barra: 2,0 cm para C e E; 4,0 cm para F ..... 93

**Figura 5.** Desenvolvimento de plântulas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. A – E – Aparecimento e expansão dos protofilos de 1ª ordem, alongamento da raiz principal, desenvolvimento de raízes secundárias; F; G - Aparecimento e expansão dos protofilos de 2ª ordem; H;I – Desenvolvimento das folhas e do caule jovem (ca – caule; c – cotilédone; cl – coleto; co – coifa; ep – epicótilo; f – folha; hp – hipocótilo; pro 1 –

perfilo de 1ª ordem; pro 2 – perfilo de 2ª ordem; rp – raiz primária; rs – raiz secundária; t - tegumento). Barra: 4,0 cm para B, C e D; 5,0 cm para F e 7,0 para I..... 94

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

ABA	Ácido abscísico
B.O.D	Câmara de Germinação com controle de temperatura e fotoperíodo
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HSPs	<i>Heat Shock Proteins</i> (Proteínas resistentes ao calor)
IVE	Índice de Velocidade de Emergência
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
kDa	Unidade de massa atômica ou kilo Dalton
KOH	Hidróxido de Potássio
LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant</i> (Proteínas da embriogênese tardia)
MPa	Megapascal
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxila
UFPA	Universidade Federal de Lavras
UR	Umidade Relativa

## RESUMO

O Cerrado possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo, com 10.000 espécies de plantas, dentre as quais são encontradas inúmeras espécies medicinais e frutíferas de importância extrativista para as populações tradicionais. A produção de mudas de espécies nativas para utilização em programas de reflorestamento e o armazenamento de sementes de espécies florestais do Cerrado ainda são dificultados pela indisponibilidade de informações sobre as características morfológicas e fisiológicas das sementes de grande parte das espécies. Assim, faz-se necessário o investimento em pesquisas que visem determinar tais características das sementes, a fim de estabelecer estratégias de conservação e contribuir para o estabelecimento de protocolos para a produção de mudas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de cafezinho-do-cerrado (*Rhamnidium elaeocarpum* Reissek) e curriola (*Pouteria ramiflora* Mart. Radlk) quando submetidas à secagem, além de elucidar os caracteres morfológicos dos frutos, das sementes e do desenvolvimento pós-seminal, auxiliando a compreensão do ciclo de vida e crescimento destas espécies. Para atingir o objetivo proposto, parte das sementes, de cada espécie, foram mantidas em estufa de secagem com circulação de ar à temperatura de 35°C até alcançarem os teores de água de 20 e 12% base úmida (b.u.) e outra parte permaneceu com o teor de água inicial. Após os tratamentos de secagem foram realizadas avaliações do comportamento fisiológico e do vigor das sementes (germinação; índice de velocidade de germinação; emergência; índice de velocidade de emergência; condutividade elétrica e taxa respiratória) e das variações bioquímicas (perfil eletroforético das isoenzimas: catalase, peroxidase e esterase; atividade enzimática de endo- $\beta$ -mananase e  $\alpha$ -amilase e análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor). Além disso, parte das sementes úmidas foram utilizadas para as investigações das características morfológicas. As sementes de *R. elaeocarpum* Reissek responderam positivamente ao processo de secagem, mantendo

sua qualidade fisiológica e seu vigor, além de apresentaram proteínas de baixo peso molecular resistentes ao calor, variando de 48,7 a 13,2 kDa, sendo consideradas tolerantes à dessecação. Por outro lado, sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. apresentaram redução do potencial fisiológico e do vigor, além de alterações bioquímicas quando submetidas à secagem, e são intolerantes à dessecação, sendo esta intolerância mais evidenciada antes das sementes atingirem a maturidade fisiológica. Com relação às características morfológicas, ambas as espécies apresentam germinação hipógea e desenvolvimento de plântulas criptocotiledonar, além de aspectos morfológicos bastante homogêneos e confiáveis para a identificação das espécies em campo ou em estudos de regeneração natural.

## ABSTRACT

The Cerrado has the richest flora among the world's savannas, with 10.000 species of plants, which are found numerous of medicinal and fruit species with extractive importance for traditional populations. The production of native species for use in reforestation programs and storing seeds of Cerrado species are still hampered by the unavailability of information about morphological and physiological characteristics of seeds of most species. Thus, it is necessary to invest in research aimed to determine such seeds characteristics in order to establish conservation strategies and contribute to the establishment of protocols for seedlings production.. In this sense, the objective of this study was to investigate the physiological and biochemical changes in seeds of cafezinho-do-cerrado (*Rhamnidium elaeocarpum* Reissek) and Curriola (*Pouteria ramiflora* Mart. Radlk) when dried, besides elucidating the morphological characters of fruits, seeds and of the post-seminal development aiding the understanding of the life cycle and growth of these species. To reach that goal, part of the seeds of each species were kept in the oven with circulating air at 35°C until they reached the water contents of 20 and 12% wet basis (wb) and another part remained with the initial content water. After the drying treatments were evaluated physiological behavior and seed vigor (germination, germination speed index emergency, emergency speed index, electrical conductivity and respiratory rate) and biochemical changes (electrophoretic isoenzyme profile: catalase peroxidase and esterase; enzymatic activity of endo- $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -amylase and electrophoretic analysis of proteins resistant to heat). Furthermore, parts of the wet seed were used for the investigation of morphological characteristics. The seeds of *R. elaeocarpum* Reissek responded positively to the drying process, maintaining their physiological quality and vigor, and showed heat-resistant protein of low molecular weight ranging from 48.7 to 13.2 kDa being considered tolerant to desiccation. Furthermore, seeds of *P. ramiflora* (Mart.) Radlk. decreased their

physiological potential and vigor, also had biochemical changes when subjected to drying, and are intolerant to desiccation, which is most evident before the seeds reach physiological maturity. With respect to morphology, both species present hypogeal germination and cryptocotyledonary seedling development, also had homogeneous and reliable morphological aspects for species identification in the field or in studies of natural regeneration.

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Domínio fitogeográfico do Cerrado

O Cerrado não é um bioma único, mas um complexo de biomas, com grande variação fisionômica, indo do campo limpo (bioma dos campos tropicais), passando pelas fisionomias intermediárias (bioma das savanas) e chegando ao cerradão (bioma das florestas estacionais), sendo um dos mais importantes domínios fitogeográficos encontrados no Brasil (BATALHA, 2011; COUTINHO, 2006).

O Cerrado ocupa 21% do território nacional e é considerado a última fronteira agrícola do planeta (BORLAUG, 2002). É considerado um dos *'hotspots'* para a conservação da biodiversidade mundial. No entanto, durante os últimos 35 anos, com o advento da agricultura moderna no Cerrado para a produção de soja, milho e arroz, e a expansão das áreas de pastagens plantadas para a criação de bovinos, estima-se que mais da metade dos seus 2 milhões de km<sup>2</sup> originais foram destruídos (KLINK; MACHADO, 2005; RATTER et al., 2006). Estudos recentes mostram que, apenas 20% da cobertura original do Cerrado em todo o país permanecem intactos, e somente 2,2% deste domínio estão inseridos em áreas protegidas (MACHADO et al., 2004). A área total para conservação é cerca de 33.000 km<sup>2</sup>, claramente insuficiente quando comparada com os principais usos da terra no Cerrado (KLINK; MACHADO, 2005).

Este domínio possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo, com alto nível de endemismo. Estima-se que o Cerrado Brasileiro contribua com 10.000 espécies de plantas, das 60.000 fanerógamas distribuídas pelo país, sendo encontradas inúmeras espécies medicinais e frutíferas de importância extrativista para as populações tradicionais (GUSMÃO et al., 2006). Várias espécies são conhecidas como fonte de compostos de interesse biotecnológico, com aplicações medicinais e na indústria de alimentos (CARAMORI, 2004). Atualmente, grande número de cientistas tem

ressaltado a urgência em proteger a rica biodiversidade do Cerrado. No entanto, a destruição do Cerrado ainda é negligenciada pela mídia (RATTER et al., 1997).

Com relação as sementes das espécies nativas, a maior parte apresenta difícil propagação seminífera, por terem heterogeneidade no processo de maturação dos frutos e sementes com algum tipo de dormência, comprometendo a germinação e a formação de mudas em escala comercial. O uso de espécies nativas em programas de reflorestamento de reservas em áreas degradadas ou matas ciliares requer a produção contínua de grande número de mudas. Em condições naturais ou de viveiros, a germinação destas é irregular e lenta e suas sementes perdem rapidamente o poder germinativo (LUIS, 2008).

## **2. Família Rhamnaceae**

A família Rhamnaceae é composta aproximadamente por 58 gêneros e 900 espécies com distribuição cosmopolita, sendo representada por 23 gêneros e 170 espécies na região neotropical (HEALD, 2004). Compreende árvores, arbustos, ervas ou lianas, inermes ou espinescentes. Possuem folhas simples, alternas ou opostas, flores pediceladas ou sésseis, frutos drupáceos, capsulares ou esquizocarpos, alados ou não e sementes geralmente elipsoides, obovadas ou oblongas, castanhas, com embrião basal, reto; cotilédones planos, membranáceos, elipsoides ou oblongos (LIMA, 2011).

As espécies dessa família são caracterizadas por apresentar flores com pétalas opostas aos estames, sendo uma característica relativamente rara nas angiospermas, ocorrendo na família Rhamnaceae e está associada com outras famílias, como Vitaceae e Cornaceae. Alguns membros da família apresentam adaptações xeromórficas tais como ausência de folhas ou presença em números reduzidos, folhas aglomeradas, encurtamento dos eixos de filiais, presença de espinhos, e hábito arbustivo. É necessária a reclassificação de algumas tribos em Rhamnaceae, baseando em grande parte em dados moleculares e com o apoio de alguns caracteres morfológicos (RICHARDSON et al., 2000).

Muitos representantes desta família são utilizados como ornamentais, na medicina popular, na fabricação de cosméticos e na alimentação de animais, principalmente de aves. Os frutos geralmente são doces e já estão sendo inseridos na alimentação humana sob a forma de doces e geleias (LIMA, 2006).

### **2.1. Cafezinho-do-Cerrado (*Rhamnidium elaeocarpum* Reissek)**

O *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek, conhecido popularmente como cafezinho-do-cerrado ou apenas cafezinho (GO, SP), tarumaí, saguaraji (SP), saguaraji-amarelo (SP), cabrito (MS), azeitona, pau-brasil (MG), é uma espécie sul-americana com ampla distribuição no Brasil, ocorrendo em quase todos os estados, sendo encontrada em matas, sobretudo matas ciliares. É uma planta decídua, heliófita e seletiva higrófito, com altura de 4-16 m e tronco de 30-50 cm de diâmetro, revestido por casca pardacenta. As folhas são opostas cruzadas simples, hipostomáticas, com tricomas tectores sobre as nervuras. Possui flores amarelas, bissexuadas, pubescentes, florescendo durante os meses de outubro-novembro. O Fruto é do tipo drupa elipsoide a oblonga arroxeada, com polpa doce, amadurecendo no período de dezembro-março. Possuem uma única semente, que deve ser colocada para germinar logo após a coleta e a emergência das plântulas ocorre entre 5-15 dias, com germinação total para sementes recém-colhidas (LIMA, 2011; LORENZI, 2008).

As folhas e cascas são utilizadas popularmente no Brasil para reduzir o prurido das gengivas de crianças no início da dentição e para dores estomacais. As cascas das raízes possuem cicatrizes ou fendas na face externa e fratura fibrosa na face interna. O extrato metanólico das folhas apresenta quantidades consideráveis de flavonoides, alcaloides, saponinas e taninos. Esses dados sugerem que a presença dessa classe de substâncias pode ser responsável pela atividade antiúlcera apresentada por esse extrato, já que esse tipo de composto desempenha boa atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2010).

A madeira é própria para obras externas, como mourões, postes, dormentes, pontes, para construção civil e obras hidráulicas. Os frutos são consumidos por várias espécies de pássaros, que a torna bastante recomendável para reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas (LORENZI, 2008).

### **3. Família Sapotaceae**

A família Sapotaceae está subordinada à Ordem Ericales e tem cerca de 53 gêneros e 1.100 espécies (APG III, 2009). No Brasil é constituída por aproximadamente 245 espécies distribuídas em 11 gêneros. No bioma Cerrado, ocorrem pelo menos sete gêneros e cerca de 20 espécies, sendo sete do gênero *Pouteria* (MENDONÇA et al., 1998). As espécies são geralmente de hábito arbóreo e arbustivo, com ampla

distribuição nas áreas tropicais e subtropicais do mundo (SOUZA e LORENZI, 2005). Com considerável importância econômica, espécies utilizadas na extração de madeira, produção de frutos comestíveis, produção de látex, utilizados na medicina popular e como ornamentais. O gênero *Pouteria* Aublet é o maior da família Sapotaceae tendo o Brasil expressiva representatividade nas 188 espécies representadas na região Neotropical, sendo necessárias investigações adicionais para melhor compreender sua taxonomia (MONTEIRO et al., 2007). Além da sua importância comercial, várias espécies são usadas na medicina popular como antioxidantes, anti-inflamatórios, antibacteriana e antifúngica, mas seu real potencial como fonte de novos fármacos ainda é pouco conhecido. Os Triterpenos e os flavonoides são os principais constituintes químicos das espécies deste gênero (SILVA et al., 2009).

### 3.1 Curriola [*Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.]

A espécie *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk, popularmente conhecida como curriola, abiú-do-cerrado, ou abiu-piloso, é uma espécie frutífera, de hábito arbustivo-arbóreo, amplamente distribuída em áreas de Cerrado. Os frutos apresentam cheiro forte e sabor agradável, de coloração esverdeada e polpa branca, sendo apreciada pelas populações locais na forma de suco ou mesmo *in natura* (DALPONTE e LIMA, 1999). Possui flores pequenas hermafroditas ou pistiladas e arranjas em inflorescências racemosas com eixo curto, dispostas densamente nas axilas das folhas, ao longo dos ramos. Apresenta caducifólia, que ocorre de agosto a setembro, com os indivíduos que produzem maior quantidade de frutos perdendo todas as folhas durante a maturação destes. A floração ocorre de maio a setembro, com pico de flores abertas em agosto, em plena estação seca, e a maturação dos frutos ocorre no período chuvoso, favorecendo a dispersão das sementes (GAMA et al., 2011).

Extratos obtidos das folhas de *P. ramiflora* apresentam atividade antinociceptiva (impede a percepção da sensação de dor) e alta toxicidade para larvas de *Artemia salina* (NUNES, 2004; CASTRO et al., 2006). O licor pirolenhoso de sua madeira desempenha atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Trichoderma sp.* (COSTA et al., 2003). Além disso, o extrato das folhas da planta exerce um efeito neuroprotetor contra danos oxidativos e é capaz de prevenir a perda neuronal do hipocampo nos subcampos CA3 e hilo de ratos diabéticos (COSTA et al., 2013).

#### **4. Caracterização morfológica**

As informações fornecidas por estudos do crescimento e desenvolvimento pós-seminal apresentam grande importância sob o ponto de vista taxonômico, auxiliando a identificação das estruturas essenciais da plântula, contribuindo para a compreensão do ciclo de vida e crescimento de espécies florestais e na interpretação dos testes de germinação (MOURÃO et al., 2002; OLIVEIRA, 1993). Além disso, podem oferecer informações importantes sobre o desenvolvimento da espécie, servindo como subsídio para a produção de mudas e permitindo melhor compreensão do processo de estabelecimento da planta em condições naturais da floresta (GUERRA et al., 2006). Estudos relacionados à morfoanatomia de frutos e sementes de espécies florestais são relevantes para a compreensão de vários fenômenos ligados ao comportamento dessas espécies (GARCIA et al., 2006).

O conhecimento da morfologia dos frutos e diásporos de dispersão, bem como as características biométricas, fornecem subsídios importantes para a diferenciação de espécies pioneiras e não pioneiras em florestas tropicais para os estudos de sucessão ecológica e regeneração de ecossistemas florestais (CRUZ et al., 2001).

#### **5. Desenvolvimento das sementes e conteúdo de água**

O processo de maturação das sementes pode ser dividido em quatro fases. As fases I e II compreendem a divisão e expansão (alongamento) celular; a fase III é caracterizada pelo acúmulo de reservas e o aumento progressivo da massa de matéria seca. Na fase IV, em que ocorre o final do processo de transferência de matéria seca, intensifica-se a desidratação das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

A perda de água durante a maturação das sementes é o evento terminal e normal no desenvolvimento de muitas espécies, que passam por um período metabolicamente quiescente. O grau de umidade da semente se estabiliza durante a fase III do desenvolvimento, quando há acúmulo de reservas insolúveis, e então é durante a fase IV (secagem) que ocorre a perda de água. Estas sementes podem permanecer neste estado desidratado de alguns dias ou muitos anos, sem perder sua viabilidade. No entanto, há um grupo de sementes que no final da maturação não são capazes de suportar a perda de água, e por isso não passam pela fase IV, necessitando manter conteúdo relativamente alto de água para se manter viáveis (BEWLEY; BLACK, 1994).

A água é encontrada nas sementes na forma livre ou retida (ligada). A livre pode se movimentar de uma região para outra, e pode ser removida de maneira relativamente fácil com a secagem, enquanto a retida exige maior dispêndio de energia para sua movimentação. A água ligada ou subcelular está fortemente associada à superfície de macromoléculas, por isso, sua retirada pode causar danos às células (MARCOS FILHO, 2005).

## **6. Tolerância à dessecação**

A tolerância à dessecação é um mecanismo que possibilita que organismos passem por processo rigoroso de secagem e mantenham suas atividades fisiológicas quando reidratados (BARTES, 2005)

Durante a fase final da maturação das sementes, o ácido abscísico (ABA) é um dos responsáveis pela aquisição da tolerância à dessecação. Normalmente o conteúdo de ABA durante o início da embriogênese é baixo, atingindo níveis mais elevados na fase intermediária desse processo, sendo que entre as fases intermediárias e tardias do desenvolvimento da semente ocorre o acúmulo de RNA's mensageiros específicos em resposta à concentração do ABA (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A condição fisiológica da semente foi inicialmente estudada por Roberts (1973), que classificou as sementes em ortodoxas ou recalcitrantes de acordo com o comportamento no armazenamento. Mais tarde, Ellis et al. (1990) introduziram o conceito de intermediárias. Como este aspecto fisiológico está relacionado com o grau de tolerância das sementes à desidratação, deve-se classificá-las como tolerantes à dessecação ou ortodoxas; não tolerantes à dessecação ou recalcitrantes e ainda as intermediárias, cujo comportamento durante a secagem e armazenamento possuam ora características semelhantes às ortodoxas ora às recalcitrantes.

### **6.1 Sementes tolerantes à dessecação ou ortodoxas**

Sementes ortodoxas são capazes de tolerar a secagem, sendo possível seu armazenamento por longos períodos de tempo, em condições de baixa umidade, sem que ocorram alterações em sua capacidade germinativa (ROBERTS, 1973).

Segundo Black et al. (2002), sementes com características ortodoxas podem ser armazenadas usando os protocolos padrões recomendados de secagem para armazenamento até  $0,05 + 0,02g$  de água/ $g^{-1}$  de massa seca, ou 5% de teor de água em base úmida, e armazenados em congelador a aproximadamente  $-18^{\circ}C$ . A longevidade

de armazenamento pode ser prevista a partir da temperatura e do conteúdo de água na semente. Os mesmo autores classificam as sementes recalcitrantes como sendo aquelas que não sobrevivem quando dessecadas até o potencial hídrico menor que aproximadamente  $-15$  MPa (em torno de 90% UR).

Em sementes ortodoxas, a aquisição de tolerância à dessecação ocorre durante seu processo de formação, próximo à metade da fase de maturação. Durante a deposição de reservas, o grau de umidade das sementes é gradualmente reduzido, promovendo a redução do metabolismo celular. Neste momento, ocorrem alterações na expressão gênica e eventos metabólicos, que permitem às sementes tolerar períodos de seca prolongada, após a dispersão (ALPERT; OLIVER, 2002).

## **6.2 Sementes intolerantes à dessecação ou recalcitrantes**

Sementes recalcitrantes, não suportam a dessecação abaixo de 12% de teor de água e apresentam curto período de viabilidade, de no máximo poucos meses, uma vez que são dispersas com altos teores de água e continuam metabolicamente ativas (ROBERTS, 1973).

A interpretação do significado do termo “recalcitrante” tem sido debatida em inúmeras oportunidades. O significado da palavra remete ao seu desempenho, que foge aos padrões exibidos pelas sementes da maioria das espécies, que são ortodoxas. Termos alternativos são propostos, como sensível à dessecação ou não sensível à dessecação, para descrever o comportamento das sementes recalcitrantes e ortodoxas, respectivamente (MARCOS FILHO, 2005).

Recentemente, a ideia de recalcitrante, ou intolerante à desidratação foi modificada de fator de “tudo ou nada” para fator mais quantitativo. Farrant et al. (1988) sugeriram que existem diferentes tipos de sementes recalcitrantes: minimamente, moderadamente e altamente recalcitrantes, suas características estão relacionadas, em parte, com o habitat. Nas espécies minimamente recalcitrantes, as sementes podem suportar a perda de graus de umidade maiores, e podem permanecer viáveis por períodos mais longos. Estas espécies possuem uma distribuição subtropical, e por isso também toleram temperaturas baixas. As moderadamente recalcitrantes toleram a perda de conteúdos moderados de água e são sensíveis a temperaturas baixas e possuem distribuição tropical. As altamente recalcitrantes toleram a perda de conteúdos de umidades mínimos e não toleram temperaturas baixas. Ocorrem em florestas tropicais e em áreas alagadas e de mangue.

Espécies que possuem sementes recalcitrantes são comuns em florestas tropicais, assim, possuem melhores condições para a germinação e estabelecimento das plântulas, em virtude das ótimas condições de temperatura e precipitação (PAMMENTER; BERJAK, 2000).

### **6.3 Aquisição de tolerância à dessecação**

A dessecação das sementes pode causar danos às células durante a remoção de água das sementes. A água apresenta propriedades físicas que a caracterizam como o solvente biológico ideal. Assim, a retirada de água acarreta mudanças nas propriedades fisiológicas e bioquímicas das células (WALTERS et al., 2002).

No desenvolvimento das sementes, durante a fase de dessecação, sementes ortodoxas chegam a atingir níveis de água de 5-10% e podem, frequentemente, ser desidratadas para teores de água de até 1-5%, com pouca ou nenhuma perda de viabilidade. No entanto, quando a desidratação ocorre, condensa-se o citoplasma e os componentes intracelulares ficam desorganizados. Estas condições proporcionam um ambiente para a ocorrência de inúmeras interações indesejáveis que podem levar à agregação e desnaturação de proteínas, desorganização das organelas das células e fusão de membrana (HOEKSTRA et al., 2001).

Vários mecanismos são associados à aquisição e manutenção da tolerância à dessecação de sementes, conferindo proteção contra as consequências da perda de água em diferentes níveis de hidratação. Devido ao fato da água afetar as condições da célula de muitas maneiras, os tecidos que sobrevivem a sua remoção têm uma combinação de estratégias para limitar os danos resultantes da desidratação. Em organismos que sobrevivem à remoção de água, seus constituintes celulares estão protegidos ou podem ser reparados (WALTERS et al., 2001).

A presença de açúcares solúveis e de enzimas que atuam contra o sistema de oxidação lipídica, antioxidantes e de proteínas específicas (LEA proteínas) são envolvidos na aquisição e manutenção da tolerância à dessecação, conferindo proteção contra as consequências da perda de água, em diferentes níveis de hidratação. Apesar de serem determinados geneticamente, a presença desses mecanismos pode ser intensificada ou reduzida de acordo com a taxa de secagem da semente ou com o meio ambiente no qual a semente se desenvolveu (FARRANT et al., 2004).

#### 6.4 Proteínas resistentes ao calor - *heat shock proteins* (HSPs)

Organismos evoluíram grande variedade de mecanismos para adaptação a ambientes estressantes. Um dos mecanismos mais estudados na adaptação dos organismos à condição de estresse térmico é a indução de proteínas resistentes ao calor, *heat shock proteins* (HSPs), que inclui várias famílias de proteínas conservadas. A função das HSPs tem sido relacionada com a preservação e o reparo das estruturas macromoleculares durante a desidratação ou reidratação, respectivamente. Embora todos os organismos sintetizem HSP em resposta ao calor, o balanço de proteínas sintetizadas e a relativa importância das famílias individuais de HSPs na tolerância ao estresse variam enormemente entre organismos (QUEITSCH et al., 2000).

O perfil de expressão de HSPs durante o desenvolvimento da semente coincide com a aquisição de tolerância à dessecação, e estas proteínas são essenciais para este processo fisiológico (KOTAK et al, 2007). Em geral as diversas classes de HSPs começam a se acumular na metade da fase de maturação de embriões e aumentam a síntese ao final da fase de acúmulo de reservas, coincidindo com o período de desidratação em sementes ortodoxas (WEHMEYER et al, 2000).

As principais classes das HSPs, citadas por Hong e Vierling (2000), estão presentes em plantas e incluem proteínas de peso molecular que variam de 15 a 28 kD. Embora a função de proteínas resistentes ao calor ainda não esteja bem esclarecida, sua estabilidade, afinidade com moléculas de água e abundância em organismos que toleram a desidratação, sugerem a importância de seu papel para a aquisição de tolerância à dessecação.

Embora as sementes possam acumular proteínas resistentes ao calor durante o seu desenvolvimento, sua presença por si só parece não ser responsável pela tolerância à alta temperatura de secagem, e outros fatores podem estar influenciando essa característica (JOSÉ et al., 2005).

Proteínas resistentes ao calor foram identificadas em eixos embrionários de sementes de soja. O nível destas proteínas foi correlacionado com a tolerância à dessecação, tanto na fase de desenvolvimento como na germinação das sementes, aumentando 44 dias após o florescimento, quando a tolerância à dessecação foi alcançada, e diminuindo após 18 horas de embebição, quando a tolerância foi perdida. Sementes de soja em desenvolvimento acumulam proteínas da maturação estáveis ao

calor, porém, o desenvolvimento da tolerância à dessecação não se correlaciona com este acúmulo (BLACKMAN et al., 1991).

### **6.5 Proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*)**

Um grupo de proteínas denominadas *late embryogenesis abundant* (LEA) tem recebido grande atenção por parte dos pesquisadores, e dentre elas, as da família LEA D11, também conhecidas por deidrinas. Além de se acumularem nas sementes no final da maturação, essas proteínas são produzidas por partes vegetais da planta, em resposta a estresses ambientais, como o hídrico (MARCOS FILHO, 2005).

A dessecação de sementes em desenvolvimento é caracterizada pelo acúmulo de um grupo particular de mRNAs e proteínas *late embryogenesis accumulated* (LEA) relacionadas. Os mRNAs codificadores de LEA aparecem em tecidos embrionários, no começo da dessecação, e tornam-se as mais prevalentes espécies de mRNA no estado seco, declinando progressivamente várias horas após a embebição da semente. Proteínas do tipo LEA são ricas em glicina e outros aminoácidos hidrofílicos e apresentam poucos resíduos hidrofóbicos, são extraídas em condições de alta temperatura e não apresentam nenhuma atividade catalítica aparente (GOYAL et al., 2005).

As LEA proteínas geralmente são capazes de proteger outras proteínas ou membranas, de modo semelhante aos açúcares, agindo como moléculas de reposição de água (BOUDET, et al., 2006). Outra possibilidade é a de que estas proteínas têm funções diferentes em diferentes graus de umidade e ainda podem ter propriedades antioxidantes que minimizem os efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio (MOWLA et al., 2006).

Estudos recentes de bioinformática sugerem que as proteínas LEA podem se comportar como chaperonas, no entanto, não atuam como chaperonas moleculares clássicas, mas executam efeito protetor e agem em sinergia com os chamados chaperones químicos. Neste sentido, é proposto o modelo no qual as LEA proteínas podem agir como nova forma de chaperonas moleculares, ou “Escudo molecular”, para ajudar a prevenir a formação de agregados de proteínas durante o estresse hídrico (GOYAL et al., 2005).

## 6.6 Sistemas antioxidantes (enzimas removedoras de radicais livres)

Os sistemas antioxidativos estão presentes nos diferentes tecidos das plantas, impedindo o acúmulo de substâncias tóxicas gerado pela oxidação. Esses sistemas protetores são compostos de constituintes enzimáticos e não enzimáticos, sendo os enzimáticos de fundamental importância, são os primeiros a agir, evitando o acúmulo do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio (BONOME, 2006).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de radicais livres, a atividade de EROS e a ação das moléculas antioxidantes de defesa contra estes EROS. A consequência do estresse oxidativo é o aumento na formação de macromoléculas celulares oxidadas. Para prevenir o dano oxidativo aos componentes celulares, as células possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para a detoxificação (KIBINZA et al., 2011).

Entre estes EROS, o  $H_2O_2$  é muitas vezes considerado como o mais crítico, porque é estável em pH biológico e atravessa as membranas e pode causar danos celulares graves, pelo poder altamente agressivo do  $OH^-$  (BIENERT et al., 2006).

As principais enzimas utilizadas nas vias de detoxicação das espécies reativas de oxigênio (EROS), em plantas são: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPOX) e guaiacol peroxidase (GPX) (EDREVA, 2005; MITTLER, 2002).

A Catalase (CAT) é uma enzima que tem por função catalisar a redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ). A inibição da CAT leva ao aumento das espécies reativas de oxigênio, proporcionando ao organismo um estresse oxidativo (SILVA, et. al, 2008). Em plantas existem pelo menos três tipos de Catalases distintas, sendo um desses tipos abundantes em sementes e plantas novas e sua atividade é relacionada com a remoção do excesso de  $H_2O_2$  produzido pela degradação de ácidos graxos no ciclo do glioxilato nos glioxissômos (VAN BREUSEGEM et al., 2001). Recentemente, evidenciou-se que a localização da enzima catalase, em sementes, coincide com os espaços citosólicos que apresentam elevada concentração de  $H_2O_2$ . Deste modo, a indução da catalase e sua colocação com espaços ocupados pelo  $H_2O_2$  asseguram a desintoxicação eficaz dos EROS que resultariam na deterioração das sementes (KIBINZA et al., 2011).

Ao trabalhar com sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.), Bailly et al., (2004) observaram o aumento na atividade da CAT induzido pela secagem das sementes e associado com a diminuição no nível de peróxido de hidrogênio e na peroxidação lipídica. Estes resultados sugerem que a CAT desempenha papel durante a dessecação das sementes, impedindo a ocorrência de danos oxidativos relacionados com a desidratação.

Vários danos celulares causados pela peroxidação de lipídeos durante o processo de secagem das sementes podem ser minimizados pela presença de mecanismos protetores, como a ação das enzimas glutathione redutase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase especializadas em remover espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROSA et al., 2005).

É provável que sistemas enzimáticos estejam envolvidos na resposta antioxidante inicial pela neutralização do oxigênio ativado, potencialmente tóxico, formado durante a restrição hídrica. Sobre a habilidade para prevenir, tolerar ou reparar ataque de radicais livres durante a dessecação, sabe-se que radicais livres são naturalmente produzidos durante o metabolismo das plantas, particularmente em cloroplastos e mitocôndria (EDREVA, 2005).

Enquanto as sementes ortodoxas apresentam outros sistemas antioxidantes para substituir os frequentemente encontrados antes do processo de secagem, sementes recalcitrantes não apresentam essa habilidade, sendo que a secagem lenta danifica os sistemas enzimáticos de maneira irreversível (TOMMASI et al., 1999).

O estudo dos processos enzimáticos é uma forma de se avaliar a qualidade das sementes. Neste sentido, utilizando das técnicas da eletroforese para a detecção de atividade enzimática, a qualidade das sementes terá a colocação mais realista, sendo possível determinar alterações bioquímicas que ocorrem nas sementes (MUNIZ et al., 2007).

A técnica de eletroforese de proteínas é capaz de auxiliar a detecção dos estádios iniciais de deterioração através da avaliação da atividade de enzimas associadas à degradação e oxidação de substâncias de reserva, bem como com a biossíntese de novas substâncias (SPINOLA et al., 2000). A capacidade de avaliação e a correta interpretação da variação eletroforética nos perfis de proteínas e enzimas pode ser eficiente ferramenta na determinação de mudanças bioquímicas resultantes do processo deteriorativo (CARRARO, 1990).

Variações nos perfis de proteínas e de enzimas específicas, principalmente aquelas relacionadas ao processo respiratório e peroxidação de lipídios e remoção de radicais livres, podem se constituir em ferramenta eficiente para monitorar as alterações bioquímicas resultantes da deterioração (CHAUHAN et al., 1985).

### **6.7 Açúcares não redutores**

Na maioria das sementes ortodoxas, a sacarose, os oligossacarídeos da família rafinose e os monossacarídeos contribuem com 1 a 12% da matéria seca. Nas sementes ortodoxas maduras, o conteúdo de sacarose varia entre 15 a 90% dos carboidratos solúveis, sendo encontrado vestígio de monossacarídeos. O acúmulo de açúcares não reduzidos está envolvido na tolerância à dessecação. Tecidos tolerantes são caracterizados por apresentarem alta quantidade de sacarose e oligossacarídeos (estaquiose ou rafinose), e ausência ou reduzida quantidade de monossacarídeos redutores, como a galactose, manose, frutose e glicose (PUKACKA et al., 2009).

Quando as células estão hidratadas, suas membranas têm a bicamada lipídica num estado líquido cristalino em temperaturas biológicas. Com a secagem, a disposição dos fosfolipídeos na membrana muda da configuração lamelar para a configuração hexagonal, causando disfunção desta membrana (GUIMARÃES, 1999). Durante a desidratação, açúcares específicos podem prevenir os efeitos danosos da dessecação sobre as membranas celulares, na medida em que formam ligações de hidrogênio, repondo a água normalmente associada com as superfícies das membranas, mantendo assim o espaçamento dos grupos de lipídios, evitando a transição da fase líquida cristalina para a fase gel. A sacarose pode ter a função de manter a estrutura da bicamada líquida cristalina da membrana, em níveis baixos de hidratação. Outro mecanismo por meio do qual os açúcares podem agir para proteger as células durante a dessecação é a formação do vidro intracelular (BUITINK e LEPRINCE, 2004).

Quando nas proporções corretas os carboidratos solúveis formam nas células um estado viscoso, caracterizado como a solução líquida, com propriedades de viscosidade do sólido que não formam cristais de gelo mesmo em temperaturas negativas (JOSÉ et al., 2006). Por ser extremamente viscoso, este estado é capaz de paralisar os processos bioquímicos que requerem difusão molecular, atenuando a atividade de espécies reativas do metabolismo do oxigênio, auxiliando assim na estabilidade celular por muito tempo (PAMMENTER; BERJAK, 2000; ROSA et al., 2005).

De acordo com José et al. (2006), ao estudar a relação entre açúcares e tolerância a alta temperatura de secagem em sementes de milho, a sacarose era o açúcar mais abundante nas sementes, reforçando sua importância na prevenção dos efeitos danosos da dessecação sobre as membranas celulares.

Segundo Guimarães et al. (2002), inúmeras evidências apoiam a visão de que açúcares agindo como “substitutos de água” podem desempenhar papel-chave na aquisição de tolerância à dessecação em sementes, por proteger membranas de mudanças de fase lipídica induzida por dessecação e também proteger proteínas, e pela formação de vidro a temperaturas fisiológicas.

## REFERÊNCIAS

ALPERT, P.; OLIVER, M. J. Drying without dying. In BLACK, M.; PITCHARD H.M. (eds). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing, pp3-43, 2002.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.

BAILLY, C.; LEYMARIE, J.; LEHNER, A.; ROUSSEAU, S.; COME, D.; CORBINEAU, F. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p.475–483, 2004.

BARTELS, D. Desiccation tolerance studied in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **Integrative and Comparative Biology**, v.45, n. 5, p. 696-701. 2005.

BATALHA, M. A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v.11, n.1, p. 21-24, 2011.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2ª ed. New York: Plenum Press, 1994. p. 445.

BIENERT, G. P.; SCHJOERRINGA, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biomembranes**, v. 1758, p. 994–1003, 2006.

BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, v.96, p.868-874, 1991.

BONOME, L. T. S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. de Juss.) Muell. Arg.] durante o armazenamento.** Tese (Doutorado em Agronomia) Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006. 124f.

BORLAUG, N. E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: BAILEY, R. (ed.). **Global warming and other eco-myths.** Roseville: **Competitive Enterprise Institute**, EUA, 2002. pp. 29-60.

BUITINK J.; LEPRINCE, O. Glass formation in plant anhydro-biotes: survival in the dry state. **Cryobiology**, v. 48, p. 215–28, 2004.

CARAMORI, S. S.; LIMA, S. C.; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 253–259, 2004.

CARRARO, D.M. **Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (*Zea mays* L.).** Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 1990. 121f.

CASTRO, C. F. S.; SILVA, C. A. M.; PERFEITO, J. P.; SANTOS, M. L.; RESCK, I. S.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de *Pouteria*. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** Águas de Lindóia, 2006.

CHAUHAN, K. P. S.; GOPINATHAN, M. C.; BABU, C. R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, v.13, p.629-641, 1985.

COSTA, A. F.; SILVA, G. F.; ESCUDERO, M. C. Estudo comparativo entre produtos químicos preservantes e licores pirolenhosos na inibição de fungos emboloradores. **Brasil Florestal**, v. 21, p. 24-30, 2003.

COSTA, A.V. et al. Neuroprotective effects of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) extract on the brains of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Metabolic Brain Disease**, p. 1-9, 2013.

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.1, p. 1-11, 2006.

CRUZ, D.F.; MARTINS, P.O.; CARVALHO, J.E.U. Biometria de frutos e sementes e germinação de jatobá-curuba (*Hymenaea intermédia* Ducke, Leguminosae Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.2, p.161-5, 2001.

DALPONTE, J. C.; LIMA, E. S. Disponibilidade de frutos e a dieta de *Lycalopex vetulus* (Carnivora - Canidae) em um cerrado de Mato Grosso, Brasil. **Revista brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 325-332, 1999.

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agricult. Ecosyst. Environ.** v. 106, p. 119-1133, 2005.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

FARRANT, J. M., PAMMENTER, N. W., BERJAK, P. Recalcitrance: a current assessment. **Seed Science and Technology**, v. 16, n. 1, p. 155-166, 1988.

FARRANT, J. M.; BAILLY, C.; LEYMARIE, J.; HAMMAN, B.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Wheat seedlings as a model to understand desiccation tolerance and sensitivity. **Physiol Plant**, v. 120, n. 4, p. 563-574, 2004.

GAMA, L. U.; BARBOSA, A. A. A.; OLIVEIRA, P. E. A. M. Sistema sexual e biologia floral de *Pouteria ramiflora* e *P. torta* (Sapotaceae). **Revista brasileira de Botânica**, v. 34, n. 3, p. 375-387, 2011.

GARCIA, L. C.; NOGUEIRA, A. C.; ALQUINI, Y. Aspectos morfo-anatômicos de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotz. e *Podocarpus sellowii* Klotz. - Podocarpaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 129-134, 2006.

GOYAL, K.; WALTON, L. J.; TUNNACLIFFE, A. *LEA* proteins prevent protein aggregation due to water stress. **Biochemical Journal**, v. 388, p. 151–157, 2005.

GUERRA, M. E. C.; MEDEIROS FILHO, S.; GALLAO, M. I. Morfologia de sementes, de plântulas e da germinação de *Copaifera langsdorfii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae). **Cerne**, v. 12, n. 4, p. 322-328, 2006.

GUIMARÃES, R. M. **Fisiologia de sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE. (Curso de Especialização Pós-Graduação “Lato Sensu” por tutoria à distância). 1999. 132p.

GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, M. G.G. C.; FRAGA, A. C.; VON PINHO, E. V. R.; FERRAZ, V. P. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.1, p. 128-139, 2002.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; FONSECA, E. M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex. A. Juss). **Cerne**, v. 12, n. 1, p. 84-91, 2006.

HEALD, S. V. Rhamnaceae. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. **Flowering Plants of the Neotropics**. New Jersey, Princeton University Press. 2004

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, v. 6, n. 9, p. 431-438, 2001.

HONG, S. W.; VIERLING, E. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 97, p. 4392-4397, 2000.

JOSÉ, S. C. B. R.; VON PINHO, E. V. R. V.; DIAS, M. A. G. S. Açúcares e tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de Milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 60-68, 2006.

JOSÉ, S. C. B. R.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; SILVEIRA, C. M. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 2, p. 115-121, 2005.

KIBINZA, S.; BAZIN, J.; BAILLY, C.; FARRANT, J. M.; CORBINEAU, F.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, v. 181, n. 3, p. 309-315, 2011.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KOTAK, S.; VIERLING, E.; BAUMLEIN, H.; VON KOSKULL-DORING, P. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 19, p. 182–195, 2007.

LIMA, R. B. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rhamnaceae. **Rodriguésia**, v. 57, n. 2, p. 247-249, 2006.

LIMA, R. B. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Rhamnaceae. **Bol. Bot. Univ. São Paulo**, v. 29, n. 1, p. 47-55, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, v. 1, 5 ed., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008, P.384.

LUIS, Z. G. **Propagação *in vitro* e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (*Byrsonima basiloba* Juss., Malpighiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, DF. 2008. 95f.

MACHADO, R. B., RAMOS NETO, M. B., PEREIRA, P. G. P., CALDAS, E. F., GONÇALVES, D. A., SANTOS, N. S., TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado**. Conservação Internacional, Brasília, DF, 2004.

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

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T. Cerrado. In **Cerrado: Ambiente e Flora** (SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P., eds.). EMBRAPA-CPAC, Planaltina, p. 289-556, 1998.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MONTEIRO, M. H. D. A.; NEVES, L. J.; ANDREATA, R. H. P. Taxonomia e anatomia das espécies de *Pouteria aublet* (Sapotaceae) do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Pesquisas, **Botânica**, n. 58, p. 7-118 2007.

MOURÃO, K. S. M.; DIAS-PINTO, D.; SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S. Morfo-anatomia da plântula e do tirodendro de *Trichilia catiguá* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. e *T. pallida* Sw. (Meliaceae). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 601-610, 2002.

MOWLA, S. B.; CUYPERS, A.; DRISCOLL, S. P.; KIDDLE, G.; THOMSON, J.; FOYER, C. H.; THEODOULOU, F. L. Yeast complementation reveals a role for an *Arabidopsis thaliana* late embryogenesis abundant (LEA)-like protein in oxidative stress tolerance. **Plant Journal**, v. 48, p. 743–756, 2006.

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

- NUNES, M. M. **Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., Sapotaceae.** Dissertação de Mestrado, Ciências Médicas, Universidade de Brasília. Brasília, 2004. 60 p.
- OLIVEIRA, E. C. Morfologia e análise de plântulas florestais. In: AGUIAR; I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Ed.) **Sementes florestais tropicais.** Brasília: ABRATES, 1993. p.175-214.
- OLIVEIRA, T. B.; SOARES, R. L.; TRESVESOL, L. M. F.; BRANQUINHO, D. S. P.; BARA, M. T. F.; FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; PAULA, J. R. Caracterização das Folhas e Cascas da *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 9, n. 4, p. 534-41, 2010.
- PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12 (edição especial), p. 56-69, 2000.
- PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E.; KALEMBA, E. Non-reducing sugar levels in beech (*Fagus sylvatica*) seeds as related to withstanding desiccation and storage. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1381-1390, 2009.
- QUEITSCH, C.; HONG, S. W.; VIERLING, E.; LINDQUIST, S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 12, p. 479-492, 2000.
- RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, F. Biodiversity patterns of the woody vegetation of the Brazilian Cerrado. In: **Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography and conservation** (PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. eds.). Taylor & Francis, London, p.31-65, 2006.
- RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, n. 3, p. 223-230, 1997.
- RICHARDSON, J.E.; FAY, M.F.; CRONK, Q.C.; BOWMAN, D.; CHASE, M.W. A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using *RBCL* and *TRNL-F* plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**, v.87, n. 9, p. 1309-1324, 2000.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

ROSA, S. D. V. F.; JUNIOR, D. S. B.; PINHO, E. V. R. V.; VEIGA, A. D.; SILVA, L. H. C. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canephora* Pierre seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 2, p. 199-205, 2005.

SILVA, C. A. M.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D. Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 501-509, 2009.

SILVA, J. G.; SILVA, L. P.; SOUZA, J. R.; CASTRO, C. S. P. O Estudo dos complexos Zn (II)-CAT e Cu(II) – CAT utilizando a voltametria cíclica e a de pulso diferencial. **Circular técnica** – Embrapa. Brasília, DF. Dezembro, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

SPINOLA, M. C. M.; CICERO, S. M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; ARRIGONI, O. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. **Physiology Plantarum**, v. 105, p. 193-198, 1999.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001.

WALTERS, C.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Desiccation and Damage. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Eds.) **Desiccation and survival in plants. Drying without dying**, 2002. p. 263–291.

WALTERS, C.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, v. 11, n. 2, p.135-148, 2001.

WEHMEYER, N.; VIERLING E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. **Plant Physiol**, v. 122, n. 4, p. 1099-108, 2000.

## OBJETIVOS GERAIS

Objetivou-se neste trabalho, avaliar a tolerância à dessecação em sementes de cafezinho-do-cerrado (*Rhamnidium elaeocarpum* Reissek) e curriola (*Pouteria ramiflora* Mart. Radlk), por meio da investigação de alterações fisiológicas e bioquímicas que podem ocorrer nas sementes quando submetidas à secagem, além de elucidar os caracteres morfológicos dos frutos, das sementes e do desenvolvimento pós-seminal das espécies estudadas.

## CAPÍTULO 1

### Tolerância à dessecação em sementes de cafezinho-do-cerrado, *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek (Rhamnaceae)

Desiccation tolerance of cafezinho-do-cerrado - *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek (Rhamnaceae) seeds

(Artigo conforme as normas da revista Acta Scientiarum. Agronomy)

**RESUMO:** O trabalho teve como objetivo investigar a tolerância a dessecação em sementes de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek por meio de alterações fisiológicas e bioquímicas. Os frutos foram coletados no município de Jaupaci, GO, quando as sementes apresentavam teor de água de 37% base úmida (b.u.), sendo em seguida mantidas em estufa de secagem com circulação de ar à temperatura de 35°C até alcançarem os teores de água de 20 e 12% (b.u.). Foram avaliados os seguintes parâmetros: germinação; índice de velocidade de germinação; emergência; índice de velocidade de emergência; condutividade elétrica; taxa respiratória; perfil eletroforético das isoenzimas: catalase, peroxidase e esterase; atividade enzimática de endo- $\beta$ -mananase e  $\alpha$ -amilase e análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor. Maior velocidade de germinação e taxa respiratória foi obtida para sementes com teor de água de 12% b.u. A atividade das isoformas de catalase foi mais pronunciada em sementes com maior grau de desidratação em relação à peroxidase que diminuiu sua atividade. As sementes apresentaram proteínas de baixo peso molecular resistentes ao calor, variando de 48,7 a 13,2 kDa. A aquisição de tolerância à secagem em sementes de *R. elaeocarpum* Reissek é mais associada à enzima catalase do que às enzimas esterase e peroxidase.

**Palavras-chave:** secagem, germinação, isoenzimas, taxa respiratória, proteínas resistentes ao calor

**ABSTRACT:** This study aimed to investigate the desiccation tolerance of *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek seeds through physiological and biochemical alterations. Fruits were collected in the municipality of Jaupaci, GO, Brazil, when seeds had a water content of 37% wet basis (w.b.) than the seeds were kept in a drying oven with air circulation at a temperature of 35°C until reached a water content of 20 to 12% (w.b.). The following parameters were evaluated: germination, germination speed index,

emergence, emergence speed index, electrical conductivity and respiration rate. Furthermore, the electrophoretic profile of the isoenzymes: catalase, peroxidase and esterase, the enzymatic activities of endo- $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -amylase and the electrophoretic analysis of heat-resistant proteins were performed. A higher germination speed and respiratory rate was obtained for seeds with a water content of 12 % w.b., and the activity of catalase isoforms was more pronounced in seeds with a higher degree of dehydration, which was in contrast to peroxidase that showed decreased activity. The seeds contained heat-resistant proteins of low molecular weight that ranged from 48.7 to 13.2 kDa. We found that the acquisition of drying tolerance in *R. Elaeocarpum* Reissek seeds is associated more with catalase than with esterase and peroxidase.

**Key words:** drying, germination, isoenzymes, respiration rate, heat-resistant proteins

## INTRODUÇÃO

A tolerância à dessecação é um fenômeno complexo resultante de ajustes bioquímicos e celulares, permitindo que as células resistam a perdas consideráveis de água com o mínimo de prejuízo ao tecido (MARCOS FILHO, 2005). Mudanças substanciais na estrutura e organização celular ocorrem nos estádios tardios do acúmulo da matéria seca e secagem de maturação (WALTERS; KOSTER, 2007; BERJAK; PAMMENTER, 2008). Com o início da secagem, diferentes mecanismos de expressão diferencial de genes são ativados culminando na expressão e atividades de enzimas importantes no processo de aquisição da tolerância (RAMANJULU; BARTELS, 2002; BUITINK et al., 2006).

Em sementes ortodoxas, a expressão destes genes ocorre durante o desenvolvimento como parte do programa de maturação. Como resultado, os embriões tornam tolerantes a dessecação consideravelmente antes da secagem de maturação (HOEKSTRA et al., 2001). Considerando que a aquisição de tolerância a dessecação é regulada durante o desenvolvimento das sementes, com os possíveis mecanismos de tolerância sendo acumulados apenas em momentos precisos após a fertilização, os tecidos vegetativos devem responder a sinais ambientais para ativar mecanismos de proteção para a planta inteira. É concebível, que sinais ambientais de perda de água extrema possam ativar o repertório existente de genes específicos de proteção em sementes e tecido vegetativos (ILLING et al., 2005).

As tensões associadas à perda extrema de água incluem o estresse mecânico associado com a perda de turgor, estresse oxidativo por geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a desestabilização ou perda da integridade macromolecular (WALTERS et al., 2002). Em organismos que sobrevivem à remoção de água, seus constituintes celulares estão protegidos ou podem ser reparados por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (WALTERS et al., 2001). A tolerância à dessecação parece ser mediada por sistemas protetores que previnem danos letais em diferentes componentes celulares, incluindo membranas, proteínas e citoplasma. Três importantes sistemas são caracterizados: a conversão de açúcares reduzidos em açúcares de cadeia longa não reduzidos; habilidade para prevenir, tolerar ou reparar ataque de ROS por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos e a indução das proteínas “*late embryogenesis accumulated*” (LEA) e resistentes ao choque térmico (LI; SUN, 1999; KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002; BERJAK; PAMMENTER, 2008).

A perda de viabilidade durante a secagem das sementes de várias espécies sensíveis à dessecação é acompanhada pelo aumento da peroxidação de lípidos e pela acumulação de radicais livres. Estes radicais livres podem reagir com o peróxido de hidrogênio para produzir oxigênio singlete e radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), que são tóxicos para as células e podem danificar os componentes celulares, tais como proteínas, membranas, DNA. Radicais livres se acumulam, porque os sistemas removedores não são eficazes em corpos desidratados (BOUDET et al., 2006). A tolerância à dessecação pode ser relacionada, pelo menos em parte, com a capacidade celular em sequestrar espécies reativas de oxigênio e portanto, evitar efeitos deletérios tais como a peroxidação de lipídeos causada por estas espécies reativas (VERTUCCI; FARRANT, 1995). Portanto, compostos antioxidantes e enzimas removedoras de radicais livres, são considerados como sendo de particular importância para o desenvolvimento da semente (GARNCZARSKA et al., 2009). A atividade de enzimas antioxidantes protege os tecidos contra danos oxidativos decorrentes da perda de água nas espécies tolerantes a dessecação (ILLING et al., 2005). Há vários relatos descrevendo a ação sinérgica da expressão simultânea de enzimas removedoras de radicais livres sobre a tolerância à dessecação em sementes (KWON et al., 2002).

Alterações nos padrões da enzima esterase evidenciam a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução na germinação das sementes à medida que são aumentados os níveis de fatores adversos de temperatura e teor de água das sementes, pois a esterase é a enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres,

estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios (SANTOS et al, 2004;.. SANTOS et al, 2005). De acordo com Nkang et al. (2000), os sistemas de enzimas removedoras de radicais livres, incluem a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de superóxido ( $O_2^-$ ) a  $H_2O_2$  e  $O_2$  e as enzimas envolvidas na desintoxicação de  $H_2O_2$  (catalase, glutatona-redutase, ascorbato e outros peroxidases).

Um grupo particular de mRNAs e proteínas LEA se acumulam tipicamente durante os estádios finais da embriogênese, ou em resposta a desidratação, a baixa temperatura, salinidade ou tratamento com ABA exógeno, indicando sua capacidade de resposta celular à desidratação (RAMANJULU; BARTELS, 2002). Os mRNAs de proteínas LEA, em tecidos embrionários, aparecem no início da secagem, e se tornam as espécies de mRNA de maior prevalência no estado seco, diminuindo gradualmente durante várias horas após embebição das sementes. Proteínas do tipo LEA são ricas em glicina e outros aminoácidos hidrofílicos e apresentam poucos resíduos hidrofóbicos, são extraídas em condições de alta temperatura e não apresentam nenhuma atividade catalítica aparente (GOYAL et al., 2005).

As proteínas LEA, geralmente, são capazes de proteger outras proteínas ou membranas, semelhantes aos açúcares, atuando como moléculas de reposição de água (BOUDET et al., 2006). Proteínas do tipo LEA são amplamente distribuídas entre as espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas, e por sua natureza anfipática, essas proteínas são capazes de inibir a desnaturação de macromoléculas e estabilizar estruturas intracelulares sob condições de estresse, sendo associadas com a tolerância à dessecação das sementes (BLACKMAN et al., 1995; CLOSE, 1997).

Um dos processos mais estudados, que ocorrem em organismos para se adaptar à condição de estresse, é a indução de proteínas de choque térmico, '*heat shock proteins*' (HSP), que incluem várias famílias de proteínas conservadas. O papel das HSPs está relacionado com a manutenção e com o reparo de estruturas macromoleculares durante a desidratação ou durante a reidratação, respectivamente. Embora todos os organismos possam sintetizar HSPs em resposta ao calor, o equilíbrio de proteínas sintetizadas e a importância relativa de cada família de HSP em relação à tolerância ao estresse de temperatura variam grandemente entre os organismos (QUEITSCH et al., 2000).

O *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek, conhecido popularmente como cafezinho ou cafezinho-do-cerrado, é uma espécie com ampla distribuição no Brasil, ocorrendo em quase todos os estados, sendo encontrada sobretudo em matas ciliares. As folhas e cascas são utilizadas popularmente no Brasil para reduzir o prurido das gengivas de

crianças no início da dentição e para dores estomacais. O extrato metanólico das folhas apresenta quantidades satisfatórias de flavonoides, alcaloides, saponinas e taninos. Tais substâncias podem ser responsáveis pela atividade antiúlcera apresentada por esse extrato, visto que esses compostos desempenham atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2010).

Como são escassos os trabalhos sobre os mecanismos de tolerância à dessecação em sementes de espécies nativas do Cerrado, objetivou-se neste trabalho investigar a tolerância à dessecação, por meio de alterações fisiológicas e bioquímicas, em sementes de *R. elaeocarpum* submetidas à secagem.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos maduros foram coletados na fazenda Padre Galileu, no município de Jaupaci, GO, em dezembro de 2011, em cinco matrizes distantes no mínimo 100 m entre si. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (MG). Os frutos foram despolpados manualmente, por meio de maceração em peneira (5mm), sob água corrente, separando as sementes dos resíduos. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por três minutos, e em seguida lavadas com água destilada. Após a lavagem as sementes foram dispostas em bandejas plásticas cobertas com papel toalha para a remoção do excesso de água. O teor de água das sementes foi determinado pelo método da estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  por 24 horas (BRASIL, 2009), com quatro subamostras de 10 sementes. O cálculo foi feito na base úmida, sendo o resultado expresso em porcentagem. Após a determinação do teor de água inicial, parte das sementes foi acondicionada em sacos de papel e deixadas em estufa de secagem com circulação forçada de ar, regulada a temperatura de  $35^\circ\text{C}$ , sendo a perda de massa avaliada em balança de precisão a cada uma hora, até alcançarem massas referentes aos teores de água de 20 e 12 % de base úmida (b.u.) A perda de água pelas sementes foi determinada por meio da fórmula recomendada pelas Regras para Análise de Sementes:

$$Pf = Pi \cdot \left( \frac{100 - T_{Ai}}{100 - T_{Af}} \right)$$

Em que: Pf: massa final da amostra (g); Pi: massa inicial da amostra (g); TAI: teor de água inicial das sementes (% b.u); TAF: teor de água desejado das sementes (% b.u).

Após a obtenção dos teores de água desejados, as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em câmara fria (temperatura de 10°C e 50-60% de umidade) até o momento da realização dos ensaios. A qualidade fisiológica e o vigor das sementes foram avaliados mediante os seguintes parâmetros: germinação (%), índice de velocidade de germinação (IVG), emergência (%), índice de velocidade de emergência (IVE), condutividade elétrica e taxa respiratória.

**Teste de germinação:** a semeadura foi realizada em folhas de papel “germitest”, umedecidos com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco (BRASIL, 2009), com quatro repetições de 50 sementes. Os rolos de papel, contendo as sementes, foram mantidos em germinador, do tipo Mangelsdorf, à temperatura de 30°C. Para a determinação do índice de velocidade de germinação (IVG), foram realizadas avaliações diárias, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentavam protrusão radicular de 0,5cm, e o cálculo foi feito por meio da fórmula proposta por Maguire, 1962. Para a porcentagem de germinação foram consideradas apenas as plântulas normais (aquelas que apresentavam todas as estruturas essenciais desenvolvidas, sem nenhum tipo de dano) decorridos 30 dias após a semeadura.

**Teste de emergência em condições controladas:** No teste de emergência, foram utilizadas 200 sementes divididas em quatro repetições de 50 cada. A semeadura foi realizada, a 3 cm de profundidade, em bandeja plástica de 40x30x8 cm, contendo como substrato a mistura de terra de subsolo e areia na proporção de 3:1. O substrato foi umedecido até 70% de sua capacidade de campo, sendo posteriormente irrigado sempre que necessário. As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento à temperatura de 25°C e fotoperíodo (oito horas de luz e 16 horas de escuro) por 30 dias. Foram realizadas contagens diárias a fim de se determinar o índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE), de acordo com Maguire (1962), considerando a emergência de plântulas acima de 1,5 cm do substrato. Avaliou-se, ao final dos 30 dias, a porcentagem de emergência (% E) em que foram consideradas apenas as plântulas normais (aquelas com todas as estruturas essenciais perfeitas, sem nenhum dano).

**Teste de condutividade elétrica:** Realizado com quatro subamostras de 50 sementes, previamente pesadas em balança de precisão de 0,001 g e, em seguida,

colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água destilada e deionizada e mantidas em câmara do tipo BOD a 25°C por 24 horas. Após esse período, foi determinada a condutividade elétrica em condutivímetro digital, da marca Digimed, modelo CD 21A, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{Scm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ .

**Taxa Respiratória:** A taxa respiratória foi determinada pelo método da titulação, segundo metodologia descrita por Crispim et al. (1994). Foram utilizadas caixas de plástico transparente tipo gerbox, contendo uma bandeja de tela fina, utilizada como suporte para as sementes. Foram empregadas quatro subamostras de 50 sementes, as quais foram pesadas previamente para a obtenção do massa seca das sementes. No fundo de cada gerbox foram adicionados 40 mL de solução de KOH 0,1 N e sobre a tela foram depositadas duas folhas de papel mata-borrão umedecido 2,5 vezes o seu peso seco, sobre as quais as sementes foram distribuídas de maneira a formarem camada uniforme. Para cada amostra foi constituída uma testemunha, denominada prova em branco, preparada apenas com a solução de de KOH 0,1 N. Em seguida, os gerbox foram tampados e vedados com filme plástico, a fim de evitar trocas gasosas, e mantidos em câmara de germinação, do tipo BOD, por um período de 24 horas a temperatura constante de 25°C. Após esse período, retirou-se 25 mL da solução de KOH 0,1 N, de cada repetição, na qual foram adicionadas três gotas de fenolftaleína para a titulação com HCl 0,1 N. No ponto de viragem foi registrado o volume de HCl gasto para neutralizar a solução de KOH em cada uma das amostras testadas. O cálculo final da taxa respiratória foi realizado por meio da seguinte equação:

$$TR = \frac{(B - L) \times C}{MS}$$

Em que: B é a leitura da prova em branco; L é a leitura da titulação de cada repetição utilizando HCl; C é a constante denominada fator de correção com valor de 3,52 e MS é a massa seca das sementes submetidas as avaliações. Os resultados foram expressos em mg de CO<sub>2</sub> por grama de semente seca.

As variáveis bioquímicas e moleculares analisadas nas sementes foram: Determinação de isoformas da enzima  $\alpha$ -amilase, determinação de isoformas de enzimas removedoras de radicais livres, determinação da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase e determinação do perfil eletroforético de proteínas resistentes ao calor.

**Determinação de isoformas da enzima  $\alpha$ -amilase:** O perfil eletroforético da  $\alpha$ -amilase foi determinado em gel de poliacrilamida não desnaturante num sistema

descontínuo. As sementes foram submetidas ao teste de germinação por 48 horas. Após esse período, as plântulas foram descartadas e o tecido de reserva foi triturado em cadinho (sobre gelo), na presença de nitrogênio líquido, e as amostras foram armazenadas em ultrafreezer, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o momento das análises. A extração da enzima se processou pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de tampão de extração tris-HCl,  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,0 a 100 mg das amostras de cada tratamento; o homogeneizado foi mantido por 12 horas em geladeira a temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ , centrifugado a  $16.000 \times g$ , a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos e, volumes de 40  $\mu\text{L}$  do extrato foram aplicados ao sistema descontínuo de géis de poliacrilamida a 4,5% (gel de empilhamento) e 7,5% (gel separador- 5% de amido solúvel); o sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética foi realizada a  $4^{\circ}\text{C}$ , por quatro horas, a uma voltagem constante de 150 V. As bandas de atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foram reveladas segundo Alfenas (1998); após o tratamento com iodo, avaliou-se a presença ou ausência de bandas claras em fundo azulado (revelação negativa), pela reação com a amilose, bem como a intensidade relativa das isoformas.

**Determinação de isoformas de enzimas removedoras de radicais livres:** As sementes foram trituradas na presença do antioxidante PVP 40 (polivinilpirrolidona) e imediatamente armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises. Cem miligramas do macerado foram colocados em microtúbulos, acrescidos de 2,5 vezes o seu peso de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8 e 0,001% de  $\beta$ -mercaptoetanol). As amostras dos materiais de cada tratamento foram mantidas em geladeira “*overnight*” e então foram centrifugadas  $16.000 \times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo, em seguida aplicados 60  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra ao sistema descontínuo de géis de poliacrilamida a 4,5% (gel de empilhamento) e 7,5% (gel separador). O sistema gel/eletrodo foi o Tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética realizadas a  $4^{\circ}\text{C}$ , por quatro horas, em voltagem constante de 150 V. Após a corrida eletroforética, os géis foram revelados para o sistema enzimático catalase e esterase de acordo com Alfenas (1998) e peroxidase de acordo com Tanksley e Orton (1983). Após a revelação, a avaliação dos géis foi realizada sobre transluminador, sendo considerada a presença e ausência das bandas para cada amostra e intensidade relativa das diferentes isoformas.

**Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase:** Para a extração da enzima endo- $\beta$ -mananase as sementes de cada tratamento, pré-embebidas em água destilada por 24 horas e, sem o tegumento, foram maceradas em nitrogênio líquido e PVP 40. Foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  do tampão de extração [100 mM Hepes, 500 mM NaCl e 0,5% de

ácido ascórbico, pH 8,0] a 200 mg do macerado de sementes de cada tratamento. Em seguida, os microtubos contendo as amostras foram agitados em agitador tipo vortex por 1 minuto e centrifugados por 30 minutos a 10000 xg aos 4 °C. Do sobrenadante, 20 µL foram aplicados em gel contendo 6 mL de *locust bean gum* -Sigma nr 0753 (LBG), 0,24 g de agarose (Qbiogene) e 24 mL de tampão pH 5,0 (11 mL de ácido cítrico 1M, 50 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 149 mL de água destilada). As alíquotas foram aplicadas em furos de 2 mm feitos no gel com auxílio de um furador e em seguida, o gel, contendo as amostras, foi transferido para o germinador a 25°C por período de 21 horas, no escuro, em câmara úmida. Logo após, o gel foi coberto com o corante vermelho congo a 0,5% por 30 minutos e descorado em etanol por 10 minutos. Removido o etanol com água destilada, foi adicionada a solução de 1M de NaCl até a observação visual da formação de halos brancos nos furos que vão conter as amostras. Nesse momento, foi feita a medição do diâmetro dos halos em duas direções com um paquímetro resultando em uma média. Para o cálculo da atividade da enzima, foi feita uma comparação com a curva padrão gerada pela endo-β-mananase comercial de *Aspergillus niger* (Megazyme). O cálculo da atividade da enzima endo-β-mananase foi realizado segundo Downie et al. (1994). O ensaio foi conduzido, com três repetições para cada tratamento.

**Perfil eletroforético de proteínas resistentes ao calor:** As sementes foram trituradas em um cadinho na presença de nitrogênio líquido e em seguida, foi adicionado tampão de extração descrito por Alfenas (1998), na proporção de 10 partes de tampão para 1 de sementes trituradas. As amostras foram centrifugadas a 16000 xg por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi separado e incubado em banho-maria a 85 °C por 10 minutos e novamente centrifugado como anteriormente. Antes da aplicação no gel desnaturante de poliacrilamida, 40 µL de tampão da amostra (ALFENAS, 1998) foram adicionados em 70 µL de cada extrato, seguindo a incubação em banho-maria com água em ebulição por cinco minutos. Em seguida, foram aplicados 50 µL de cada amostra em gel de poliacrilamida desnaturante e descontínuo constituído pelo gel de empilhamento (6%) e o de separação (12,5%); o tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina + SDS pH 8,9 e a corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical, à temperatura ambiente e voltagem constante de 150V por quatro horas. Para determinação da massa molecular das cadeias polipeptídicas, utilizou-se o marcador de massa variando de 10 a 220 KDa (Invitrogen®). Após a corrida, os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue a 0,05% por 24 horas e descorados em solução de etanol:ácido acético:água nas proporções 0,5:1:8,5 (v:v), conforme Alfenas (1998).

A avaliação dos géis foi realizada sobre transluminador, sendo considerada a presença e ausência das bandas.

**Delineamento estatístico:** O delineamento experimental para os testes de qualidade fisiológica e de vigor foi o inteiramente ao acaso com quatro repetições para cada um dos três teores de água definidos. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do software Sisvar (Sistema de Análise de Variâncias) para Windows (FERREIRA, 2000). Os dados expressos em porcentagem foram transformados em arco seno raiz quadrada de  $x/100$ , em que  $x$  se refere à porcentagem.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Maior velocidade de germinação foi obtida para as sementes submetidas à secagem, com teor de água de 12% b.u. Para as demais variáveis não houve diferença entre os teores de água (Tabela 1)

**Tabela 1.** Comparação entre os valores médios para índice de velocidade de germinação (IVG); porcentagem de germinação; índice de velocidade de emergência (IVE); porcentagem de emergência em sementes de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek com diferentes teores de água.

Teores de água (% b.u.)	IVG	G (%)	IVE	E (%)
37	10,29 c*	80,50 a	2,67 a	94,55 a
20	11,81 b	81,00 a	2,97 a	93,95 a
12	12,68 a	82,00 a	3,13 a	90,06 a
<b>CV (%)</b>	3,41	4,63	9,40	2,64

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A redução do teor de água das sementes não alterou a qualidade fisiológica das mesmas, mantendo elevados valores para germinação e emergência de plântulas, conforme observado na tabela 1. Para sementes de *Coffea canephora*, observou-se que, com a redução do teor de água, ocorreu redução dos valores de germinação e do vigor das sementes (ROSA et al., 2005). A secagem de sementes de *Magnolia ovata* ao

conteúdo de água abaixo de  $0,10 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  levou a perda, quase total, da viabilidade, ainda foram detectadas algumas sementes dormentes ao final do teste de germinação (JOSÉ et al., 2009). Para sementes de *Anemone nemorosa* L. a germinação foi significativamente maior para sementes não secas quando comparadas as sementes submetidas à secagem em cada tempo de amostragem (ALI et al., 2007).

Para a condutividade elétrica, não houve diferença entre os teores de água das sementes, ao passo que para a taxa respiratória os maiores valores foram obtidos para as sementes submetidas à secagem (Tabela 2).

**Tabela 2.** Comparação entre os valores médios para condutividade elétrica (CE) e taxa respiratória (TR) das sementes de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek com diferentes teores de água.

Teores de água (% b.u.)	CE ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	TR (mg $\text{CO}_2/\text{g M.S.}$ )
37	3,48 a *	5,64 b
20	4,00 a	6,36 a
12	4,17 a	6,37 a
<b>CV (%)</b>	13,71	5,81

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

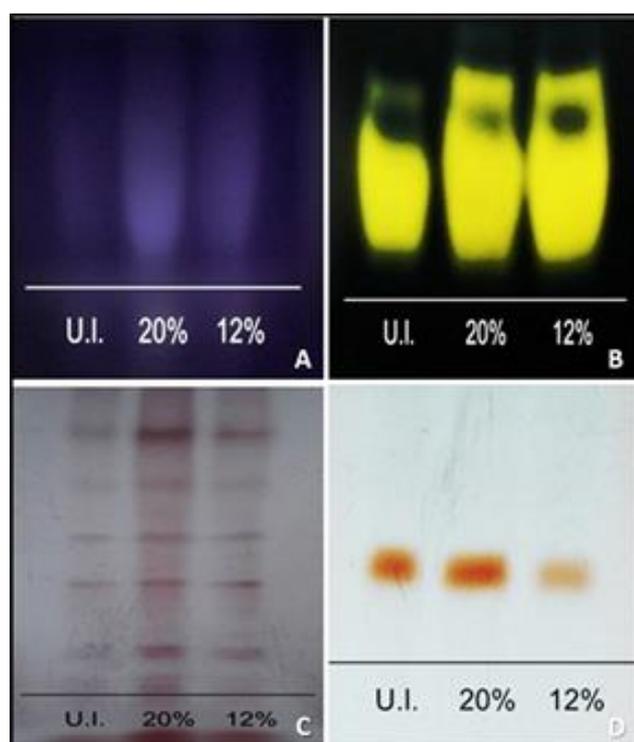
O teste de condutividade elétrica avalia os danos de membrana que podem ocorrer nas células das sementes quando submetidas à secagem, por meio de avaliação da liberação de íons no processo de reidratação durante a embebição. Para as sementes de *R. elaeocarpum*, não houve diferença entre os valores de liberação de exsudados entre sementes úmidas e secas, demonstrando que mecanismos de proteção ou reparo de membrana possam estar atuando nestas sementes e contribuindo para a aquisição de tolerância à dessecação. Para sementes de soja, colhida em estádios iniciais do desenvolvimento e submetidas à secagem, houve aumento nos valores de condutividade elétrica, indicando que as sementes colhidas com maior teor de água estavam menos tolerantes à dessecação (VEIGA et al., 2007).

As sementes submetidas à secagem apresentaram maiores valores para a taxa respiratória quando comparadas as sementes úmidas. Assim, à medida que se diminui o teor de água das sementes, até atingir 12% (b.u.), ocorreu aumento na concentração de  $\text{CO}_2$  liberado durante o processo de embebição, indicando menor grau de deterioração

em relação aos demais teores de água. A atividade e integridade das mitocôndrias de embriões viáveis aumentam a partir da embebição, aumentando assim a produção de ATP, elevando o consumo de oxigênio e consequentemente elevando a produção de gás carbônico (BEWLEY; BLACK, 1994). Em sementes de tremoço, a taxa respiratória diminuiu durante a dessecação em sementes maduras e representou apenas 10% do valor obtido para embriões jovens (GARNCZARSKA et al., 2009).

Este trabalho avaliou o padrão eletroforético para as enzimas  $\alpha$ -amilase, catalase, esterase e peroxidase em sementes de *R. elaeocarpum*, submetidas a secagem na temperatura de 35°C, e com diferentes teores de água

Foram detectadas atividades enzimáticas de todas as enzimas avaliadas em gel de poliacrilamida não desnaturante. Nas condições avaliadas, as sementes de *R. elaeocarpum* apresentaram uma, duas, seis e uma isoforma(s) para  $\alpha$ -amilase, catalase, esterase e peroxidase, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Padrão eletroforético de diferentes enzimas em sementes de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek, submetidas a secagem na temperatura de 35°C, e com diferentes teores de água; A -  $\alpha$ -amilase; B - catalase; C - esterase; D - peroxidase. (U.I.- umidade inicial - 37% b.u.; 20% b.u.; 12% b.u.). Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012.

A determinação do perfil eletroforético de isoenzimas é uma ferramenta útil para estimar e elucidar a estrutura da variabilidade genética em populações naturais, determinar o fluxo gênico entre espécies, processos de hibridização e a filogenia em diferentes modelos biológicos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Do ponto de vista agrônomo, a avaliação do padrão de isoformas contribui para a determinação de ligação gênica, identificação de cultivares e seleção indireta para caracteres de interesse (TANKSLEY; ORTON, 1983).

Além destas aplicações, a visualização das isoformas enzimáticas possibilita relacionar o efeito de fatores bióticos e abióticos no perfil de expressão enzimática, podendo ser controlado em diferentes momentos da expressão de um gene, seja um controle pré ou pós transcricional e traducional.

A redução do teor de água das sementes não resultou em alteração no perfil isoenzimático das enzimas  $\alpha$ -amilase, catalase, esterase e peroxidase. Este resultado é indicativo da importância das isoformas avaliadas em todo o processo de perda de água pelas sementes de *R. elaeocarpum*.

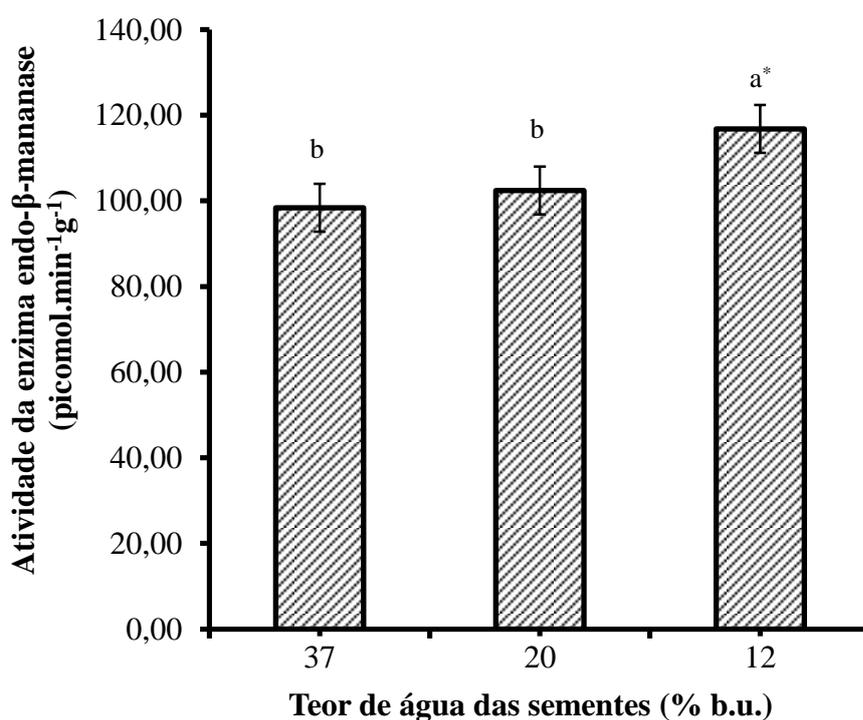
A desidratação de tecidos vegetais está associada com o aumento da geração espécies reativas de oxigênio (EROS), que atuando sinergicamente resultam em expressão diferencial de genes e ocasionam numerosos efeitos deletérios (LEPRINCE et al., 1993; VERTUCCI; FARRANT, 1995). O principal sistema de detoxicação (destoxificação) das espécies reativas de oxigênio envolve o conjunto das enzimas superóxido dismutase, catalase e enzimas do ciclo ascorbato glutatona (SCANDALIOS, 1997).

Curiosamente, em sementes de *R. elaeocarpum*, a avaliação da intensidade relativa das isoformas da catalase e peroxidase indica papel mais efetivo da primeira à medida que a umidade das sementes aproxima de 12%. Percebe-se claramente a redução da intensidade da única isoforma da peroxidase (Fig. 1D) em relação ao aumento da intensidade das duas isoformas da catalase (Fig. 1B). A desidratação de sementes é um estresse abiótico que resulta em danos celulares capazes de gerar espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio. Tanto a catalase quanto a peroxidase atuam sobre o peróxido de hidrogênio transformando-o em compostos não tóxicos a células. A eficiência da atividade enzimática de detoxicação das espécies reativas, principalmente a catalase, aumenta durante o desenvolvimento da semente e está intimamente relacionada com o conteúdo de água em sementes de girassol (BAILLY et al., 2004).

Em contrapartida, as atividades da peroxidase e glutathiona redutase diminuem durante a dessecação de sementes de *Triticum durum* (DE GARA et al., 2003).

Resultado semelhante foi encontrado por Rosa et al. (2005), ao trabalhar com tolerância à dessecação em sementes de milho, no qual a enzima catalase apresentou aumento de atividade nas sementes tolerantes à secagem a 50°C, que foram submetidas aos períodos de pré-condicionamento iguais ou superiores a 24 horas, apresentando também polimorfismo. Em sementes de tremoço houve aumento da atividade da catalase em embriões de sementes maduras secas, quando comparada a sua atividade em embriões jovens (GARNCZARSKA et al., 2009).

Houve aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em relação ao maior grau de desidratação das sementes submetidas à secagem (Figura 2). Essas endoenzimas vêm sendo apontadas como importantes em eventos germinativos (antes da protrusão da radícula) e pós-germinativos de mobilização de reservas (após a protrusão da radícula) em paredes celulares do endosperma (DIRK et al., 1995).



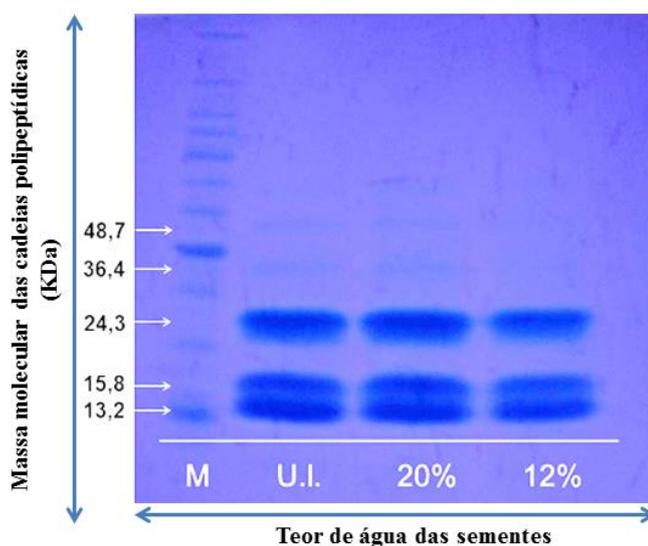
**Figura 2:** Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek com diferentes teores de água. (37% b.u.; 20% b.u.; 12% b.u.).

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Barra: Erro padrão da média.

Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012.

As células vegetais, sob diferentes tipos de estresses bióticos ou abióticos, possuem um conjunto de proteínas resistentes ao choque térmico que desempenham diferentes funções, dentre elas, auxiliar a manter a conformação nativa de outras proteínas, inclusive enzimas. Um grupo particular destas proteínas, denominadas de pequenas proteínas de choque térmico (HSPs), é bastante diverso em plantas, presentes em diferentes regiões e organelas celulares e sintetizadas durante os vários estádios de desenvolvimento vegetal. Sua expressão pode ser induzida por diferentes agentes como estresse oxidativo, frio, presença de metal pesado, radiação, dentre outros fatores. Assim, acredita-se que os papéis exercidos pelas HSPs são importantes em diferentes condições estressantes, além do estresse térmico (MORROW; TANGUAY, 2012).

Na Figura 3, estão os resultados da análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor em sementes de *R. elaeocarpum* submetidas a secagem e com diferentes teores de água.



**Figura 3.** Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek com diferentes teores de água. (M – marcador de peso molecular; U.I – umidade inicial 37% b.u.; 20% b.u.; 12% b.u.). Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012.

O perfil eletroforético destas proteínas demonstra a presença de cinco cadeias polipeptídicas, variando de 48,7 a 13,2 kDa, em sementes com diferentes conteúdos de água. As cadeias com os menores pesos moleculares (24,3; 15,8 e 13,2 kDa) são as mais abundantes nas sementes avaliadas nos diferentes tratamentos.

Proteína de baixo peso molecular de 22 kDa e resistente ao choque térmico (HSPs) foi encontrada em sementes de *Fagus sylvatica* L. e seu conteúdo foi proporcional ao tempo de estocagem (KALEMBA; PUKACKA, 2008). Em contraposição, sementes de soja secas no campo e colhidas com 13% de teor de água apresentaram maior intensidade de bandas, ou maior conteúdo de proteínas resistentes ao calor, indicando que a secagem induziu a síntese em sementes colhidas com altos teores de água (VEIGA et al., 2007). Vários mecanismos são associados com a manutenção da tolerância a dessecação, conferindo proteção contra as consequências da perda de água. Embora as sementes possam acumular proteínas resistentes ao calor durante o seu desenvolvimento, sua presença por si só parece não ser responsável pela tolerância a alta temperatura de secagem e outros fatores podem estar influenciando essa característica (JOSÉ et al., 2005). O papel funcional das proteínas resistentes ao calor em sementes de *R. elaeocarpum* precisa ser investigado.

## CONCLUSÕES

A secagem das sementes de *R. elaeocarpum* até 12% de teor de água manteve inalterada a germinação e a emergência de plântulas, além de promover aumento na atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase. Suas sementes possuem atividade enzimática de  $\alpha$ -amilase, catalase, esterase e peroxidase como resultado da presença de diferentes isoformas.

Sementes de *R. elaeocarpum* apresentam características ortodoxas e a aquisição de tolerância na secagem pode estar associada à enzima catalase e a presença de proteínas de baixo peso molecular, resistentes ao calor, sobretudo as cadeias polipeptídicas de 24,3; 15,8 e 13,2 KDa.

## REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: UFV, 1998.574p.

ALI, A.; PROBERT, R.; HAY, F.; DAVIES, H.; STUPPY, W. Post-dispersal embryo growth and acquisition of desiccation tolerance in *Anemone nemorosa* L. seeds. **Seed Science Research**, v.17, n.03, p155-163, 2007.

BAILLY, C.; LEYMARIE, J.; LEHNER, A.; ROUSSEAU, S.; COME, D.; CORBINEAU, F. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p.475–483, 2004.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, v. 101, n. 02, p. 213–228, 2008.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Plenum Press, 1994. p. 445.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. **Physiologia Plantarum**, v.93, n. 04, p. 630-638, 1995.

BOUDET, J.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F.A.; ROGNAUX, H.; LARRE, C.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. **Plant Physiology**, v.140, p. 1418-1436, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p

BUITINK, J.; LEGER, J. L.; GUIBLE, I.; VU, B. L.;WUILLEME, S.; LAMIRAULT, G.;, LE BARS, A.; LE MEUR, N.; BECKER, A.; KÜSTER, K.; LEPRINCE, O. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **The Plant Journal**, v.47, n. 5, p. 735-750, 2006.

CLOSE, T. J. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, v.100, n. 02, p. 291-296, 1997.

CRISPIM, J. E.; MARTINS, J. C.; PIRES, J. C.; ROSOLEM, C. A.; CAVARIANI, C. Determinação da taxa de respiração em sementes de soja pelo método da titulação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.10, p. 1517-1521, 1994.

DE GARA, L.; PINTO, M. C.; MOLITERNI, V. M. C.; D'EGIDIO, M. G. Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 381, p. 249–258, 2003.

DIRK, L. M. A.; GRIFFEN, A. M.; DWNIE, B.; BEWLEY, J. D. Multiple isozymes of endo- $\beta$ -mannanase in dry and imbibed seeds. **Phytochemistry**, v. 40, n. 04, p. 1045-1056, 1995.

DOWNIE, B.; HILLHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. A new assay for quantifying endo- $\beta$ -mananase activity using congo red dye. **Phytochemistry**, v.36, n. 01, p. 829-835, 1994.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise estatística - SISVAR**. Lavras: UFLA, 2000.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1995. 220p.

GARNCZARSKA, M.; BEDNARSKI, W.; JANCELEWICZ, M. Ability of lupine seeds to germinate and to tolerate desiccation as related to changes in free radical level and antioxidants in freshly harvested seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, n.1, p. 56–62, 2009.

GOYAL, K.; WALTON, L. J.; TUNNACLIFFE, A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. **Biochemical Journal**, v. 388, p. 151–157, 2005.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, n.9, p. 431-438, 2001.

ILLING, N.; DENBY, J. K.; COLLETT, H.; SHEN, A.; FARRANT, J. M. The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and Comparative Biology**, v.45, p. 771-787, 2005.

JOSÉ, A. C.; LIGTERINK, W.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A.; HILHORST, H. W. M. Changes in gene expression during drying and imbibition of desiccation sensitive *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) spreng. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n. 01, p. 270-280, 2009.

JOSÉ, S. C. B. R.; PINHO, E. V. R. V.; PINHO, R. G. V.; SILVEIRA, C. M. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n. 02, p. 115-121, 2005.

KALEMBA, E. M.; PUKACKA, S. Changes in late embryogenesis abundant proteins and small heat shock protein during storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. **Environmental and Experimental Botany**, v.63, p. 274-280, 2008.

KERMODE, A. R.; FINCH-SAVAGE, W. E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H.W. (Eds). **Desiccation and survival in plants: Drying without dying**. Wallingford, UK, CABI Publishing, 2002. p. 149–184.

KWON, S. Y.; JEONG, Y. J.; LEE, H. S.; KIM, J. S.; CHO, K. Y.; ALLEN, R. D.; KWAK, S. S. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25, n.7, p. 873–882, 2002.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, v.3, n. 04, p. 231–246, 1993.

LI, C.; SUN, W. Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. **Seed Science Research**, v.9, n.3, p. 209-217, 1999.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.

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

MORROW, G.; TANGUAY, R. M. Small heat shock protein expression and functions during development. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.44, n.10, p. 1613– 1621, 2012.

NKANG, A.; OMOKARO, D.; EGBE, A. Effects of desiccation on the lipid peroxidation and activities of peroxidase and polyphenoloxidase in seeds of *Telfairia occidentalis*. **Seed Science and Technology**, v.28, n.1, p.1-9, 2000.

OLIVEIRA, T. B.; SOARES, R. L.; TRESVESOL, L. M. F.; BRANQUINHO, D. S. P.; BARA, M. T. F.; FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; PAULA, J. R. Caracterização das folhas e cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n. 4, p. 534-41, 2010.

QUEITSCH, C.; HONG, S.W.; VIERLING, E.; LINDQUIST, S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. **Plant Cell**, v.12, p.479-492, 2000.

- RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant Cell and Environment**, v.25, n.2, p. 141-151, 2002.
- ROSA, S. D. V. F.; PINHO, E. V. R. V.; VIEIRA, E. S. N.; VEIGA, R. D.; VEIGA, A. D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas *lea* associadas à Tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.
- ROSA, S. D. V. F.; JUNIOR, D. S. B.; PINHO, E. V. R. V.; VEIGA, A. D.; SILVA, L. H. C. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canephora* Pierre seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.2, p. 199-205, 2005.
- SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, p. 104-114, 2005.
- SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. V. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.
- SCANDALIOS, J. G. **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1997.
- TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isozymes: developments in plant genetic and breeding**. Parte A (IA). New York: Elsevier, 1983. 516 p.
- VEIGA, A. D.; ROSA, S. D. V. F.; SILVA, P. A.; OLIVEIRA, J. A.; ALVIM, P. O.; DINIZ, K. A. Tolerância de sementes de soja à dessecação. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.3, p. 773-780, 2007.
- VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Eds.), **Seed Development and Germination**. Marcel Dekker, New York, 1995. p. 237–271.
- WALTERS, C.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Desiccation and Damage. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Eds.) **Desiccation and survival in plants. Drying without dying**, 2002. p. 263–291.
- WALTERS, C.; KOSTER, K. L. Structural dynamics and desiccation damage in plant reproductive organs. In: JENKS, M. A.; WOOD, A. J. (Eds), **Plant desiccation stress**. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, 2007. p. 251–282.

WALTERS, C.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, v.11, n. 2, p.135-148, 2001.

## CAPÍTULO 2

### **Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas à secagem**

Physiological and biochemical performance of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. seeds harvested at different maturation stages and subjected to drying

(Artigo conforme as normas da Revista African Journal of Agricultural Research)

**RESUMO:** Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar alterações no desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., em diferentes estádios de maturação, quando submetidas à secagem. As sementes foram coletadas em dois estádios de maturação (Estádio 1: maduras; Estádio 2: imaturas). Uma amostra das sementes, em cada estágio de maturação, foi mantida com o teor de água inicial (controle) e outra parte foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar na temperatura de 35°C até alcançarem os teores de água de 20 e 12% b.u. Imediatamente após a imposição dos tratamentos, foram avaliados parâmetros acerca da qualidade fisiológica, do vigor e do desempenho bioquímico das sementes. A secagem das sementes até 12% (b.u.) afetou negativamente a qualidade fisiológica e o vigor, principalmente para as sementes imaturas. Maior concentração de sacarose foi obtida para sementes secas, independente do estágio de maturação. Não foi detectada atividade de isoenzimas de catalase e peroxidase e proteínas resistentes ao calor não foram visualizadas em géis desnaturantes de poliacrilamida. A enzima  $\alpha$ -amilase foi mais ativa em sementes maduras e úmidas, demonstrando o efeito negativo da secagem principalmente para sementes imaturas. Para a isoenzima esterase, detectou-se maior intensidade de bandas em sementes imaturas, independente do teor de água, e pouca redução de sua atividade à medida que o teor de água das sementes maduras foi diminuindo. Pode-se concluir que as sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. apresentam alterações fisiológicas e bioquímicas quando submetidas à secagem, e são intolerantes à dessecação, sendo esta intolerância mais evidenciada antes das sementes atingirem a maturidade fisiológica.

**Palavras-chave:** espécie florestal, maturidade fisiológica, tolerância à dessecação, isoenzimas

**ABSTRACT:** This study aimed to evaluate alterations in the physiological and biochemical performance of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. seeds at different maturation stages when subjected to drying. The seeds were harvested at two maturation stages (Stage 1: mature; Stage 2: immature). A sample of seeds at each maturation stage was not subjected to drying (control), and another sample was subjected to drying in an air circulation oven at 35 °C until the seeds reached water content levels of 20% and 12% bushel (bu.). The parameters regarding the physiological quality, vigor and biochemical performance of the seeds were evaluated immediately at the onset of treatment. The drying of seeds up to 12% bu. negatively affected the physiological quality and vigor of the seeds, particularly in the immature seeds. Higher concentrations of sucrose were found in dry seeds, regardless of maturation. There was no detectable activity of catalase and peroxidase isoenzymes, and heat-resistant proteins were not observed on denaturing polyacrylamide gels. The  $\alpha$ -amylase enzyme was most active in mature and moist seeds and showed the negative effect of drying, particularly with respect to immature seeds. A greater intensity of esterase isoenzyme bands was detected in immature seeds (regardless of water content) with little reduction of activity as the water content of mature seeds decreased. It can be concluded that the *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. seeds show physiological and biochemical alterations when subjected to drying, that they are intolerant to desiccation, and that this seed intolerance is most evident prior to reaching physiological maturity.

**Key words:** forest species, physiological maturity, desiccation tolerance, isoenzymes

## INTRODUÇÃO

A espécie *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., popularmente conhecida como curriola, abiú-do-Cerrado, abiu-piloso, bacupari liso, fruta-de-veado, grão-de-galo, massaranduba, gunjara, mandapuca e pitomba-de-leite, é uma frutífera, de hábito arbustivo-arbóreo, amplamente distribuída em áreas de Cerrado, ocorrendo nas fitofisionomias de cerradão, cerrado sentido restrito, cerrado ralo, borda de vereda e mata mesofítica (Almeida et al., 1998). Possui flores pequenas hermafroditas ou pistiladas, arrançadas em inflorescências racemosas com eixo curto, dispostas densamente nas axilas das folhas, ao longo dos ramos. A floração ocorre de maio a setembro, com pico de flores abertas em agosto, em plena estação seca, e a maturação dos frutos ocorre no período chuvoso, favorecendo a dispersão das sementes (Gama et

al., 2011). Os frutos apresentam cheiro forte e sabor agradável, coloração esverdeada e polpa branca, sendo apreciados pelas populações locais na forma de suco ou *in natura* (Dalponte e Lima, 1999). É indicada para áreas de preservação permanente, já que é a espécie que se adapta a ambientes abertos (Lorenzi, 1992). Não foram encontrados, na literatura, relatos acerca do comportamento fisiológico de suas sementes em resposta à perda de água. Assim, pela sua importância ecológica e ao seu potencial na geração de serviços e renda, é importante determinar características fisiológicas das sementes, a fim de estabelecer estratégias de conservação e contribuir para o estabelecimento de protocolos para a produção de mudas desta espécie.

A condição fisiológica da semente foi inicialmente estudada por Roberts (1973), que classificou as sementes em ortodoxas ou recalcitrantes de acordo com o comportamento no armazenamento. Mais tarde, Ellis et al. (1990) introduziram o conceito de intermediárias. Como este aspecto fisiológico está relacionado com o grau de tolerância das sementes à desidratação, deve-se classificá-las como tolerantes à dessecação ou ortodoxas; não tolerantes à dessecação ou recalcitrantes e ainda as intermediárias, cujo comportamento durante a secagem e armazenamento possuem ora características semelhantes as ortodoxas ora as recalcitrantes.

O padrão de desenvolvimento das sementes ortodoxas é caracterizado por três grandes fases: a embriogênese (histodiferenciação), em que o zigoto fertilizado sofre múltiplas divisões celulares; a maturação ou enchimento da semente, que ocorre síntese de reservas de armazenamento, rápida expansão celular e acúmulo de matéria seca; e por fim, a dessecação e quiescência, em que ocorre desidratação até atingir o equilíbrio com a umidade relativa do ar, apresentando graus de umidade relativamente baixos no momento da colheita (Jiang e Kermodé, 1994; Angelovici et al., 2010). As sementes ortodoxas, geralmente, não só toleram a dessecação mas, provavelmente, dependem dela para redirecionar os processos metabólicos do desenvolvimento em direção à germinação. Considerando apenas a secagem, há dois períodos distintos durante o desenvolvimento da semente: intolerante (primeira fase e parte da segunda) e tolerante (parte da segunda fase e toda a terceira fase) à dessecação. Por outro lado, as sementes recalcitrantes praticamente não perdem água durante a maturação, passando diretamente do metabolismo de desenvolvimento para a germinação, são muito sensíveis à dessecação e normalmente mantêm graus de umidade de 30% a 70% (Barbedo e Marcos-Filho, 1998; Marcos-Filho, 2005).

Durante o desenvolvimento das sementes, as células vegetais necessitam de adaptações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas temporalmente coordenadas por expressões diferenciais de genes, capazes de impedirem a morte ou dano celular à medida que o conteúdo de água deste órgão é retirado. Os mecanismos de tolerância à dessecação em angiospermas parecem ter originado ancestralmente de algas e progenitores endossimbióticos de mitocôndria e cloroplasto nos vegetais (Gaff e Oliver, 2013). A aquisição de tolerância à dessecação é regulada, com os possíveis mecanismos de tolerância sendo acumulados apenas em momentos precisos após a fertilização e os tecidos vegetativos devem responder a sinais ambientais para ativar mecanismos de proteção para a planta inteira. É concebível, que sinais ambientais de perda de água extrema possam ativar um repertório existente de genes específicos de proteção em sementes e tecidos vegetativos (Illing et al., 2005).

Estimativas sugerem que aproximadamente 50% das espécies tropicais produzam sementes sensíveis à dessecação (Tweddle et al., 2003). Nas espécies capazes de suportarem esse processo, a tolerância a dessecação é adquirida na fase de acúmulo de reservas e pode ser induzida por meio de secagem lenta artificial, em determinados estádios de desenvolvimento. O ácido abscísico (ABA), além de controlar o acúmulo de substâncias de reservas, possui papel importante na tolerância à dessecação em sementes ortodoxas (Nambara et al., 2010). Durante o desenvolvimento, a concentração de ABA diminui próximo ao final desta etapa, enquanto a tolerância à dessecação é aumentada (Pammenter et al., 1994). As sementes passam por mudanças nos diferentes estádios de desenvolvimento e com a progressiva perda de água, após a maturidade fisiológica, tornam-se mais tolerantes a temperaturas mais elevadas de secagem, indicando que eventos ocorrem juntamente com a redução do teor de água (Rosa et al., 2004).

Diversas mudanças bioquímicas ocorrem nas células das sementes em resposta à dessecação. As tensões associadas a perda extrema de água incluem o estresse mecânico associado com a perda de turgor, estresse oxidativo de radicais livres e a desestabilização ou perda da integridade macromolecular (Walters et al., 2002). Em *Arabidopsis*, a transição entre o acúmulo de reservas na semente e a dessecação está associada a grande alteração no seu metabolismo, resultado do acúmulo de diferentes açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos ricos em nitrogênio e metabólitos derivados do chiquimato (Fait et al., 2006).

Com a iniciação da secagem há uma mudança na expressão gênica em sementes, em que os genes que codificam moléculas de proteção têm um papel importante em tecidos tolerantes à dessecação (Ramanjulu e Bartels, 2002). A aquisição de tolerância à dessecação, ou a habilidade para tolerar potenciais de água muito baixos, está correlacionada com a acumulação de vários componentes protetores, incluindo açúcares e proteínas. Estes componentes incluem proteínas resistentes ao calor “heat shock proteins” (*HSP*), enzimas removedoras de radicais livres e açúcares não reduzidos ou solutos de baixo peso molecular, que se acumulam tipicamente durante os estádios finais da embriogênese, coincidindo com a aquisição de tolerância à dessecação. Um Grupo especial de proteínas conhecidas como “late embryogenesis accumulated” (*LEA*) torna-se abundante na fase final de maturação da semente por causa do controle genético exercido pelo fitohormônio ABA, e possivelmente, atua como chaperonas, protegendo estruturas macromoleculares contra injúrias resultantes da dessecação (Hoekstra et al., 2001; Manfre et al., 2009). Durante a dessecação de sementes, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem levar ao estresse oxidativo e causar danos celulares, resultando em deterioração. No entanto, as células são dotadas de enzimas desintoxicantes e compostos antioxidantes que removem os EROs. Assim, os mecanismos de desintoxicação desempenham papel-chave na aquisição de tolerância à dessecação de sementes em desenvolvimento (Bailly, 2004).

Dessa forma, a pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar a tolerância à dessecação, por meio de alterações no desempenho fisiológico e bioquímico, de sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. em diferentes estádios de maturação e submetidas à secagem.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os frutos foram coletados na Fazenda Gameleira (16° 06' 20'' S – 51° 17' 11'' W, altitude de 592 m), no município de Montes Claros de Goiás, em dezembro de 2011. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (MG). Os frutos foram despulpados manualmente e as sementes foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por um minuto, e em seguida lavadas com água destilada. Após a lavagem as sementes foram dispostas em bandejas plásticas cobertas com papel toalha para a remoção do excesso de água. As sementes foram divididas em dois grupos, de acordo com o ponto

de maturação dos frutos, sendo: Estádio 1: Sementes maduras, provenientes de frutos coletados no chão, embaixo das árvores; Estádio 2: Semente imaturas, provenientes de frutos coletados diretamente na planta, antes de sua completa maturação. O teor de água das sementes, nos dois estádios de maturação, foi determinado pelo método da estufa a  $105\pm 3^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (Brasil, 2009), com quatro subamostras de 10 sementes. O cálculo foi feito na base úmida (b.u.), sendo o resultado expresso em porcentagem. Após a determinação do teor de água inicial, parte das sementes foi acondicionada em sacos de papel e mantidos em estufa de secagem com circulação forçada de ar sob a temperatura de  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Durante a secagem, a massa das amostras foi avaliada em balança de precisão a cada uma hora, até alcançar valores referentes aos teores de água de 20 e 12% (b.u.). A perda de água pelas sementes foi determinada por meio da fórmula recomendada pelas Regras para Análise de Sementes:

$$Pf = Pi \cdot \left( \frac{100 - T_{Ai}}{100 - T_{Af}} \right)$$

Em que: Pf: massa final da amostra (g); Pi: massa inicial da amostra (g); T<sub>Ai</sub>: teor de água inicial das sementes (% b.u.); T<sub>Af</sub>: teor de água desejado das sementes (% b.u.).

As sementes nos dois estádios de maturação e com diferentes teores de água foram avaliadas mediante os seguintes parâmetros: germinação (%); índice de velocidade de germinação; emergência (%); índice de velocidade de emergência; teste de raios X; condutividade elétrica; taxa respiratória; quantificação de açúcares redutores, não redutores e solúveis totais; perfil eletroforético de enzimas (catalase, esterase e peroxidase) em gel não desnaturante e de proteínas resistentes ao calor por meio de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida; além das atividades enzimáticas da  $\alpha$ -amilase e endo- $\beta$ -mananase. Como tratamento pré-germinativo, foi realizada a escarificação manual das sementes com lixa d'água nº 80, no lado oposto a micrópila, a fim de acelerar o processo de embebição e consequentemente a germinação.

**Teste de germinação:** Para o teste de germinação, a semeadura foi realizada em rolos de papel “germitest” com duas folhas para a base e uma para a cobertura, umedecidos com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco (Brasil, 2009), com quatro repetições de 25 sementes. Os rolos, contendo

as sementes, foram mantidos em germinador regulado à temperatura de 30°C. Foram realizadas avaliações diárias, até completa estabilização, a fim de se calcular o índice de velocidade de germinação (IVG), segundo Maguire (1962), considerando germinadas as sementes que tiveram protrusão radicular de 1,0 cm. Para a porcentagem de germinação foram consideradas apenas as plântulas normais, que apresentavam todas as estruturas essenciais desenvolvidas (raiz primária bem desenvolvida, hipocótilo e epicótilo desenvolvidos) 45 dias após a semeadura.

**Teste de emergência:** Foram utilizadas 100 sementes divididas em quatro repetições de 25 para cada tratamento. A semeadura foi realizada em bandeja plástica de 40x30x8 cm, contendo como substrato uma mistura de terra de subsolo e areia na proporção de 3:1. A semeadura foi realizada a 4 cm de profundidade e o substrato foi umedecido até 70% de sua capacidade de campo, sendo posteriormente irrigado quando necessário. As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento na temperatura de 25°C e fotoperíodo (oito horas de luz e 16 horas de escuro) durante 45 dias. Foram realizadas contagens diárias a fim de se determinar o índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE), de acordo com Maguire (1962), tendo como critério a emergência a 1,5 cm do solo para as contagens. Após completa estabilização, avaliou-se também a porcentagem de emergência (% E) em que foram consideradas apenas as plântulas normais (raízes primária e secundárias bem desenvolvidas, hipocótilo, epicótilo e protofilos expandidos), decorridos 45 dias após a semeadura.

**Teste de raios X:** Para a avaliação de alterações estruturais durante a dessecação, foram obtidas imagens das estruturas internas das sementes por meio de aparelho de raios X, a fim de demonstrar possíveis danos decorrentes do processo de secagem. As sementes, de cada tratamento, foram dispostas em placas de acrílico transparente sobre fita adesiva de dupla face e submetidas à radiação em equipamento de raios X “Faxitron HP”, modelo 43855A, na intensidade de 30Kv por 45 segundos, obtendo imagens digitais das estruturas internas das sementes.

**Teste de condutividade elétrica:** Este teste foi realizado com quatro repetições de 10 sementes por tratamento, previamente pesadas em balança eletrônica de precisão de 0,001g e, em seguida, colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água destilada e deionizada e mantidas em câmara de germinação do tipo BOD regulada à 25°C por 24 horas. Após esse período, foi determinada a condutividade elétrica, da água de embebição, em condutivímetro digital de bancada, da marca Digimed, modelo CD 21A, e os resultados foram expressos em  $\mu\text{Scm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .

**Taxa Respiratória:** A taxa respiratória foi determinada pelo método da titulação, segundo metodologia descrita por Crispim et al. (1994). Para cada repetição foi utilizado um erlenmeyer de vidro, contendo tela fina presa a boca como suporte para as sementes. Envoltas pela tela foram depositadas duas folhas de papel mata-borrão umedecidas com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes o seu peso seco, sobre as quais as sementes foram acondicionadas. No fundo de cada erlenmeyer foi adicionado 40 mL de solução de KOH 0,1 N. Para cada amostra foi constituída uma testemunha, denominada prova em branco, preparada sem sementes. Em seguida, os erlenmeyer, contendo as amostras, foram totalmente vedados com filme plástico, a fim de evitar trocas gasosas, e mantidos em câmara de germinação, tipo BOD, por um período de 24 horas à temperatura constante de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após esse período, retirou-se 25 mL da solução de KOH 0,1 N de cada amostra, e foram adicionadas três gotas de fenolftaleína para a titulação com HCl 0,1 N. No ponto de viragem foi registrado o volume de HCl gasto para neutralizar a solução de KOH em cada uma das amostras testadas. Foram empregadas quatro repetições de 10 sementes para cada tratamento, as quais foram pesadas previamente para a obtenção da massa seca das sementes. Após a titulação, a taxa respiratória foi determinada por meio da seguinte equação:

$$RR = \frac{(B - L) \times C}{MS}$$

Em que: B e L são os volumes de HCl 0,1 N utilizado nas titulações da prova em branco e da amostra, respectivamente; C é a constante denominada fator de correção com valor de 3,52 e MS é a massa seca das sementes submetidas as avaliações. Os resultados foram expressos em mg de CO<sub>2</sub> por grama de semente seca.

**Determinação do conteúdo de açúcares redutores, não redutores e solúveis totais:** Para a quantificação dos açúcares redutores (AR), não redutores (sacarose) e solúveis totais (AST), 400 mg de sementes, de cada tratamento, foram macerados em cadinho na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado 10 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,0) e a mistura mantida à temperatura de 40°C por 30 minutos. A seguir, o macerado foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante armazenado em freezer -20°C até o momento das análises. Os teores de açúcares redutores (AR) foram quantificados adicionando o reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) a 400 µL do extrato de sementes e foi utilizada a curva de

referência de glicose (Miller, 1959). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm. Os teores de AST e de sacarose foram quantificados segundo Yemm e Willis (1954), utilizando o reagente antrona. Para os AST, o extrato de sementes foi diluído em tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,0) na proporção 1:2, sendo utilizada a alíquota de 30  $\mu$ L desta solução para a quantificação. Para a quantificação da sacarose adicionou-se 800  $\mu$ L do extrato obtido a 800  $\mu$ L de KOH 30%. A solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 15 minutos, e em seguida foram retirados 10  $\mu$ L da solução para quantificação da sacarose. A curva de referência, para AST e sacarose, foi plotada a partir de concentrações conhecidas de glicose e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 620 nm.

**Perfil eletroforético de enzimas:** As atividades enzimáticas de  $\alpha$ -amilase, catalase, esterase e peroxidase, foram avaliadas em eletroforese de gel de poliacrilamida não desnaturante. Foram trituradas 10 sementes, de cada tratamento, na presença de nitrogênio líquido e do antioxidante PVP 40 (polivinilpirrolidona), sendo os extratos imediatamente armazenados a  $-80\pm 2^\circ\text{C}$  até a realização das análises. Para análise de cada enzima retiraram subamostras de 100mg, nas quais, para catalase e esterase, foram adicionadas o tampão tris (Tris-HCl 0,2M, pH 8 + 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol), na quantidade de 2,5 vezes o seu peso. Para a extração da peroxidase, utilizou-se tampão fosfato (0,034M de fosfato de sódio bi-básico; 0,2M de sacarose; 2,56% de PVP; 0,003M de DTT; 0,0057M ácido ascórbico; 0,0025M de borato de sódio; 1% de PEG 6000, 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol). As amostras dos materiais de cada tratamento foram mantidas em geladeira a temperatura de 4°C “overnight” e então foram centrifugadas 16.000 xg por 30 minutos a 4°C, sendo, em seguida aplicados 60  $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra ao sistema descontínuo de géis de poliacrilamida a 4,5% (gel de empilhamento) e 7,5% (gel separador). O sistema gel/eletrodo foi o Tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética realizadas a 4°C sob voltagem constante de 150 V. Após a corrida eletroforética, os géis foram revelados para o sistema enzimático catalase e esterase de acordo com Alfenas (1998) e peroxidase de acordo com Tanksley e Orton (1983).

As sementes foram submetidas ao teste de germinação por 48 horas para análise da  $\alpha$ -amilase. Após este período, as plântulas foram retiradas, e o tecido de reserva foi triturado em cadinho (sobre gelo) na presença de nitrogênio líquido e PVP, e as amostras foram armazenadas em ultrafreezer, a  $-80\pm 2^\circ\text{C}$ , até o momento das análises. A extração da enzima se processou pela adição de 200  $\mu$ L de tampão de extração tris-HCl,

0,2M, pH 8,0 a 100 mg das amostras de cada tratamento; o homogeneizado foi mantido por 12 horas em geladeira na temperatura de 5°C, centrifugado a 16.000 g, a 4°C, por 30 minutos e, volumes de 40 µL do extrato foram aplicados em gel de poliacrilamida a 4,5% (gel de empilhamento) e 7,5% (gel separador – contendo 5% de amido solúvel). As bandas de atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foram reveladas, segundo Alfenas (1998); e após o tratamento com iodo, avaliou-se a presença ou ausência de bandas claras em fundo azulado (revelação negativa), pela reação com a amilose, bem como a intensidade relativa das isoformas.

Após a revelação, a avaliação dos géis foi realizada sobre transluminador, sendo considerada a presença e ausência das bandas para cada amostra e intensidade relativa das diferentes isoformas.

**Determinação do perfil eletroforético de proteínas resistentes ao calor:** As proteínas de interesse foram separadas e visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). As sementes, úmidas e secas, foram trituradas na presença de nitrogênio líquido e em seguida, foi adicionado tampão de extração descrito por Alfenas (1998), na proporção de 10 partes de tampão para 1 de amostra. As amostras foram centrifugadas a 16000 xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e incubado em banho-maria a 85°C por 10 minutos para avaliação das proteínas resistentes ao calor. As amostras foram novamente centrifugadas como anteriormente. Antes da aplicação no gel desnaturante de poliacrilamida, 40 µL de tampão da amostra (2,5 mL de glicerol; 0,46 g de SDS; 20 mg de azul de Bromofenol; Tris-HCl pH 7,5) foram adicionados em 70 µL de cada extrato e fervidos por cinco minutos. Em seguida foram aplicados 50 µL de cada amostra em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador); o tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina + SDS pH 8,9 e a corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical, à temperatura ambiente e voltagem constante de 150V por quatro horas. Para determinação da massa molecular das cadeias polipeptídicas, utilizou-se o marcador de massa variando de 10 a 100 KDa (Invitrogen). Após a corrida, os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue a 0,05% por 24 horas e descorados em solução de etanol:ácido acético:água nas proporções 0,5:1:8,5 (v:v), conforme Alfenas (1991). A avaliação dos géis foi realizada sobre transluminador, sendo considerada a presença e ausência das bandas.

**Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase:** Para a extração da enzima endo- $\beta$ -mananase as sementes de cada tratamento, pré-embebidas em água destilada por 24

horas e, sem o tegumento, foram maceradas em nitrogênio líquido e PVP 40. Foram adicionados 600 µL do tampão de extração [0,1M Hepes; 0,5M NaCl e 0,5% de ácido ascórbico, pH 8,0] a 200 mg do macerado de sementes de cada tratamento. Em seguida, os microtubos contendo as amostras foram agitados em agitador tipo vortex por 1 minuto e centrifugados por 30 minutos a 10000 xg aos 4 °C. Do sobrenadante, 20 µL foram aplicados em gel contendo 6 mL de *locust bean gum* -Sigma nr 0753 (LBG), 0,24 g de agarose (Qbiogene) e 24 mL de tampão pH 5,0 (11 mL de ácido cítrico 1M, 50 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 149 mL de água destilada). As alíquotas foram aplicadas em furos de 2 mm feitos no gel com auxílio de um furador e em seguida, o gel, contendo as amostras, foi transferido para um germinador a 25°C por período de 21 horas, no escuro, em câmara úmida. Logo após, o gel foi coberto com o corante vermelho congo a 0,5% por 30 minutos e descorado em etanol por 10 minutos. Removido o etanol com água destilada, foi adicionada a solução de 1M de NaCl até a observação visual da formação de halos brancos nos furos que vão conter as amostras. Nesse momento, foi feita a medição do diâmetro dos halos em duas direções com um paquímetro resultando em uma média. Para o cálculo da atividade da enzima, foi feita a comparação com a curva padrão gerada pela endo-β-mananase comercial de *Aspergillus niger* (Megazyme). O cálculo da atividade da enzima endo-β-mananase foi realizado segundo Downie et al. (1994). O ensaio foi conduzido com três repetições para cada tratamento.

**Delineamento estatístico:** O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2x3, sendo dois estádios de maturação (sementes maduras e sementes imaturas) e três teores de água (38% - teor de água inicial, 20% e 12% b.u.). Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do software Sisvar (Sistema de Análise de Variâncias) para Windows (Ferreira, 2000). Para a dosagem de açúcares redutores, açúcares solúveis totais e de sacarose foram utilizadas quatro repetições, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados expressos em porcentagem foram transformados em arco-seno  $\sqrt{x}/100$ , em que x se refere à porcentagem e os dados numéricos foram transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade fisiológica (Tabela 1) das sementes colhidas no estágio 1 (imaturas) e submetidas a secagem foi inferior as colhidas no estágio 2 (maduras) e não secas (teor de água inicial). A secagem das sementes até 12% (b.u.) influenciou negativamente a qualidade fisiológica, independente do estágio de maturação das sementes, atingindo valores nulos para germinação e emergência de plântulas.

**Tabela 1.** Índice de velocidade de germinação (IVG); porcentagem de germinação (% G); índice de velocidade de emergência (IVE) e porcentagem de emergência de plântulas (% E) para sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água.

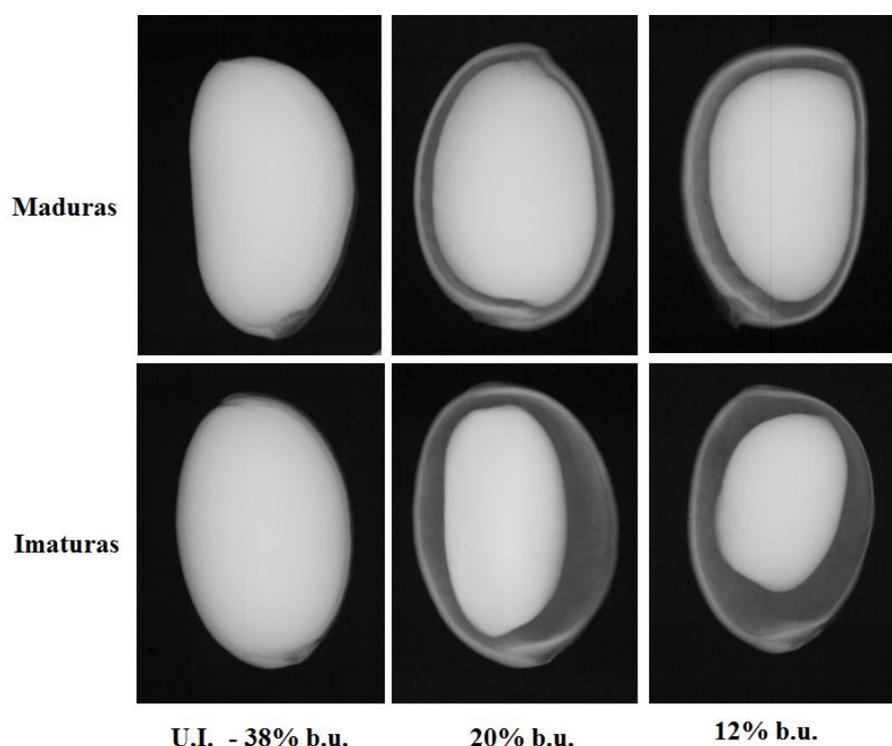
Variáveis	Maturação	Teor de água (% b.u.)			CV (%)
		38	20	12	
IVG	Maduras	2.70 bA*	0.87 aB	0.00 aC	13.50
	Imaturas	3.20 aA	0.00 bB	0.00 aB	
G (%)	Maduras	74.20 aA	36.81aB	0.00 aC	19.62
	Imaturas	80.27 aA	0.00 bB	0.00 aB	
IVE	Maduras	0.50 aA	0.06 aB	0.00 aB	16.34
	Imaturas	0.17 bA	0.00 aB	0.00 aB	
E (%)	Maduras	54.98 aA	15.67 aB	0.00 aC	22.32
	Imaturas	33.91 bA	0.00 bB	0.00 aB	

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Ao comparar o desempenho fisiológico entre sementes úmidas e secas, dentro de cada estágio de maturação, para todas as variáveis analisadas, menores valores foram encontrados quando as sementes foram secas até 12% de teor de água, principalmente para as sementes imaturas. Assim, a secagem das sementes provocou alterações no desempenho fisiológico, sendo tais efeitos mais acentuados em sementes que ainda não atingiram totalmente a maturidade fisiológica. Estes resultados corroboram com o encontrado por Nakada et al. (2011) que, ao trabalhar com sementes de pepino em diferentes estádios de maturação e submetidas à secagem a sombra, também obtiveram

menor qualidade fisiológica e vigor para sementes secas e em estádios iniciais de desenvolvimento. Sementes de café (*C. arabica* L.), colhidas nos estádios verde cana e cereja tiveram melhor condição fisiológica que aquelas colhidas no estágio verde, e deste modo, sementes colhidas no estágio verde foram consideradas intolerantes a dessecação (Brandão Júnior et al., 2002).

A avaliação da integridade e da morfologia interna das sementes por meio do teste de raios X (Figura 1) demonstrou alterações morfológicas no endosperma decorrentes do processo de secagem. Por meio das imagens de raios X foi possível observar o aumento do espaço livre existente entre o embrião e o tegumento (embrião/cavidade embrionária) e a redução da área embrionária à medida que se diminuiu o teor de água das sementes, principalmente para sementes imaturas. Estes resultados refletem diretamente no desempenho fisiológico das sementes, demonstrando que, os danos decorrentes do processo de secagem exerceram prejuízos a qualidade fisiológica, conforme verificado pelos testes de germinação e de emergência de plântulas, sendo estes prejuízos mais acentuados quando secas até 12% b.u., principalmente para as sementes imaturas.



**Figura 1.** Imagens radiográficas de sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água. Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012.

Resultado semelhante foi obtido no trabalho desenvolvido por Goodman et al. (2005), que constataram a natureza recalcitrante de sementes de carvalho vermelho do norte (*Quercus rubra* L.), determinando a separação entre cotilédone-cotilédone e pericarpo-cotilédone com o avanço da secagem e estabelecendo a relação importante entre o dano avaliado em imagens de raios X e a viabilidade de sementes e plântulas. Os mesmos autores salientam que, a condição morfológica das sementes provavelmente reflete o resultado cumulativo de todos os fatores que influenciam a perda de viabilidade; portanto, as condições observadas nas imagens de raios X podem fornecer a representação mais abrangente de danos acumulados durante a dessecação, confirmando o potencial da análise de imagens de raios X como o meio rápido e não destrutivo de avaliação da viabilidade das sementes. De acordo com Dell'Aquila (2007), a área de espaço livre pode ser considerada indicador do potencial de germinação e está bem relacionada também com o aumento de plântulas anormais, visto que a partir de sementes radiografadas de pimenta, com área livre entre o embrião e o endosperma superior a 2,7%, foi observada redução progressiva na formação de plântulas normais.

Com relação ao vigor das sementes, houve influência do estágio de maturação e dos teores de água na condutividade elétrica e na taxa respiratória (Tabela 2).

**Tabela 2.** Condutividade elétrica (CE) e taxa respiratória (TR) de sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água.

Variáveis	Maturação	Teores de água (% b.u.)			CV (%)
		38	20	12	
CE ( $\mu\text{Scm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Maduras	5.12 aA*	3.39 bB	3.43 bB	11.35
	Imaturas	3.61 bA	4.36 aA	4.27 aA	
TR (mg CO <sub>2</sub> /g M.S.)	Maduras	5.63 aB	7.19 aA	7.64 aA	13.13
	Imaturas	4.36 bB	5.92 bA	5.78 bAB	

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Pela análise da Tabela 2, verifica-se que sementes maduras e não submetidas à secagem tiveram os valores de condutividade elétrica do lixiviado maiores que as sementes secas. Para sementes imaturas não houve diferença na condutividade elétrica entre sementes úmidas e secas. Sementes que ainda não atingiram a maturidade

fisiológica são mais sensíveis à dessecação, apresentando vigor inferior ao das sementes maduras, já que nestas podem estar atuando mecanismos de reparo de membranas celulares, em resposta aos danos decorridos da secagem. Sementes de café (*Coffea arabica* L.) colhidas no estágio verde, são mais susceptíveis aos danos decorrentes do processo de secagem que as colhidas nos estádios cereja e verde-cana, inferindo que os mecanismos de proteção às membranas são desenvolvidos entre os estádios verde e verde-cana (Guimarães et al., 2002). A condutividade elétrica em sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.) obtidas de frutos colhidos 40 dias após a antese (imatuross) foi bastante elevada quando comparada às sementes oriundas de frutos colhidos em épocas mais tardias (70 dias após a antese), demonstrando que sementes imaturas apresentam organização de membranas deficiente e, por conseguinte, maior lixiviação de solutos (Vidigal et al., 2009).

A taxa respiratória para sementes maduras foi superior a obtida para as sementes imaturas, em todos os teores de água, indicando que sementes maduras tiveram maior eficiência na reativação do metabolismo e do processo respiratório. Para os dois estádios de maturação, sementes com baixos teores de água tiveram maiores valores para a taxa respiratória. De acordo com Wang et al. (2012), a sobrevivência de sementes de ervilha após desidratação e embebição aumenta linearmente com o aumento da capacidade de recuperar a integridade das mitocôndrias, indicando que a recuperação da estrutura e função mitocondrial durante a germinação tem papel importante na tolerância à dessecação das sementes.

Para os teores de açúcares redutores, não houve diferença entre os estádios de maturação e teores de água (Tabela 3).

**Tabela 3.** Concentrações de açúcares redutores (AR); açúcares solúveis totais (AST) e de sacarose (S) em sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água.

Variáveis	Maturação	Teores de água (% b.u.)			CV (%)
		38	20	12	
AR (mg/g <sup>-1</sup> )	Maduras	0.15 aA*	0.19 aA	0.21 aA	9.13
	Imaturas	0.16 aA	0.20 aA	0.23 aA	
AST (mg/g <sup>-1</sup> )	Maduras	2.81 aB	3.81 bB	7.67 bA	16.58
	Imaturas	2.97 aB	8.20 aA	9.19 aA	

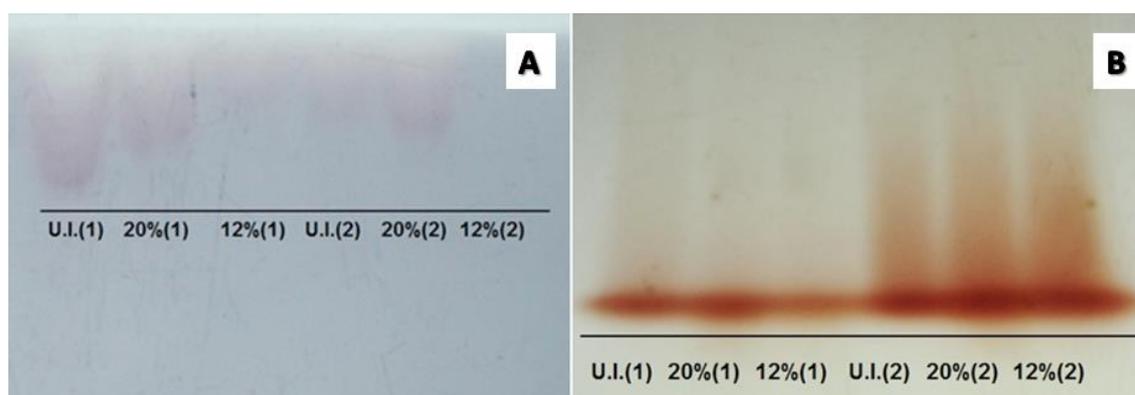
S (mg/g <sup>-1</sup> )	Maduras	18.18 aC	48.00 bB	66.56 aA	
	Imaturas	21.22 aB	77.90 aA	71.74 aA	17.91

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Para açúcares solúveis totais houve diferença entre os teores de água nos dois estádios de maturação, apresentando maiores concentrações em sementes com menores teores de água, tanto para sementes imaturas quanto para as maduras. Houve aumento nas concentrações de sacarose à medida que o teor de água das sementes diminuiu, nos dois estádios de maturação, demonstrando a influência da secagem no acúmulo destes açúcares nas sementes. Para sementes de Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), os teores de açúcares solúveis totais corresponderam a cerca de 10% da matéria seca das sementes maduras e a sacarose foi detectada em grandes proporções durante todo o processo de desenvolvimento, e deste modo, o acúmulo de reservas solúveis de carbono está relacionado com o grau de maturação das sementes e com a qualidade final das mesmas (Borges et al., 2006). Em sementes de *Acer platanoides* L., a concentração de sacarose, em sementes úmidas e colhidas em estádios iniciais de desenvolvimento, foi maior que nas sementes colhidas quando alcançaram a maturidade. A secagem rápida das sementes imaturas promoveu aumento na concentração de sacarose, ao passo que, para sementes maduras a secagem não exerceu nenhum efeito sobre a concentração desse açúcar (Hong et al., 2000). Dentre os carboidratos de reserva de sementes destacam-se o amido e a sacarose que além da função de reserva, podem atuar na estabilidade das membranas durante a dessecação e a retomada do crescimento embrionário (Hellmann et al., 2008).

No perfil eletroforético de isoenzimas, não foi observada atividade enzimática para catalase e peroxidase, independente do estádio de maturação ou teor de água. É possível que a atividade e a estrutura de certas enzimas ou proteínas, em sementes sensíveis à dessecação, sejam permanentemente alteradas pela secagem, resultando em perda de atividade (Nkang et al., 2000). Outra possibilidade é que, por se tratar de um protocolo estabelecido para sementes de espécies distintas da espécie em estudo, o tampão de extração utilizado neste trabalho talvez não seja adequado para sementes de *P. ramiflora*, em função de sua composição química.

O padrão eletroforético para as enzimas  $\alpha$ -amilase e esterase em sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água é mostrado na Figura 2. De acordo com a metodologia utilizada, os resultados indicaram a atividade de apenas uma isoforma de  $\alpha$ -amilase e esterase nesta espécie nas condições avaliadas. As variáveis analisadas (maturação e teor de água) não induziram aparecimento de novas isoformas apesar de que em frutos verdes, a redução para 12% b.u, resultou na inibição enzimática da  $\alpha$ -amilase percebida pelo desaparecimento de sua isoforma (Fig. 2A).



**Figura 2.** Padrão eletroforético das enzimas  $\alpha$ -amilase (A) e esterase (B) em sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. em dois estádios de maturação e com diferentes teores de água. (U.I – Umidade Inicial – 38%; 1 – Estádio 1 - Madura; 2 – Estádio 2 - Imatura). Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012.

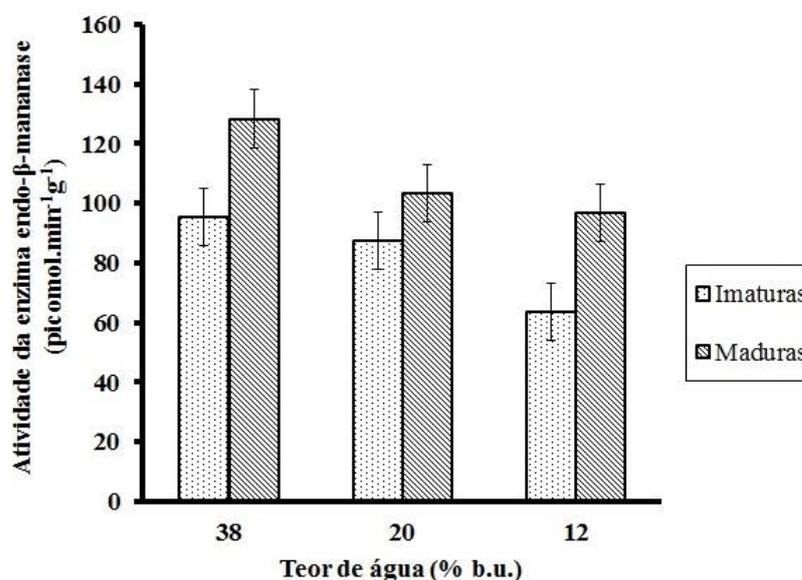
Esterase e  $\alpha$ -amilase das sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. apresentaram atividades enzimáticas com comportamento inverso, sobretudo em relação ao grau de maturação de suas sementes (Fig. 2). Fixando o teor de água nas sementes e variando o grau de maturação, observando maiores atividades da  $\alpha$ -amilase em sementes maduras em relação àquelas imaturas (Fig. 2A); efeito contrário foi observado na atividade da isoforma de esterase, sementes imaturas apresentaram maior atividade (Fig. 2B). A redução da umidade nas sementes ocasionou a redução da atividade da  $\alpha$ -amilase, sendo o efeito mais drástico nas sementes imaturas com 12% b.u.; para esterase percebe-se uma ligeira redução da sua atividade com a redução do teor de água somente em sementes maduras, naquelas imaturas a redução de água parece não influenciar sua atividade.

A enzima  $\alpha$ -amilase é essencial na hidrólise do amido, e sua síntese também ocorre em resposta à dessecação das sementes de cereais (Rosa et al., 2004). Para sementes de milho colhidas em diferentes estádios de maturação, a secagem no campo e

a artificial proporcionaram aumento na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase, favorecendo o processo de germinação das sementes (Faria et al., 2004).

Esterase é uma das enzimas importantes na caracterização de deterioração de sementes (Nakada et al., 2010) apresentando aumento de atividade durante esse processo fisiológico (Walters, 1998; McDonald, 1999). O padrão observado para esta enzima corrobora com os resultados fisiológicos e de vigor, já que a intensa atividade, em sementes imaturas, pode ser um indicativo de danos nas membranas das células, o que culmina na diminuição do poder germinativo e avanço do processo de deterioração. A enzima esterase atua em reações de hidrólises de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, como os fosfolipídios totais de membrana (Santos et al., 2005). De acordo com Tunes et al. (2011), a expressão da enzima esterase em sementes de cevada foi pouco influenciada pela época de colheita. Ao trabalhar com sementes de pepino Ômega, tipo caipira, Nakada et al (2011) verificaram atividade para a esterase mais acentuada nos dois primeiros e no último estágio de desenvolvimento (30, 35 e 55 dias após a antese, respectivamente), para sementes secas e úmidas, e relacionaram esse resultado com a intensificação do processo de deterioração.

A atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase para as sementes maduras e imaturas com diferentes teores de água é demonstrada na Figura 3.



**Figura 3:** Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. em dois estágios de maturação e com diferentes teores de água. Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2012. Barra: Erro padrão da média.

A enzima endo- $\beta$ -mananase foi mais intensa em sementes maduras do que nas imaturas, com decréscimo em sua atividade em resposta à diminuição do teor de água das sementes para os dois estádios de maturação. Assim, é possível relacionar a atividade mais intensa da endo- $\beta$ -mananase com os resultados obtidos nos testes de germinação e de emergência de plântulas, em que os melhores valores foram verificados em sementes maduras e com altos teores de água. Para sementes de tomate o acréscimo na atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase coincidiu com o aumento no IVE das plântulas, justificando o fato que o aumento na sua atividade pode facilitar a protrusão radicular, já que esta é uma das principais enzimas de degradação de reservas em sementes (Albuquerque et al., 2010). Para sementes de pimenta da variedade Habanero Yellow (*Capsicum chinense* Jacquin) a atividade dessa enzima, que é chave na germinação de sementes de pimenta, foi maior nas épocas mais avançadas de desenvolvimento, quando as sementes haviam atingido a maturidade fisiológica e apresentavam o completo desenvolvimento dos mecanismos enzimáticos envolvidos na germinação (Queiroz et al., 2011). Além disso, Nascimento e Cantliffe (2001) verificaram que em sementes de alface a atividade enzimática de endo- $\beta$ -mananase foi maior uma hora antes da protrusão radicular e em sementes dos genótipos termo tolerantes, quando comparados com o termo sensíveis.

Não foram detectadas cadeias polipeptídicas para proteínas resistentes ao calor pela análise eletroforética dos extratos obtidos para essa finalidade. Por ser uma metodologia bem estabelecida em outros sistemas biológicos, acredita-se que a ausência de bandas não seja um artefato da técnica. Assim, a secagem não induziu mudanças no padrão de polipeptídeos resistentes ao calor na espécie analisada. Várias sementes recalcitrantes não produzem proteínas do tipo *LEA* e, neste caso, a presença de açúcares solúveis pode minimizar os efeitos da secagem. A falta de produção de proteínas *LEA* é uma das principais diferenças entre as sementes tolerantes e as não tolerantes à dessecação (Marcos-Filho, 2005). As *LEA* proteínas geralmente são capazes de proteger outras proteínas ou membranas, de modo semelhante aos açúcares, agindo como moléculas de reposição de água (Goyal et al., 2005). Outra possibilidade é que estas proteínas têm funções diferentes em diferentes graus de umidade e ainda podem ter propriedades antioxidantes que minimizem os efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Mowla et al., 2006). Tendo em vista a relação existente entre as funções destas proteínas e a aquisição de tolerância a dessecação, acredita-se que a

ausência de tais proteínas seja o sinal de intolerância a dessecação em sementes de *P. ramiflora*.

## CONCLUSÕES

A qualidade fisiológica e o vigor das sementes de *P. ramiflora* são afetados pelo estágio de maturação e pela secagem. Sementes maduras tiveram melhor desempenho fisiológico e maior tolerância à dessecação em comparação as imaturas.

Sementes de *P. ramiflora* apresentaram apenas isoformas de  $\alpha$ -amilase e esterase; a primeira enzima apresentou maior atividade em sementes maduras e foi sensível à dessecação não sendo detectada em sementes com 12% b.u.; diferentemente, a isoforma de esterase foi bem mais ativa em sementes imaturas com pouca ou nenhuma redução da atividade pela redução do teor de água. Isoformas de catalase e peroxidase não foram detectadas nas condições avaliadas, bem como cadeias polipeptídicas de proteínas resistentes ao calor não foram observadas.

Sementes de *P. ramiflora* apresentam características de intolerantes a dessecação, sendo esta intolerância maximizada antes das sementes atingirem a maturidade fisiológica.

## REFERÊNCIAS

- Albuquerque KAD, Oliveira JA; Silva PA, Veiga AD, Carvalho BO, Alvim PO (2010). Armazenamento e qualidade de sementes de tomate enriquecidas com micronutrientes e reguladores de crescimento. *Cienc. Agrotec.* 34(1):20-28.
- Alfenas AC (1998). Eletroforese de izoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 574 p.
- Alfenas AC, Petres I, Bruce W, Passados GC (1991). Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: UFV, 242p.
- Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF (1998). Cerrado: espécies vegetais úteis. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.
- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A (2010). Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant. Sci.* 15:211-218.
- Bailly C (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14: 93-107.

Barbedo CJ, Marcos-Filho J (1998). Tolerância à dessecação de sementes. *Acta Bot. Bras.* 12:145-164.

Borges IF, Barbedo CJ, Richter AA, Figueiredo-Ribeiro RCL (2006). Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae). *Braz. J. Plant Physiol.* 18:475-482.

Brandao Junior DS, Vieira MGGC, Guimaraes RM, Hillhorst HWM (2002). Tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Rev. Bras. sementes.* 24(2):17-23.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009). Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS. p.399

Crispim JE, Martins JC, Pires JC, Rosolem CA, Cavariani C (1994). Determinação da taxa de respiração em sementes de soja pelo método da titulação. *Pesq. Agropec. Bras.* 29(10):1517-1521.

Dalponte JC, Lima ES (1999). Disponibilidade de frutos e a dieta de *Lycalopex vetulus* (Carnivora - Canidae) em um cerrado de Mato Grosso, Brasil. *Rev. Bras. Bot.* 22(2):325-332.

Dell'aquila A (2007). Pepper seed germination assessed by combined X-radiography and computer-aided imaging analysis. *Biol. Plant.* 51(4):777-781.

Downie B, Hillhorst HWM, Bewley JD (1994). A new assay for quantifying endo- $\beta$ -mannanase activity using Congo Red dye. *Phytochemistry.* 36:829-835.

Ellis RH, Hong TD, Roberts EH (1990). An intermediate category of seed storage behaviour. *J. Exp. Bot.* 41(230):1167-1174.

Fait A, Angelovici R, Less H, Ohad I, Urbanczyk-Wochniak, E, Fernie AR, Galili G (2006). *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiol.* 142(3):839-854.

Faria MAVR, Pinho RGV, Pinho EVRV, Guimarães RM, Freitas FEO (2004). Germinabilidade e tolerância à dessecação em sementes de milho colhidas em diferentes estádios de maturação. *RBMS.* 3(2):276-289.

- Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P, Walters C (1997). Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* 7(2):135-144.
- Gaff DF, Oliver M (2013). The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. *Funct. Plant Biol.*
- Gama LU, Barbosa AAA, Oliveira PEAM (2011). Sistema sexual e biologia floral de *Pouteria ramiflora* e *P. torta* (Sapotaceae). *Rev. Bras. Bot.* 34(3):375-387.
- Goodman RC, Jacobs DF, Karrfalt RP (2005). Evaluating desiccation sensitivity of *Quercus rubra* acorns using X-ray image analysis. *Can J Forest Res.* 35:2823-2831.
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.* 388:151-157.
- Guimarães RM, Vieira MGGC, Fraga AC, Pinho EVRV, Ferraz VP (2002). Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Cienc. Agrotec.* 26(1):128-139.
- Hellmann ME, Mello JIO, Barbedo CJ, Figueiredo-Ribeiro RCL (2008). Variações dos carboidratos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) armazenadas sob diferentes temperaturas. *Hoehnea*, 35(2):255-264.
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink, J (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant. Sci.* 6(9):431-438.
- Hong TD, Gedebo A, Ellis RH (2000). Accumulation of sugars during the onset and development of desiccation tolerance in immature seeds of Norway maple (*Acer platanoides* L.) stored moist. *Seed Sci. Res.* 10:147-152.
- Illing N., Denby JK, Collett H, Shen A, Farrant JM (2005). The Signature of Seeds in Resurrection Plants: A Molecular and Physiological Comparison of Desiccation Tolerance in Seeds and Vegetative Tissues. *Integr. Comp. Biol.* 45:771-787.
- Jiang L, Kermode A.R (1994). Role of desiccation in the termination of expression of genes for storage proteins. *Seed Science Research.* 4(2):149-173.
- Lorenzi H (1992). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Editora Plantarum, Nova Odessa.

- Maguire JD (1962). Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2:176-177.
- Manfre AJ, Lahatte GA, Climer CR, Marcotte Jr WR (2009). Seed Dehydration and the Establishment of Desiccation Tolerance During Seed Maturation is Altered in the *Arabidopsis thaliana* Mutant *atem6-1*. *Plant Cell Physiol.* 50(2):243-253.
- Marcos-Filho J (2005). Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq. p. 495.
- McDonald MB (1999). Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. *Seed Sci. Technol.* 27(1):177-237.
- Miller GL (1959). Use dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31(2):426-428.
- Mowla SB, Cuypers A, Driscoll SP, Kiddle G, Thomson J, Foyer CH, Theodoulou FL (2006). Yeast complementation reveals a role for an *Arabidopsis thaliana* late embryogenesis abundant (LEA)-like protein in oxidative stress tolerance. *Plant J.* 48:743-756.
- Nakada PG, Oliveira JA, Melo LC, Gomes LAA, Pinho EVRV (2011). Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. *Rev. Bras. sementes.* 33(1):113-122.
- Nakada PG, Oliveira JA, Melo LC, Silva AA, Silva PA, Perina FJ (2010). Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. *Rev. Bras. sementes.* 32(3):042-051.
- Nambara E, Okamoto M, Tatematsu K, Yano R, Seo M, Kamiya Y (2010). Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Sci. Res.* 20(2):55-67.
- Nascimento WM, Cantliffe EDJ (2001). Composição química do endosperma, atividade enzimática e sua associação com a germinação das sementes de alface em altas temperaturas. *Rev. Bras. sementes.* 23(2):121-126.
- Nkang A, Omokaro D, Egbe A (2000). Effects of desiccation on the lipid peroxidation and activities of peroxidase and polyphenoloxidase in seeds of *Telfairia occidentalis*. *Seed Sci. Technol.* 28:1-9.

- Pammenter NW, Berjak P, Farrant JM, Smith MT, Ross G (1994). Why do stored, hydrated recalcitrant seeds die. *Seed Sci. Res.* 4(2):187-191.
- Queiroz LAF, Pinho EVRV, Oliveira JA, Ferreira VF, Carvalho BO, Bueno ACR (2011). Época de colheita e secagem na qualidade de sementes de pimenta Habanero Yellow. *Rev. Bras. sementes.* 33(3):472-481.
- Ramanjulu S, Bartels D (2002). Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ.* 25(2):141-151.
- Roberts EH (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. Technol.* 1(3):499-514.
- Rosa SDVF, Pinho EVRV, Vieira MGGC, Veiga RD (2004). Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento a baixa temperatura. *RBMS.* 3(2):290-310.
- Santos CMR, Menezes NL, Villela FA (2005). Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. *Rev. Bras. sementes.* 27:104-114.
- Tanksley SD, Orton TJ (1983). *Isozymes: developments in plant genetic and breeding. Parte A (IA).* New Yoek: Elsevier, 516p
- Tunes LM, Badinelli PG, Barros ACSA, Meneghello GE, Amarante L (2011). Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada. *Rev. Ceres.* 58(2):178-184.
- Tweddle JC, Dickie JB, Baskin CC, Baskin JM (2003). Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J. Ecol.* 91(2):294-304.
- Van Handel E (1968). Direct microdetermination of sucrose. *Anal Biochem.* 22(2):280-283.
- Vidigal DS, Dias DCFS, Pinho EVRV, Dias LAS (2009). Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). *Rev. Bras. sementes.* 31(2):129-136.
- Walters C 9 (1998). Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci. Res.* 8(2):223-244.

Walters C, Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P (2002). Desiccation and Damage. In: Black M, Pritchard HW. (eds.) Desiccation and survival in plants. Drying without dying. pp. 263-291.

Wang WQ, Cheng HY, Moller IM, Song SQ (2012). The role of recovery of mitochondrial structure and function in desiccation tolerance of pea seeds. *Physiol. Plant.* 144:20-34.

Yemm EW, Willis AJ (1954). The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57(4):508-514.

## CAPÍTULO 3

### **Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de cafezinho-do-cerrado, *Rhamnidium elaeocarpum* Rissek (Rhamnaceae)**

Morphological characterization of fruits, seeds, and seedlings of *Rhamnidium elaeocarpum* Rissek (Rhamnaceae)

(Artigo conforme as normas da Revista SEMINA – Ciências Agrárias)

**Resumo:** O *Rhamnidium elaeocarpum* Rissek é a espécie utilizada para reduzir o prurido das gengivas de crianças no início da dentição, além de apresentar quantidades satisfatórias de substâncias responsáveis por atividade antiúlcera. No presente trabalho, teve-se como objetivo descrever aspectos anatômicos da semente e aspectos externos e internos do fruto, da semente, e das fases de desenvolvimento de plântulas de *R. elaeocarpum* Rissek. Os frutos foram coletados na Fazenda Padre Galileu, no município de Jaupaci - GO, e o beneficiamento consistiu da maceração em peneira, separando as sementes dos resíduos. Para a descrição dos frutos foram observados detalhes externos do pericarpo e para as sementes foram analisadas as estruturas externas do tegumento e internas do endosperma e eixo embrionário. Morfológicamente, o fruto é simples, carnoso e indeiscente, monospermico. As sementes apresentam hilo basal e micrópila apical, com cristais retangulares de oxalato de cálcio e células taníferas na camada mais externa da semente, além de ductos oleíferos no endosperma. A germinação é hipógea criptocotiledonar e por volta do 15º dia após a semeadura a plântula está completamente formada. Os aspectos descritos e ilustrados se mostraram bastante homogêneos e confiáveis para identificação da espécie em campo ou em estudos de regeneração natural.

**Palavras-chave:** aspectos morfológicos, germinação, desenvolvimento pós-seminal.

**Abstract:** *Rhamnidium elaeocarpum* Rissek is a species found in forests, especially in riparian forests. This medicinal species is commonly used to reduce itching of the gums in children at the onset of teething and contains several substances responsible for antiulcer activity. The aim of the present study was to describe the external and internal anatomical features of the seed, fruit, and developmental stages of seedlings of *R. elaeocarpum* Rissek. The fruits were collected at the Padre Galileu Farm in the

municipality of Jaupaci, GO, Brazil. The processing consisted of maceration in sieves to separate the seeds from the waste. To describe the fruits, external details of the pericarp were observed. For the seeds, the external structures of the integument and internal structures of the endosperm and embryonic axis were analyzed. Morphologically, the fruit is simple, fleshy, indehiscent, and monospermic. The seeds have a basal hilum and an apical micropyle, with rectangular calcium oxalate crystals and tannin cells in the outermost layer of the seed and oil ducts in the endosperm. The germination is hypogeal cryptocotylar, and the seedling is completely formed around the 15<sup>th</sup> day after sowing.

**Key words:** Morphological features, germination, post-seminal development.

## **Introdução**

As informações fornecidas por estudos do desenvolvimento pós-seminal apresentam grande importância sob o ponto de vista taxonômico, auxiliando a identificação das estruturas essenciais da plântula, contribuindo para a compreensão do ciclo de vida e crescimento de espécies florestais e na interpretação dos testes de germinação (MOURÃO et al., 2002; OLIVEIRA, 1993). Além disso, podem oferecer informações importantes sobre o desenvolvimento da espécie, servindo como subsídio para a produção de mudas e permitindo a melhor compreensão do processo de estabelecimento da planta em condições naturais da floresta (GUERRA et al., 2006). Estudos relacionados à morfoanatomia de frutos e sementes de espécies florestais são relevantes para a compreensão de vários fenômenos ligados ao comportamento dessas espécies (GARCIA et al., 2006).

Tanto as características externas quanto as internas das sementes são pouco modificadas pelo ambiente, constituindo assim, caracteres confiáveis para identificação (GUNN, 1981). Apesar de serem formadas basicamente por embrião, tecidos de reserva e envoltório, na natureza, diversos fatores contribuem para que haja desenvolvimento diferenciado dos componentes da semente, variando entre espécies e até dentro da própria espécie, através da cor, forma e tamanho (ABUD et al., 2010). Assim, a necessidade de estudos visando descrever aspectos biométricos de frutos e sementes e morfológicos de plântulas e plantas jovens vem sendo destacada, porém, os dados disponíveis ainda são escassos uma vez que nem sempre se encontra material botânico identificado disponível (CUNHA; FERREIRA, 2003; AMARO et al., 2006).

*Rhamnidium elaeocarpum* Reissek, conhecido popularmente como cafezinho ou cafezinho-do-Cerrado, é uma espécie sul-americana com ampla distribuição no Brasil, ocorrendo em quase todos os estados, sendo encontrada em matas, sobretudo matas ciliares (LIMA, 2011). As folhas e cascas são utilizadas popularmente no Brasil para reduzir o prurido das gengivas de crianças no início da dentição e para dores estomacais. As folhas são opostas cruzadas simples, hipoestomáticas, apresentando tricomas tectores sobre as nervuras. As cascas das raízes possuem cicatrizes ou fendas na face externa e fratura fibrosa na face interna. O extrato metanólico das folhas apresenta quantidades satisfatórias de flavonoides, alcaloides, saponinas e taninos. Esses dados sugerem que a presença dessa classe de substâncias pode ser responsável pela atividade antiúlcera apresentada por esse extrato, já que esse tipo de composto apresenta boa atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2010).

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre as espécies da flora lenhosa do cerrado, este trabalho objetivou descrever aspectos anatômicos da semente e ilustrar os aspectos externos e internos do fruto e da semente, bem como as fases de desenvolvimento das plântulas de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek.

## **Material e métodos**

**Coleta e beneficiamento:** Os frutos foram coletados na Fazenda Padre Galileu, no município de Jaupaci, GO, em dezembro de 2011. Foram escolhidas cinco matrizes, distantes no mínimo 100 m entre si, levando em consideração a coloração dos frutos para a identificação do ponto de maturação. Após a coleta, os frutos foram encaminhados ao Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram realizados os ensaios. Os estudos, referente à parte anatômica da semente, foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do IFGoiano-Campus Rio Verde, GO. O beneficiamento consistiu da maceração dos frutos maduros em peneira (5 mm), sob água corrente, visando separar as sementes dos resíduos. As sementes foram submetidas a secagem em temperatura ambiente sobre papel toalha, até que o excesso de água fosse eliminado, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em câmara fria (temperatura de 10°C e 40 a 50% de umidade relativa) até o momento da realização dos ensaios. O grau de umidade das sementes foi determinado pelo método da estufa a  $105\pm 3^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (BRASIL,

2009), com quatro subamostras de 10 sementes. Os resultados foram calculados com base no peso das sementes úmidas e expressos em porcentagem.

**Aspectos morfológicos de frutos:** No estudo morfológico de frutos, foram considerados os seguintes aspectos: tipo, coloração, dimensões, textura e consistência do pericarpo, deiscência e número de sementes por fruto. Determinou-se o comprimento e a largura média, máxima e mínima de 50 frutos, escolhidos aleatoriamente da amostra de trabalho, com paquímetro digital Digimed de precisão de 0,01mm.

**Aspectos morfológicos das sementes:** Em uma amostra de 100 sementes, escolhidas aleatoriamente, foram medidos comprimento, largura e espessura, com paquímetro digital de precisão de 0,01 mm. Considerou-se como comprimento a porção compreendida entre a extremidade basal e a apical da semente. A largura e a espessura foram medidas na parte intermediária da semente. Para cada uma das variáveis estudadas, calculou-se a média aritmética, o desvio padrão e o coeficiente de variação. Para as sementes, os aspectos externos observados e descritos foram: coloração, textura e consistência do tegumento, forma e bordo das sementes; posição do hilo, da micrópila e outras estruturas presentes. As características internas foram: presença ou ausência de endosperma, posição e forma do eixo embrionário; textura, cor e forma dos cotilédones. Para facilitar o estudo da morfologia interna, as sementes foram hidratadas e submetidas a cortes transversais e longitudinais feitos com lâminas de aço, sendo então observadas em maiores detalhes, com auxílio de lupa de mesa e microscópio estereoscópio. As faces internas e externas foram documentadas com o auxílio de máquina fotográfica. A terminologia empregada foi a mesma descrita por Damiano-Filho (1993). Como ferramenta auxiliar nos estudos morfológicos das sementes, foram obtidas imagens das estruturas internas por meio de aparelho de raios X. As sementes foram dispostas em placas de acrílico transparente sobre fita adesiva de dupla face e submetidas à radiação em equipamento de raios X "Faxitron HP", modelo 43855A, na intensidade de 30Kv por 45 segundos, obtendo imagens digitais das estruturas internas das sementes.

**Caracterização anatômica das sementes:** A avaliação anatômica da semente madura foi feita através de secções transversais. Para a preparação dos cortes anatômicos, o material foi previamente fixado em FAA, desidratado progressivamente pelas misturas de etanol-butanol, e incluído em historesina a 58°C. Os cortes histológicos (15 µm) foram confeccionados em micrótomo, posteriormente corados em Azul de Toluidina 0,05% - coloração policromática (O'BRIEN et al., 1964) e montadas em lâminas permanentes com historesina sintética. Os resultados foram ilustrados por

meio de fotomicrografias obtidas em fotomicroscópio Leica DM500, acrescentando escalas nas condições ópticas adequadas. A anatomia das sementes foi descrita segundo Apezzatto-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2006). Alguns cortes foram preparados para a realização de testes histoquímicos visando à detecção de algumas substâncias. Para verificar a presença de compostos fenólicos (taninos), utilizou-se Vanilina clorídrica e para a localização de substâncias lipídicas (óleo vegetal), utilizou-se Sudan IV .

**Germinação:** As sementes foram colocadas para germinar em substrato rolo de papel, umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do substrato seco, e deixadas em câmara de germinação a temperatura de 25°C, na ausência de luz. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada. O acompanhamento da germinação foi realizado durante 10 dias, sendo avaliado diariamente. Considerou-se germinação o período compreendido entre o intumescimento da semente ao alongamento do hipocótilo, antes que o primeiro protófilo estivesse completamente formado. Analisou-se o tipo de germinação, forma, cor, consistência da raiz e epicótilo. As estruturas básicas de cada etapa do processo germinativo foram medidas com o auxílio de régua graduada em centímetros (cm) e documentadas com máquina fotográfica. O método e a terminologia empregados foram de acordo com Vidal e Vidal, 2003.

**Aspectos morfológicos das plântulas:** Para o acompanhamento do desenvolvimento de plântulas, foram semeadas 200 sementes em bandejas plásticas de 40x30x8 cm, contendo como substrato a mistura de terra de subsolo e areia na proporção de 3:1. A semeadura foi realizada a 3 cm de profundidade e o substrato foi umedecido até 70 % de sua capacidade de campo, sendo irrigado sempre que necessário. As bandejas foram mantidas em câmara crescimento à temperatura de 25°C e fotoperíodo (oito horas de luz e 16 horas de escuro) durante 30 dias. Considerou-se como plântula a fase do desenvolvimento em que se apresentava com raízes primária e secundárias bem desenvolvidas, hipocótilo, epicótilo e protófilos de primeira ordem.

## **Resultados e discussão**

**Aspectos morfológicos de frutos:** Os frutos apresentaram comprimento médio de 11,06 (variando de 9,42 a 12,35 mm) e largura média de 8,97 (variando de 4,43 a 10,77 mm), conforme Tabela 1.

**Tabela 1.** Comprimento, largura e espessura de frutos de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek.

Dimensões (mm)	Média	Máximo	Mínimo	Desvio Padrão	CV (%)
<b>Comprimento</b>	11,06	12,35	9,42	0,61	5,50
<b>Largura</b>	8,97	10,77	4,43	0,91	10,14

O fruto é simples, carnososo, indeiscente, com epicarpo de coloração roxa quando maduro, do tipo drupa, com superfície lisa e brilhante, ápice e base agudos (Figura 1 – A a G), e contendo apenas uma semente por fruto.



**Figura 1.** Frutos de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek. A – Ramos com frutos verdes e maduros; B – Infrutescência com frutos maduros; C – Frutos em diferentes estádios de maturação; D; E; F – Frutos maduros; G – Fruto/corte longitudinal. (en – endocarpo; ep – epicarpo; me – mesocarpo; s – semente).

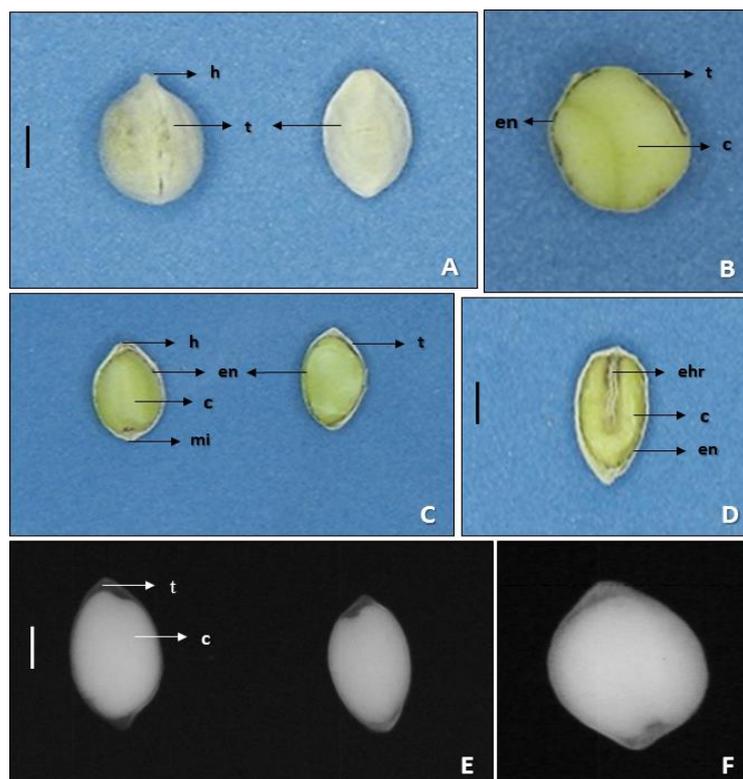
**Aspectos morfológicos das sementes:** As sementes apresentaram umidade inicial de 37% b.u., comprimento médio de 7,67 (variando de 6,45 a 9,55 mm), largura média de 4,34 (variando de 3,49 a 5,03 mm) e espessura média de 3,49 (variando de 2,88 a 4,84 mm) conforme Tabela 2.

**Tabela 2.** Comprimento, largura e espessura de sementes de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek.

<b>Dimensões (mm)</b>	<b>Média</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Comprimento</b>	7,67	9,55	6,45	0,60	7,88
<b>Largura</b>	4,34	5,03	3,49	0,29	6,93
<b>Espessura</b>	3,49	4,84	2,88	0,33	9,41

O tamanho das sementes pode estar relacionado à quantidade de reservas, influenciando assim o vigor das plântulas (CAVALHO; NAKAGAWA, 2000). As diferenças morfológicas podem afetar o valor adaptativo das árvores matrizes e do processo de regeneração da população. Contudo, a variação entre indivíduos, numa mesma população, possibilita a seleção e melhoria de um dado caractere, constituindo numa das mais importantes fontes de variabilidade disponíveis, também auxiliando no estudo da dispersão e agentes dispersores (SANTOS et al., 2009).

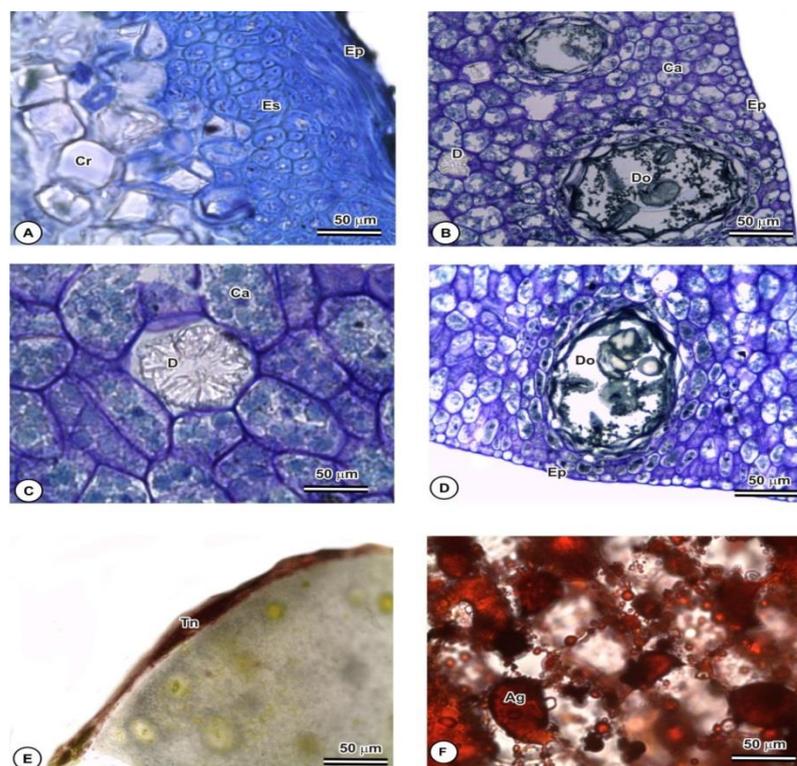
A semente tem formato elíptico, ápice e base afinada, tegumento espesso, de coloração creme e superfície rugosa, o hilo é basal e pouco conspícuo e a micrópila situada no ápice da semente (Figura 2 – A a C). Os cotilédones são membranáceos de coloração verde clara ocupando a maior parte da estrutura interna da semente, com eixo hipocótilo radicular espesso, de coloração amarelada (Figura 2 – D a F). Segundo Lima (2006) os representantes da família Rhamnaceae apresentam sementes geralmente elipsoides, obovadas ou oblongas, castanhas, com embrião basal, reto; cotilédones planos, membranáceos, elipsoides ou oblongos .



**Figura 2.** Sementes de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek; A – Sementes inteiras; B – Semente/Corte transversal; C; D – Semente/Corte longitudinal; E; F – imagens radiográficas das sementes. (c – cotilédone; ehr – eixo hipocótilo radicular; en – endosperma; h – hilo; mi – micrópila; t – tegumento). Barra 1,0 cm.

**Caracterização anatômica da semente:** O tegumento é delgado, constituído por várias camadas de células (Figura 3 – A). Apresenta epiderme com células finas e alongadas formando o tégmen. Abaixo da epiderme e observa-se o esclerênquima, que pode ser dividido em dois estratos, sendo o primeiro composto por esclereídes alongadas e o segundo por esclereídes arredondadas. Os dois estratos de esclereídes formam o esclerênquima, que atua conferindo rigidez aos envoltórios da semente. Após o esclerênquima, encontram-se cristais retangulares de oxalato de cálcio. Pelo teste histoquímico com vanilina clorídrica, detectou-se a presença de células taníferas na camada mais externa da semente, podendo estar relacionada à proteção contra ataque de predadores ou microrganismos, ou ainda ao aumento da rigidez do tegumento (Figura 3 – E). Aguiar e Mendonça (2003) encontraram o mesmo padrão de tegumento para as sementes de *Euterpe precatoria* Mart. (Palmae), com três estratos distintos e presença de células com conteúdo celular tanífero no estrato externo.

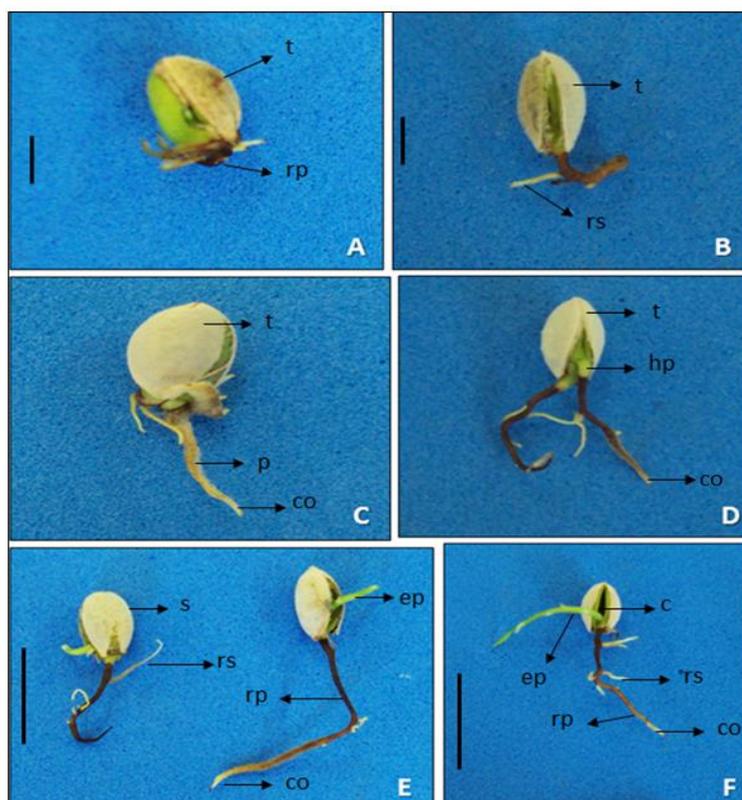
O endosperma possui epiderme unisseriada e no estrato interno encontram células com grande quantidade de grãos de amido, cristais de oxalato de cálcio, agrupados formando drusas, além de ductos oleíferos dispostos em todos os pontos do endosperma (Figura 3 – B a D). De acordo com Felippi et al. (2010) a função dos cristais de oxalato de Cálcio no embrião ainda permanece desconhecida. No entanto, divergências entre os resultados de vários trabalhos sugerem que o controle da cristalização seja influenciado por fatores externos (concentração de cálcio no solo, por exemplo). Lacchia e Carmello-Guerreiro (2009) observaram que células epiteliais do fruto de *Anacardium humile* (Anacardiaceae) também apresentavam plastídios, em grande quantidade, de forma arredondada com sistema de membranas circular, estando envolvidos na síntese de substâncias lipofílicas. Não foi detectada a presença de células taníferas pelo teste com vanilina clorídrica, porém o teste com Sudan IV evidenciou a presença de células ricas em conteúdo lipídico no endosperma (Figura 3 – F). Silva e Paoli (2006) também registraram a presença de reserva proteica e conteúdo lipídico no endosperma das sementes de *Dictyoloma vandellianum* pelo teste com Sudan IV.



**Figura 3.** Cortes transversais em semente de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek. A – visão geral do tegumento; B – visão geral do endosperma; C – endosperma com células amiláceas e destaque para célula com drusas; D – endosperma com destaque dos ductos oleíferos; E – conteúdo tanífero no tegumento; F – células ricas em material lipídico.

(Ag – ácidos graxos; Ca – células com conteúdo amilífero; Cr – Cristais retangulares; D – drusas; Do – ductos oleíferos; Ep – epiderme; Es – Esclerênquima; Tn - conteúdo tanífero no tegumento).

**Aspectos morfológicos da germinação:** A germinação é do tipo hipógea criptocotiledonar e unipolar, evidenciada pelos caracteres bastante homogêneos entre as plântulas selecionadas, com a semente mantendo os cotilédones envolvidos pelo tegumento seminal durante todo o desenvolvimento das plântulas. As fases do desenvolvimento da plântula podem ser visualizadas na Figura 4. Inicialmente há hidratação da semente, que intumescce, aumentando seu volume; posteriormente, entre o 2º e 3º dia foi evidenciada a protrusão radicular (Figura 4 - A). A raiz primária cilíndrica apresenta coloração esbranquiçada inicialmente, tornando-se escura ao longo do desenvolvimento (Figura 4 – B; C e D). Uma leve dilatação da extremidade apical da radícula marca o início da coifa, que é cilíndrica, alongada e terminando em ponta aguda (Figura 4 – D a F), de coloração amarelada. O processo germinativo é rápido e uniforme, alcançando 95% de germinação aos quatro dias após a semeadura.



**Figura 4.** Aspectos da germinação de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek; A - intumescimento da semente e protrusão radicular; B; C; D - Alongamento da raiz primária e desenvolvimento de raízes secundárias; E - Aparecimento do epicótilo; F - Expansão do epicótilo. (c - cotilédone; co - coifa; ep - epicótilo; hp - hipocótilo; p - pelos absorventes; rp - raiz primária; rs - raiz secundária; s - semente; t - tegumento;). Barra: 1,0 cm para A e B; 2,0 cm para E e F.

**Aspectos morfológicos das plântulas:** Entre o 6º e 8º dia após a germinação, visualiza-se o primeiro protófilo (Figura 5 - A a C). Por volta do 15º dia após a semeadura a plântula está completamente formada, com raiz pivotante de 4 a 6 cm de comprimento, coifa bem definida de coloração amarelada e raízes secundárias finas. As raízes apresentam pelos simples, translúcidos, somente perceptíveis quando visto no microscópio estereoscópico (Figura 5 - D e E). Apresenta hipocótilo curto de coloração esverdeada e epicótilo de formato cilíndrico e coloração verde clara brilhante, com comprimento médio de 3,5 cm (Figura 5 - A a E). Os protófilos são simples, opostos, peciolados, de forma elíptica e nervação peninérvea (Figura 5 - F). As plântulas possuem rápido desenvolvimento do epicótilo e acelerado processo de formação e expansão de novas folhas. A espécie apresenta poliembrionia, em alguns casos desenvolvendo mais de uma plântula por semente (Figura 5 - B).



**Figura 5.** Desenvolvimento de plântulas de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek; A – Aparecimento dos protofilos de 1ª ordem; B a D - Desenvolvimento de raízes secundárias e terciárias; E – Expansão dos protofilos; F – Planta jovem completamente formada. (ca – caule; cj - caule jovem; ep – epicótilo; f – folha; hp – hipocótilo; pro – protofilo; ps – plântula secundária; rp – raiz primária; rs – raiz secundária; rt – raiz terciária). Barra: 3,0 cm para A; 5,0 cm para E e F.

Não foram encontrados estudos envolvendo a caracterização e ilustração morfológica do processo germinativo até a fase de plântula para a espécie em questão. Assim, os resultados aqui encontrados poderão auxiliar trabalhos laboratoriais e a campo, como identificação da germinação em análise de sementes e identificação da espécie em campo, bem como sua inserção em projetos de recuperação de áreas degradadas.

## Conclusões

Os aspectos morfológicos da semente, germinação e plântulas de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek são bastante homogêneos em todas as fases, sendo importantes para estudos taxonômicos.

O fruto é simples do tipo drupa, carnoso, indeiscente e monospermico; semente de coloração creme, tegumento fino e rugoso com presença de conteúdo tanífero e endosperma rico em amido, cristais de oxalato de Cálcio e conteúdo lipídico; a germinação é hipógea e a plântula criptocotiledonar.

### Referências

- ABUD, H.F. ; GONCALVES, N.R. ; REIS, R.G.E. ; GALLÃO, M.I. ; INNECCO, R. Morfologia de sementes e plântulas de cártamos. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, p. 259-265, 2010.
- AGUIAR, M.O.; MENDONCA, M.S. Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatoria* Mart. (Palmae). *Revista Brasileira de Sementes*, vol.25, n.1, p. 37-42. 2003.
- AMARO, M.S.; FILHO, S.M.; GUIMARÃES; R.M.; TEÓFILO, E.M. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL.- (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, v.28, n.1, p.63-71, 2006.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. *Anatomia vegetal*. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 438p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4ª ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.
- CUNHA, M.C.L.; FERREIRA, R.A. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C. Smith – cumaru – Leguminosae- Papilionoideae. *Revista Brasileira de Sementes*, v.25, n.2, p.89-96, 2003.
- DAMIÃO-FILHO, C.F. *Morfologia vegetal*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993. 243p.
- FELIPPI, M.; GROSSI, F.; NOGUEIRA, A.C.; MOCO, M.C.C. Desenvolvimento da semente de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichl.) Engl. (Sapotaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, vol.32, n.1, p. 92-100. 2010.

- GARCIA, L.C.; NOGUEIRA, A.C.; ALQUINI, Y. Aspectos morfo-anatômicos de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotz. e *Podocarpus sellowii* Klotz. - Podocarpaceae. *Revista Brasileira de Sementes*. vol.28, n.3, pp. 129-134. 2006.
- GUERRA, M.E.C.; MEDEIROS FILHO, S.; GALLAO, M.I. Morfologia de sementes, de plântulas e da germinação de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae). *Cerne*, v, 12(4), p. 322-328, 2006.
- GUNN, C.R. Seed topography in the Fabaceae. *Seed Science & Technology*, v.9, n.3, p.737-757. 1981.
- LACCHIA, A.P.S.; GUERREIRO, S.M.C. Aspectos ultra-estruturais dos canais secretores em órgãos vegetativos e reprodutivos de Anacardiaceae. *Acta Botanica Brasílica*, vol.23, n.2, p. 376-388. 2009.
- LIMA, R.B. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rhamnaceae. *Rodriguésia*, 57 (2): 247-249. 2006.
- LIMA, R.B. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Rhamnaceae. *Bol. Bot. Univ. São Paulo*, v. 29, n. 1, p. 47-55, 2011.
- MOURÃO, K.S.M.; DIAS-PINTO, D.; SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S. Morfo-anatomia da plântula e do tirodendro de *Trichilia catiguá* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. e *T. pallida* Sw. (Meliaceae). *Acta Scientiarum*, v.24, n.2, p.601-610, 2002.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*. 59:368-373. 1964.
- OLIVEIRA, E.C. Morfologia e análise de plântulas florestais. In: AGUIAR; I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Ed.) *Sementes florestais tropicais*. Brasília: ABRATES, 1993. p.175-214. 1993.
- OLIVEIRA, T.B.; SOARES, R.L.; TRESVESOL, L.M.F.; BRANQUINHO, D.S.P.; BARA, M.T.F.; FIUZA, T.S.; REZENDE, M.H.; PAULA, J.R. Caracterização das Folhas e Cascas da *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek. *Lat. Am. J. Pharm*, v. 29 (4), p. 534-41, 2010.
- SANTOS, F.S.; PAULA, R.C.; SABONARO, D.Z.; VALADARES, J. Biometria e qualidade fisiológica de sementes de diferentes matrizes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex A. DC.) Standl. *Scientia Forestalis*, v.37, n.82, p.163-173, 2009.

SILVA, L.L.; PAOLI, A.A.S. Morfologia e anatomia da semente de *Dictyoloma vandellianum* Adr. Juss.(Rutaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, vol.28, n.3, p. 116-120. 2006.

VIDAL, W.N.; VIDAL, M.R.R. *Botânica organografia: quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos*. Viçosa: UFV, 2003. 124p.

## CAPÍTULO 4

### **Estudos morfo-anatômicos de sementes e morfológicos de frutos, sementes e plântulas de curriola [*Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. - Sapotaceae]**

Morpho-anatomical studies of seeds and morphological studies of the fruit, seeds and seedlings of curriola [*Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. - Sapotaceae]

(Artigo conforme as normas da Revista *Árvore*)

**RESUMO:** Os estudos de caracterização morfológica de frutos e diásporos de dispersão são de fundamental importância para a compreensão do ciclo de vida de espécies florestais e ainda para a identificação taxonômica de famílias, gêneros e até mesmo espécies. Assim, o presente trabalho teve como objetivo descrever aspectos anatômicos das sementes e caracterizar morfológicamente frutos, sementes e plântulas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae). Para a descrição dos frutos foram observados detalhes externos e internos do pericarpo, textura, consistência, cor, pilosidade, brilho, forma, deiscência e número de sementes por fruto. Para as sementes os aspectos descritos foram: dimensões, coloração, textura e consistência do tegumento, forma e bordo; posição do hilo, da micrópila, rafe, cotilédones, presença ou ausência de endosperma e eixo hipocótilo-radicular. A germinação foi considerada desde o intumescimento da semente até o alongamento do hipocótilo e do epicótilo, antes que o primeiro protófilo estivesse completamente formado, e a plântula foi considerada estabelecida quando os protófilos já estavam totalmente expandidos. O fruto é simples do tipo drupa, carnoso e monospermico. A semente é exalbuminosa de formato elipsoide, com tegumento brilhante, liso, embrião cotiledonar, reto, basal capitado. A germinação é do tipo hipógea e as plântulas são criptocotiledonares com hipocótilo curto, epicótilo alongado de coloração verde-claro, raiz principal bem desenvolvida e protófilos simples, de coloração verde escura. Anatomicamente o tegumento da semente é tri estratificado com presença de esclereides de paredes lignificadas, o endosperma é amiláceo com células taníferas e células com conteúdo lipídico. Os resultados obtidos servem como base para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes e avaliação de plântulas em testes de germinação, sendo importantes em laboratório ou em viveiro de produção de mudas.

**Palavras-chave:** Espécie florestal, morfoanatomia, germinação, plântula.

**ABSTRACT:** Studies of morphological fruit and dispersion diaspores are of fundamental importance for understanding the life cycle of forest species and for the taxonomic identification of families, genera, and even species. Thus, this study aimed to describe the anatomical aspects of the seeds and to morphologically characterize the fruit, seeds and seedlings of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae). For the description of the fruits were observed internal and external details of the pericarp, texture, consistency, color, hairiness, brightness, shape, dehiscence and seed number per fruit. For seeds the aspects described were: size, color, texture and consistency of the integument, and form board, position the heel, the micropyle, raphe, cotyledons, presence or absence of endosperm and hypocotyl-root. Germination was considered from the swelling of the seed to the elongation of the hypocotyl and epicotyl, before the first protophylus was fully formed, and the seedlings were considered when protophylus were expanded. The fruit is a simple, drupe, monospermic berry. The seeds have ellipsoid forms, with a shining, smooth integument, a cotyledonary embryo and a straight and axial shape. Their germination is hypogeal, and the seedlings are cryptocotylar, presenting a short hypocotyl, an elongated epicotyl that is bright green in color, a well-developed primary root and a simple protophylus with dark green coloration. Anatomically, the seed has a triply stratified integument with lignified sclereids. The endosperm is amylaceous, with tanniferous cells and lipid-containing cells. Our results serve as a basis for the evaluation of seeds physiological quality of seeds and the evaluation of seedlings in germination tests, which are important processes in seed laboratories or seedling production nurseries.

**Key words:** Forest species, morpho-anatomy, germination, seedling.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Sapotaceae é pertencente à Ordem Ericales e apresenta cerca de 53 gêneros e 1.100 espécies (APG III, 2009). As espécies são geralmente de hábito arbóreo e arbustivo, com ampla distribuição nas áreas tropicais e subtropicais do mundo (SOUZA e LORENZI, 2005). Apresentam considerável importância econômica, com espécies utilizadas na extração de madeira, produção de frutos comestíveis, produção de látex, na medicina popular e como ornamentais (MONTEIRO, 2007). O gênero *Pouteria* Aublet é o maior da família Sapotaceae tendo o Brasil expressiva representatividade nas 188 espécies representadas na região Neotropical. No entanto,

são necessárias investigações adicionais para melhor compreender sua taxonomia (PENNINGTON, 1990).

A espécie *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., popularmente conhecida como curriola, abú-do-cerrado, bacupari liso, fruta-de-veado, grão-de-galo, massaranduba, gunjara, mandapuca e pitomba-de-leite, é uma espécie frutífera, de hábito arbustivo-arbóreo, amplamente distribuída em áreas de Cerrado. Os frutos apresentam cheiro forte e sabor agradável, de coloração esverdeada e polpa branca, sendo apreciada pelas populações locais na forma de suco ou *in natura* (DALPONTE e LIMA, 1999; ALMEIDA et al., 1998). Possui flores pequenas hermafroditas ou pistiladas e arranjadas em inflorescências racemosas com eixo curto, dispostas densamente nas axilas das folhas, ao longo dos ramos. Apresenta caducifólia, ocorrendo de agosto a setembro, com indivíduos que produzem maior quantidade de frutos perdendo todas as folhas durante a maturação dos mesmos. A floração ocorre de maio a setembro, com pico de flores abertas em agosto, em plena estação seca, e a maturação dos frutos ocorre no período chuvoso, favorecendo a dispersão das sementes (GAMA et al., 2011).

Estudos que visam o conhecimento da morfologia de frutos, sementes e plântulas de espécies nativas do Cerrado são ainda escassos na literatura referencial, tendo como exemplos os trabalhos de Ferreira et al. (1998) com *Dipteryx alata* Vogel (barú) e com *Terminalia argentea* Mart. & Zucc. (capitão-do-campo); Botelho et al. (2000) com *Hymenaea stigonocarpa* Mart.ex Hayne (jatobá-do-cerrado); Ferreira et al. (2001) com *Dimorphandra mollis* Benth. (faveira) e *Qualea grandiflora* Mart. (pau-terra) e Vuaden et al. (2005) com *Hyptis cana* POHL (hortelã-do-campo).

O conhecimento morfológico da plântula permite caracterizar famílias, gêneros e até mesmo espécies, e é aplicado no inventário florestal de muitas regiões de clima temperado e tropical (OLIVEIRA, 1993). Neste sentido, o acompanhamento do desenvolvimento da plântula permite a separação de espécies muito semelhantes em viveiro, e auxilia em estudos de regeneração (FERREIRA et al., 2001; CUNHA e FERREIRA, 2003). Estes estudos são também importantes para o reconhecimento das espécies em bancos de sementes no solo e para o desenvolvimento de estudos de recuperação de áreas degradadas, possibilitando a identificação imediata e segura no campo (ARAÚJO NETO et al., 2002; BARRETO e FERREIRA, 2011). Há preocupação da comunidade científica quanto aos estudos morfológicos e de propagação, no intuito de preservar a flora, principalmente as espécies que se encontram em via de extinção (AMARO et al., 2006).

O presente estudo teve por objetivo descrever os aspectos anatômicos da semente e morfológicos dos frutos, sementes e plântulas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. (Sapotaceae), para fins taxonômicos, contribuindo para o entendimento sobre a ecologia desta espécie.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

**2.1. Coleta e beneficiamento:** Os frutos foram coletados na Fazenda Gameleira, município de Montes Claros de Goiás (16° 06' 20'' S – 51° 17' 11'' W, altitude de 592 m), totalmente maduros e diretamente do chão, embaixo das árvores, sendo escolhidas dez matrizes, distantes no mínimo 100 m entre si. Após a coleta, o material foi encaminhado ao Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, onde foram realizados os ensaios. Os estudos, referentes à parte anatômica da semente, foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do IFGoiano-Campus Rio Verde GO. No beneficiamento, os frutos foram despolidos manualmente e as sementes foram lavadas em água destilada, de modo a separar as sementes dos resíduos. A assepsia das sementes foi feita utilizando solução de hipoclorito de sódio a 2%, por um minuto e em seguida foram lavadas com água destilada e colocadas para secar sobre papel toalha em temperatura ambiente, para a remoção do excesso de água superficial. Como tratamento pré-germinativo, foi realizada a escarificação manual das sementes com lixa d'água nº 80, no lado oposto à micrópila, a fim de acelerar o processo de embebição e conseqüentemente a germinação. Em seguida, as sementes foram armazenadas em câmara fria (temperatura de 10°C e 60% de umidade) até o momento da realização dos ensaios.

**2.2. Caracterização morfológica dos frutos:** Para a caracterização morfológica dos frutos foram considerados os seguintes aspectos: tipo, coloração, textura e consistência do pericarpo, deiscência e número de sementes por fruto.

**2.3. Caracterização morfológica das sementes:** Foram realizadas avaliações das características morfométricas das sementes (comprimento, largura e espessura) a partir da amostra de 100 sementes, escolhidas aleatoriamente da amostra original, com paquímetro digital (Digimess) de precisão de 0,01mm. Considerou-se como comprimento a porção compreendida entre a extremidade basal e apical da semente, sendo a largura e a espessura medidas na parte intermediária. Para cada uma das variáveis estudadas, obteve-se as medidas mínimas, máximas e a média aritmética. Os

aspectos descritos foram: coloração, textura e consistência do tegumento, forma e bordo; posição do hilo, da micrópila, rafe, cotilédones e eixo hipocótilo-radicular. Para facilitar o estudo da morfologia interna, as sementes foram hidratadas e posteriormente submetidas a cortes longitudinais e transversais, sendo observadas com o auxílio de lupas de mesa. Os métodos e termos empregados foram baseados nos trabalhos de Vidal e Vidal (2007), Barroso et al. (2004) e Oliveira (1993). Como ferramenta auxiliar nos estudos morfológicos, foram obtidas imagens das estruturas internas das sementes por meio de aparelho de raios X, sendo as sementes dispostas em placas de acrílico transparente sobre fita adesiva de dupla face e submetida à radiação em equipamento de raios X “Faxitron HP”, modelo 43855A, na intensidade de 30Kv por 45 segundos, obtendo imagens digitais das estruturas internas das sementes.

**2.4. Caracterização anatômica da semente:** A avaliação anatômica da semente madura foi feita através de secções transversais. Para a preparação dos cortes anatômicos, o material foi previamente fixado em FAA, desidratado progressivamente pelas misturas de etanol-butanol, e incluído em historesina a 58°C. Os cortes histológicos (15 µm) foram confeccionados em micrótomo, posteriormente corados em Azul de Toluidina 0,05% - coloração policromática (O'BRIEN et al., 1964) e montadas em lâminas permanentes com historesina sintética. Os resultados foram ilustrados por meio de fotomicrografias obtidas em fotomicroscópio Leica DM500, acrescentando escalas nas condições ópticas adequadas. A anatomia das sementes foi descrita segundo Apezzatto-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2006). Alguns cortes foram preparados para a realização de testes histoquímicos visando à detecção de algumas substâncias. Para verificar a presença de compostos fenólicos (taninos), utilizou-se Vanilina clorídrica e para a localização de substâncias lipídicas (óleo vegetal), utilizou-se Sudan IV .

**2.5. Germinação:** As sementes foram colocadas para germinar em substrato de papel tipo “germitest”, no sistema de rolo de papel, com duas folhas para a base e uma para a cobertura. Os papéis foram umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do substrato seco. Os rolos, contendo as sementes, foram mantidos em germinador regulado à temperatura de 25°C. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes cada. O acompanhamento da germinação foi realizado durante 30 dias com avaliações a cada dois dias. Considerou-se germinação o período compreendido entre o intumescimento da semente ao alongamento do hipocótilo e do epicótilo, antes que o primeiro protófilo estivesse completamente formado. Analisou-se o tipo de germinação,

forma, cor, consistência da radícula, epicótilo, coleto. As estruturas básicas de cada etapa do processo germinativo foram documentadas com máquina fotográfica.

**2.6. Desenvolvimento das plântulas:** Para o acompanhamento e a caracterização do desenvolvimento de plântulas, foram utilizadas 100 sementes, semeadas em bandejas de polietileno de 40x30x8 cm, contendo como substrato uma mistura de terra de subsolo e areia na proporção de 3:1. A semeadura foi realizada a 4 cm de profundidade e o substrato foi umedecido até 70% de sua capacidade de campo, sendo posteriormente irrigado sempre que necessário. As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura controlada de 25°C e fotoperíodo (oito horas de luz e 16 horas de escuro) durante 45 dias. As avaliações foram realizadas a cada dois dias, sendo considerada como plântula a fase do desenvolvimento em que se apresentavam com raiz principal e secundárias, hipocótilo, caule jovem e protófilos abertos e bem desenvolvidos. Todas as fases descritas foram fotografadas com máquina digital.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**3.1. Caracterização morfológica do fruto:** o fruto é simples do tipo drupa, carnoso, indeiscente, com ápice e base agudos, pericarpo liso de textura firme, de coloração esverdeada também quando maduro, polpa bem desenvolvida e abundante, de origem placentar, que preenche toda a cavidade interna, que na parte central está disposta a única semente, sendo portanto, monospermico. Apresenta pedúnculo lenhoso, marrom e estriado verticalmente, feixe vascular ligando o pedúnculo a região do hilo da semente (Figura 1 – A a E). Padrão similar foi encontrado para os frutos de *Manilkara salzmannii* (Sapotaceae), quanto ao tipo, coloração, textura e consistência do pericarpo. No entanto, para esta espécie os frutos possuem em média duas sementes (ALMEIDA JR. et al., 2010).



**Figura 1** – Frutos de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. A – ramos com frutos verdes; B;C – frutos maduros; D– fruto maduro/corte longitudinal; E – frutos em diferentes estádios de maturação/corte longitudinal. (ap – ápice; ba – base; en – endocarpo; fv – feixe vascular; ep – epicarpo; me – mesocarpo; pd – pedúnculo; s – semente). Barra 3,0 cm.

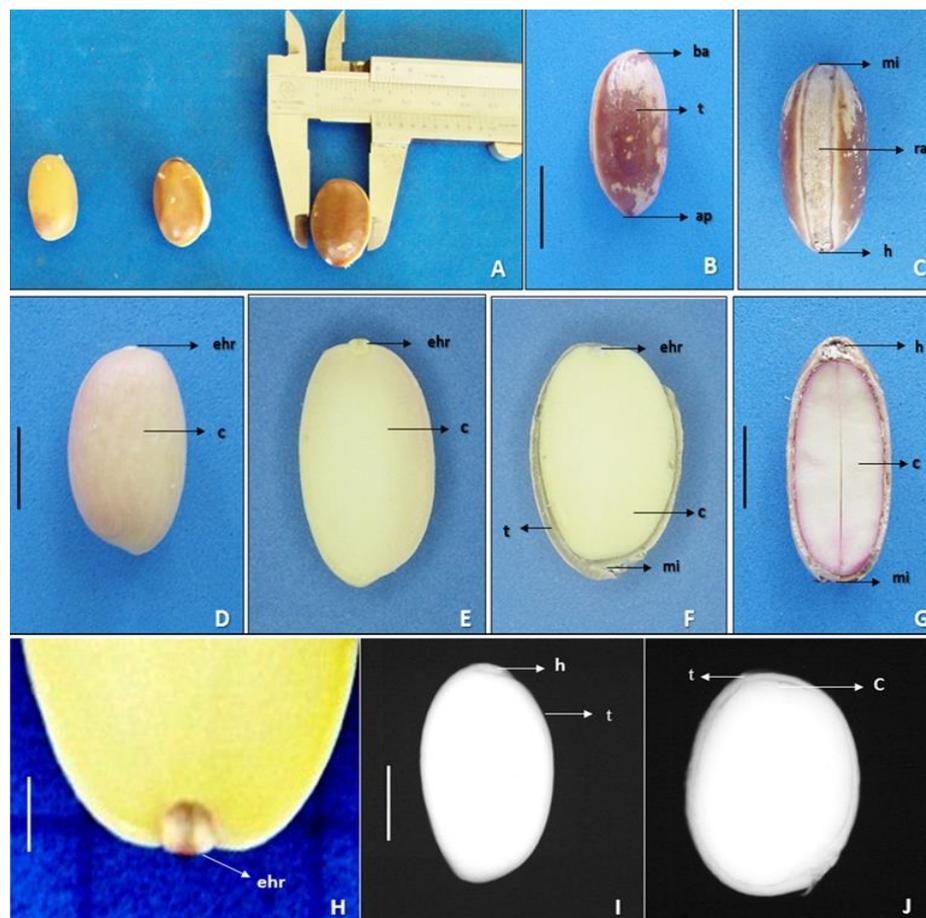
O fruto possui odor característico, sabor adocicado e agradável quando maduro, e adstringente quando imaturo pela grande quantidade de látex, de coloração esbranquiçada, presente no epicarpo. As espécies da família Sapotaceae são caracterizadas pela presença de látex no tronco, ramos e frutos, sendo em geral branco, apresentando uma emulsão ou suspensão de muitas partículas sólidas, muitas vezes leitosa, com composição variada, podendo conter borracha, amido, proteínas, alcaloides, ceras, resinas ou pigmentos (DICKINSON, 2000).

**3.2. Caracterização morfológica de sementes:** As sementes apresentam comprimento médio de 24,88 (variando de 20,64 – 28,23 mm), largura média de 15,49 (variando de 12,65 – 17,78 mm) e espessura média de 12,75 (variando de 10,63 – 15,10 mm), conforme Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores médios de comprimento, largura e espessura em sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

<b>Dimensões (mm)</b>	<b>Média</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Comprimento</b>	24,88	28,23	20,64	1,86	7,46
<b>Largura</b>	15,49	17,78	12,65	1,04	6,69
<b>Espessura</b>	12,75	15,10	10,63	0,86	6,75

As sementes possuem formato elipsoide, estando envoltas pela polpa sucosa. O tegumento é brilhante, liso, com coloração que varia de marrom-escuro a castanho-claro, dependendo do estágio de maturação, apresenta considerável grau de dureza e impermeabilidade, dificultando a embebição e retardando o processo germinativo, além de nervuras bem desenvolvidas na parte interna. O hilo se apresenta bem evidente e perceptível a olho nu, na região apical da semente. A micrópila é pequena, arredondada, geralmente com coloração mais clara que o tegumento e situada na posição basal da semente abaixo da rafe, que apresenta coloração creme e se dispõe na região ventral desde a base da semente até o ápice, sendo delimitada lateralmente por uma protuberância no tegumento (Figura 2 – A a J). Internamente a semente é desprovida de endosperma, estando todo o material de reserva armazenado nos cotilédones. Possui um embrião cotiledonar, reto, axial, plano, esbranquiçado. A delimitação entre o eixo hipocótilo-radicular e os cotilédones é bem visível (Figura 2 – H). Os cotilédones são grandes, ocupando todo o comprimento da semente, carnosos, lisos, arredondados, de coloração externa variando entre rosácea e creme dependendo do ponto de maturação da semente e passando a ter coloração esverdeada no início da embebição da semente (Figura 2 – D a F).



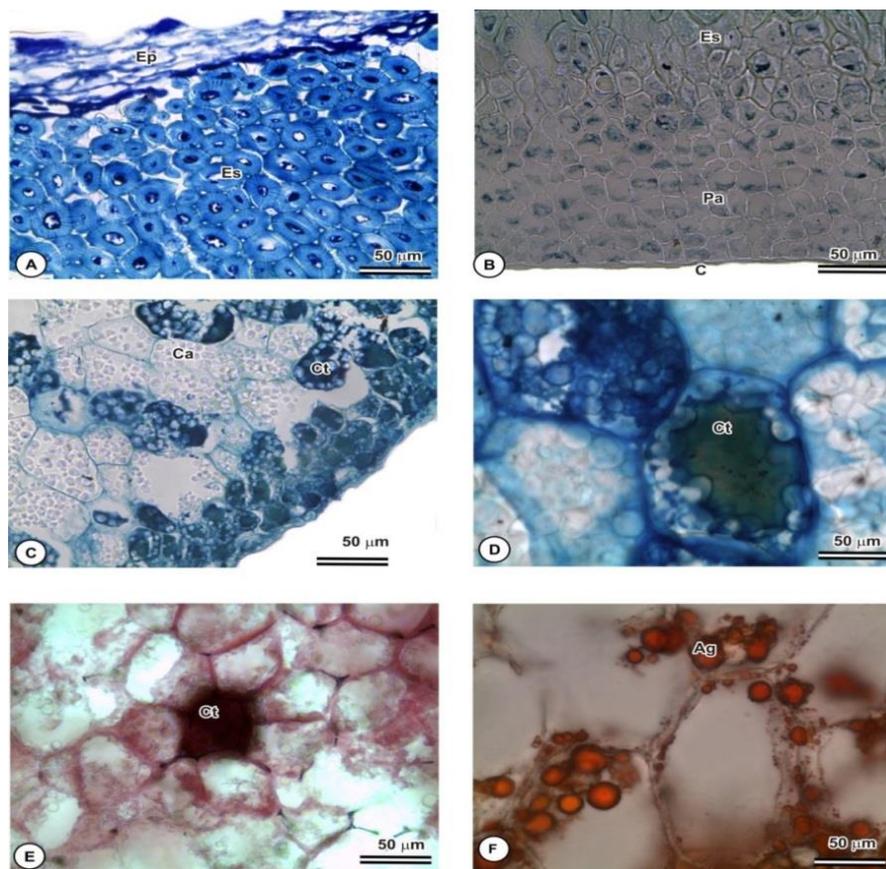
**Figura 2** – Sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. A – sementes inteiras em diferentes estádios de maturação; B – semente/vista frontal; C – semente/vista lateral; D - cotilédones; E; F – sementes/Corte longitudinal; G – sementes/Corte longitudinal lateral; H – Cotilédone com destaque para o eixo hipocótilo-radicular/corte longitudinal; I; J – imagens radiográficas das sementes. (ap – ápice; ba – base; c – cotilédone; ehr – eixo hipocótilo-radicular; h – hilo; mi – micrópila; ra – rafe; t – tegumento). Barra 2,0 cm.

Padrão semelhante, ao encontrado neste estudo, foi observado para sementes de quixaba [*Sideroxylon obtusifolium* (Roem. e Schult.) Penn. –Sapotaceae], que variam de globosas a elipsoides, são desprovidas de endosperma quando maduras, o embrião é do tipo cotiledonar e basal e os cotilédones ocupam todo o comprimento da semente (SILVA et al., 2012).

**3.3. Caracterização anatômica das sementes:** O tegumento é delgado, constituído por várias camadas de células que podem ser agrupadas em três estratos distintos (Figura 3 – A e B). No estrato externo, encontra-se um grupo de células formando a epiderme do tegumento ou exotesta. O estrato médio é formado por um

esclerênquima com esclereides grandes, de paredes lignificadas e dispostas de maneira esparsa, atuando como elementos mecânicos que conferem rigidez aos envoltórios da semente. A principal camada de tecido mecânico é representada pelo esclerênquima e está presente na testa, com a mesotesta totalmente esclerificada. O estrato interno é composto por células parenquimáticas formando a endotesta, com várias fileiras irregulares de células pequenas, de paredes delgadas, limitando-se ao endosperma por meio de uma cutícula e não penetrando no mesmo. Garcia et al. (2006) encontraram o mesmo padrão trifásico no tegumento das sementes de *Podocarpus lambertii* Klotz. e *Podocarpus sellowii* Klotz. (Podocarpaceae).

O endosperma, representado pelos cotilédones armazenadores, possui epiderme cuticularizada e unisseriada e no estrato interno apresenta células com grande quantidade de grãos de amido, sendo classificado como endosperma amiláceo (Figura 3 – C). Destaca-se ainda a presença de células com conteúdo celular tanífero, podendo estar relacionadas à proteção contra predadores e microrganismos, ou ainda a atribuição da cor da semente, tendo em vista que, em sementes imaturas, os cotilédones apresentam coloração rosácea (Figura 3 - D). As células taníferas foram confirmadas pelo teste histoquímico com vanilina clorídrica (Figura 3 – E). Os tecidos dos cotilédones apresentam também material lipídico, verificado pelo teste histoquímico com Sudan IV (Figura 3 – F). Resultado semelhante foi encontrado por Felippi et al. (2010), ao verificar que as sementes maduras de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichl.) Engl. (Sapotaceae) armazenam grãos de aleurona e lipídios nos cotilédones e nas células remanescentes do endosperma.



**Figura 3** – Cortes transversais em semente de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. A – estratos externo e intermediário do tegumento; B – estrato interno do tegumento; C – tecidos do cotilédone com grãos de amido; D - célula com conteúdo tanífero em destaque; E – células com taninos evidenciada por coloração com vanilina clorídrica; F – células dos tecidos do cotilédone com ácidos graxos (material lipídico). (Ag – ácidos graxos; C – cutícula; Ca – células com conteúdo amilífero; Ct – Célula com conteúdo tanífero; Ep – epiderme; Es – Esclerênquima; Pa – parênquima).

**3.4. Germinação:** A Germinação é do tipo hipógea. Inicialmente ocorre o intumescimento da semente e a ruptura do tegumento na região da micrópila, com protrusão radicular ocorrendo entre o 5º e 7º dia após a sementeira, quando as sementes são submetidas à escarificação mecânica como tratamento pré-germinativo, conforme descrito anteriormente (Figura 4 – A). A raiz primária se apresenta em formato cilíndrico e coloração branca com coifa bem delimitada e afinada, curva, e a medida que ocorre o alongamento adquire cor castanha com a presença de pelos absorventes curtos (Figura 4 – A a B). Gradativamente surge o epicótilo de coloração verde clara, que se alonga até o surgimento dos protófilos de 1ª ordem. A raiz primária possui pelos translúcidos, perceptíveis apenas com o auxílio da lupa de mesa (Figura 4 – C a E).

Nota-se diferença de cor entre a raiz primária e o hipocótilo, que é curto e apresenta coloração marrom-claro (Figura 4 – F).

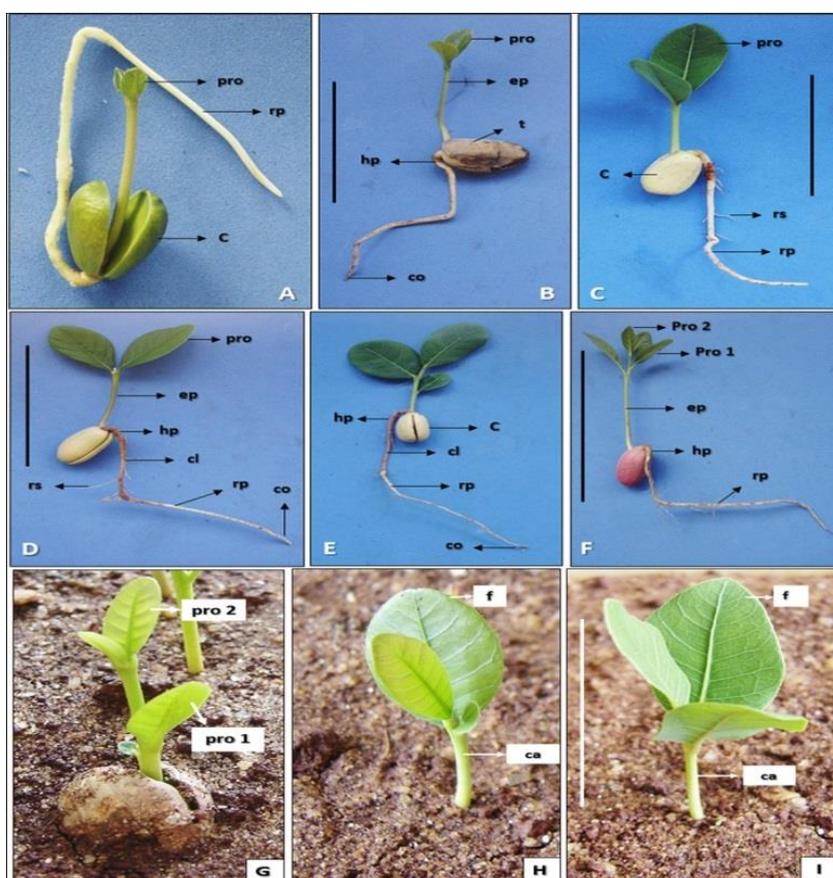


**Figura 4** – Germinação de sementes de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. A - estádios sucessivos de desenvolvimento - intumescimento da semente, protrusão e alongamento da radícula; B; C; D – alongamento da raiz primária e surgimento do epicótilo; E – alongamento da raiz primária e desenvolvimento de raízes secundárias; F – expansão do epicótilo, do hipocótilo e da raiz primária. (c – cotilédones; co – coifa; ep – epicótilo; hp – hipocótilo; p – pelos absorventes; pro- protófilo; rp – raiz primária; rs – raiz secundária; t – tegumento). Barra: 2,0 cm para C e E; 4,0 cm para F.

Ao contrário do observado no presente trabalho, as sementes de curupixá (*Micropholis cf. venulosa* Mart. & Eichler - Sapotaceae) apresentam, germinação epígea e plântulas do tipo fanerocotiledonares (CRUZ; CARVALHO, 2003).

**3.5. Desenvolvimento da plântula:** A plântula é criptocotiledonar. A emergência ocorre de 10 a 35 dias após a semeadura. No 45º dia de semeadura, a plântula apresentou raiz principal tortuosa, de coloração creme amarelada, cilíndrica,

com comprimento variando de 6,01 a 15,33 cm (Figura 5 – A a C). Ramificação secundária pouco desenvolvida com raízes finas e simples, flexíveis, curtas em relação à raiz principal. O hipocótilo é curto e cilíndrico, com leve tortuosidade, de coloração marrom-claro e consistência membranácea. O coleto se caracteriza por uma faixa marrom clara, de 2,5 a 3,0 cm de comprimento. A parte aérea da plântula apresentou comprimento variando entre 4,69 a 7,82 cm, com epicótilo reto, cilíndrico, de coloração verde clara, consistência herbácea e contendo em média duas folhas por plântula (Figura 5 – D a F). Os protófilos são simples, de coloração verde escura na face adaxial e verde clara na face abaxial; consistência coriácea, com comprimento variando entre 0,49 a 1,85 cm e largura de 0,12 cm, com bordas lisas, ápice agudo e base obtusa (Figura 5 – G a I).



**Figura 5** - Desenvolvimento de plântulas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. A – E – Aparecimento e expansão dos protófilos de 1ª ordem, alongamento da raiz principal, desenvolvimento de raízes secundárias; F;G - Aparecimento e expansão dos protófilos de 2ª ordem; H;I – Desenvolvimento das folhas e do caule jovem (ca – caule; c – cotilédone; cl – coleto; co – coifa; ep – epicótilo; f – folha; hp – hipocótilo; pro 1 –

protofilo de 1ª ordem; pro 2 – protofilo de 2ª ordem; rp – raiz primária; rs – raiz secundária; t - tegumento). Barra: 4,0 cm para B,C e D; 5,0 cm para F e 7,0 para I.

#### 4. CONCLUSÕES

O fruto é simples, do tipo drupa, carnosos, indeiscente e monospermico. As sementes apresentam formato elipsoide, tegumento brilhante e rígido, e os cotilédones são ricos em amido, células taníferas e compostos lipídicos, ocupando todo o comprimento da semente. A semente possui tegumento tri estratificado.

A protrusão radicular ocorre entre o 5º e 7º dia após a semeadura, quando as sementes são submetidas à escarificação mecânica e mantidas à temperatura de 25°C. A plântula é do tipo hipógea criptocotiledonar, com hipocótilo curto e cilíndrico e epicótilo reto, cilíndrico, de coloração verde clara.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Embrapa Cerrados, Distrito Federal, 1998. 464p
- ALMEIDA JR., E. B; LIMA, L.F.; LIMA, P.B.; ZICKEL, C.S. Descrição morfológica de frutos e sementes de *Manilkara salzmannii* (Sapotaceae). **Floresta**, v. 40, n. 3, p. 535-540, 2010.
- AMARO, M.S.; FILHO, S.M.; GUIMARÃES; R.M.; TEÓFILO, E.M. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL.- (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.1, p.63-71, 2006.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 438p.
- ARAÚJO NETO, J.C.; AGUIAR, I.B.; FERREIRA, V.M.; PAULA, R.C. Caracterização morfológica de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de monjoleiro (*Acacia polyphylla* DC.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, n.1, p.203-211, 2002.
- BARRETTO, S.S.B.; FERREIRA, R.A. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de Leguminosae Mimosoideae: *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vellozo) Morong. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, nº 2, p. 223 - 232, 2011.
- BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 443p.

CRUZ, E.D.; CARVALHO, J.E.U. Biometria de frutos e sementes e germinação de curupixá (*Micropholis venulosa* Mart. & Eichler – Sapotaceae). **Acta Amazônica**, v.33, n.3, p.389-398, 2003.

CUNHA, M.C.L.; FERREIRA, R.A. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C. Smith – cumaru – Leguminosae- Papilionoideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.2, p.89-96, 2003.

DALPONTE, J.C.; LIMA, E.S. Disponibilidade de frutos e a dieta de *Lycalopex vetulus* (Carnivora - Canidae) em um cerrado de Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. V.22, n.2, p.325-332. 1999.

DICKINSON, W. C. **Integrative plant anatomy**. San Diego: Harcourt academic press, 2000.

FELIPPI, M.; GROSSI, F.; NOGUEIRA, A. C.; MOCO, M. C. C. Desenvolvimento da semente de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichl.) Engl. (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, vol.32, n.1, p. 92-100, 2010.

FERREIRA, R.A.; BOTELHO, S.A.; DAVIDE, A.C.; MALAVASI, M.M. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de *Dimorphandra mollis* Benth. – faveira (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.3, p.303-309, 2001.

GAMA, L.U.; BARBOSA, A.A.A.; OLIVEIRA, P.E.A.M. Sistema sexual e biologia floral de *Pouteria ramiflora* e *P. torta* (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.34, n.3, p.375-387, 2011.

GARCIA, L. C.; NOGUEIRA, A. C.; ALQUINI, Y. Aspectos morfo-anatômicos de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotz. e *Podocarpus sellowii* Klotz. - Podocarpaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, vol.28, n.3, p. 129-134, 2006.

MONTEIRO, M.H.D.A.; NEVES, L.J.; ANDREATA, R. H. P. Taxonomia e anatomia das espécies de *Pouteria aublet* (Sapotaceae) do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Botânica**, N° 58: 7-118, 2007.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N. & McCULLY, M.E. **Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O**. **Protoplasma**. 59:368-373. 1964.

OLIVEIRA, E.C. Morfologia de plântulas florestais. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (coord.). **Sementes florestais tropicais**. ABRATES, 1993. p.175-214.

PENNINGTON, T. D. Sapotaceae. **Flora Neotropica**, v. 52, p. 1-770, 1990.

SILVA, K. B.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. L. A.; MATOS, V. P. Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. e Schult.) Penn. (Sapotaceae). **Revista Árvore**, vol.36, n.1, p. 59-64, 2012.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica – organografia: quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos** – 4<sup>a</sup> Ed. Viçosa: Editora UFV, 2007. 124p.

## CONCLUSÃO GERAL

A secagem das sementes de *Ramnidium elaeocarpum* Reissek até 12% de teor de água não afetou seu potencial fisiológico e não promoveu alterações bioquímicas. As sementes apresentaram alta taxa de germinação, atividade crescente da enzima endo- $\beta$ -mananase e rápido desenvolvimento das plântulas, em resposta à diminuição do teor de água. Além disso, detectou-se atividade enzimática de  $\alpha$ -amilase, catalase, esterase e peroxidase e a presença de proteínas de baixo peso molecular, resistentes ao calor. Deste modo, as sementes de *R. elaeocarpum* apresentaram comportamento esperado para sementes tolerantes à dessecação.

Para *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. houve diminuição da qualidade fisiológica e do vigor das sementes em resposta à secagem, principalmente para as sementes imaturas. Foram observadas alterações bioquímicas para a atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase e esterase em resposta à secagem das sementes. Isoformas de catalase e peroxidase não foram detectadas e cadeias polipeptídicas de proteínas resistentes ao calor não foram observadas. Neste sentido, as sementes de *P. ramiflora* (Mart.) Radlk. são consideradas intolerantes à dessecação, sendo esta intolerância maximizada em sementes imaturas.

Com relação aos aspectos morfológicos de *R. elaeocarpum* Reissek, evidenciou-se que o fruto é simples do tipo drupa, carnoso, indeiscente e monospermico, as semente possuem coloração creme, tegumento fino e rugoso com presença de conteúdo tanífero e endosperma rico em amido, cristais de oxalato de Cálcio e conteúdo lipídico. A germinação das sementes é hipógea e a plântula tem desenvolvimento criptocotiledonar.

O fruto de *P. ramiflora* (Mart.) Radlk. é simples, bacoide, carnoso, indeiscente e monospermico. As sementes possuem formato elipsoide, tegumento brilhante e rígido, e os cotilédones são ricos em amido, células taníferas e compostos lipídicos. A protrusão

radicular ocorre entre o 5º e 7º dia após a semeadura. A plântula é do tipo hipógea criptocotiledonar, com hipocótilo curto e cilíndrico e epicótilo reto, cilíndrico, de coloração verde clara.