

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – IF GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BIOLOGIA DA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
PÓS-SEMINAL DE *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf.
(Fabaceae: Caesalpinoideae)**

Autora: Lília Cristina de Souza Barbosa
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana de Fátima Sales
Coorientadores: Prof. Dr. Diego Ismael Rocha
Prof. Dr. Jacson Zuchi

Rio Verde – GO
Janeiro – 2019

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – IF GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BIOLOGIA DA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
PÓS-SEMINAL DE *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf.
(Fabaceae: Caesalpinoideae)**

Autora: Lília Cristina de Souza Barbosa
Orientadora: Prof. ^a Dr.^a Juliana de Fátima Sales
Coorientadores: Prof. Dr. Diego Ismael Rocha
Prof. Dr. Jacson Zuchi

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA em CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia - do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde – Área de concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde – GO
Janeiro – 2019

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

BB238b Barbosa, Lilia Cristina de Souza
BIOLOGIA DA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-
SEMINAL DE *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf.
(Fabaceae: Caesalpinoideae) / Lilia Cristina de
Souza Barbosa; orientadora Juliana de Fátima Sales;
co-orientadora Diego Ismael Rocha. -- Rio Verde,
2019.
124 p.

Tese (em Pós-graduação em Ciências Agrárias) --
Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2019.

1. mobilização de reservas. 2. plântula. 3.
tecnologia de produção de mudas. I. Sales, Juliana de
Fátima, orient. II. Rocha, Diego Ismael, co-orient.
III. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 n°2376



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.510/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia - Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional | <input type="checkbox"/> Tipo: |

Nome Completo do Autor: Ulla Cristina de Souza Barbosa

Matrícula: 2015102520190840

Título do Trabalho: **BIOLOGIA DA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL DE *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. (Fabaceae: Caesalpinioideae)**

Restrições de Acesso ao Documento

Documento Confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizada no RIIIF Goiano: 29 / 11 / 2019

O documento está sujeito a registro de autorais? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referida/s autor/s declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autorais, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 28 / 11 / 2019
Local Data

Ulla Cristina de Souza Barbosa

Assinatura do Autor (ou Detentor dos Direitos Autorais)

Ciente e de acordo:


Juliana de Fátima Sales
Assinatura do(a) orientador(a)



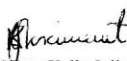
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
CAMPUS RIO VERDE - GO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA


ATA Nº/51 BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE

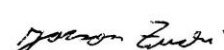
Aos trinta dias do mês de janeiro do ano de dois mil e dezenove, às 08h00min (oito horas), reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof.^a Dra. Juliana de Fátima Sales (orientadora), Prof.^a Dra. Carla Gomes Machado (avaliadora externa), Prof. Dr. Diego Ismael Rocha (avaliador externo), Prof.^a Dra. Kelly Juliane Telles Nascimento (avaliadora interna), Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho (avaliador interno) e Prof. Dr. Jacson Zuchi (avaliador interno) sob a presidência do(a) primeiro(a), em sessão pública realizada no auditório da DPPG do IF Goiano – Campus Rio Verde, para procederem a avaliação da defesa de Tese, em nível de Doutorado, de autoria de **LÍLIA CRISTINA DE SOUZA BARBOSA**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pelo(a) presidente da Banca Examinadora, Prof.^a Dra. Juliana de Fátima Sales, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida o(a) autor (a) da Tese para, em 40 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o(a) examinado(a), tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, e procedidas às correções recomendadas, a Tese foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **DOUTOR(a) EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA**, na área de concentração Produção Vegetal Sustentável no Cerrado, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGCA-AGRO da versão definitiva da Tese, com as devidas correções. Assim sendo, esta ata perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60** (sessenta) dias da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa Tese em periódicos de circulação nacional e/ou internacional, após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Tese de Doutorado, e para constar, eu, Vanilda Maria Campos, secretária do PPGCA-AGRO, lavrei a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.



Prof.^a Dra. Carla Gomes Machado
Avaliadora externa
UFG – Jataí/GO


Prof. Dr. Diego Ismael Rocha
Avaliador externo
UFG – Jataí/GO


Prof.^a Dra. Kelly Juliane Telles Nascimento
Avaliadora interna
IF Goiano – Campus Rio Verde


Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho
Avaliador interno
IF Goiano – Campus Rio Verde


Prof. Dr. Jacson Zuchi
Avaliador interno
IF Goiano – Campus Rio Verde


Prof.^a Dra. Juliana de Fátima Sales
Presidente da banca
IF Goiano – Campus Rio Verde

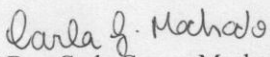
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-AGRONOMIA

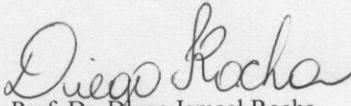
BIOLOGIA DA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL DE
Delonix regia (FABACEAE)

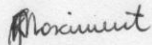
Autora: Lília Cristina de Souza Barbosa
Orientadora: Dra. Juliana de Fátima Sales


TITULAÇÃO: Doutor(a) em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de Concentração
em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

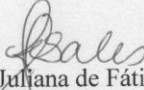
APROVADA em 30 de janeiro de 2019.


Prof.^a Dra. Carla Gomes Machado
Avaliadora externa
UFG – Campus Jataí/GO


Prof. Dr. Diego Ismael Rocha
Avaliador externo
UFG – Campus Jataí/GO


Prof.^a Dra. Kelly Juliane Telles Nascimento
Avaliadora interna
IF Goiano – Campus Rio Verde/GO


Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos
Filho Avaliador interno
IF Goiano – Campus Rio Verde/GO


Prof.^a Dra. Juliana de Fátima Sales
Presidente da banca
IF Goiano – Campus Rio Verde/GO

À minha sogra e mãe ‘de alma’, Carmencita das Graças de Oliveira (in memoriam), que me adotou, amou, incentivou e me apoiou em toda a minha jornada deste doutorado...

À minha avó Querubina Barbosa dos Santos (in memoriam), que com sua doçura, amor e simplicidade, mal sabia ler e escrever, mas tinha a “inteligência da alma”...

... vocês me inspiraram a ser uma pessoa melhor.

Saudades! Dedico!

“A neve e as tempestades matam as flores,
mas nada podem contra as sementes.”
(Khalil Gibran)

“Escrever é fácil.
Você começa com uma letra maiúscula
e termina com um ponto final.
No meio você coloca ideias.”
(Pablo Neruda)

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu anjo da guarda, que me deram força para enfrentar as adversidades que surgiram e determinação para realizar este sonho, além da proteção divina em minhas incontáveis viagens para concretizar este trabalho.

À minha família, em especial ao meu esposo Vinícius, minha cunhada Denise, minha sogra Carmencita (*in memoriam*) e ao vovô Sebastião (*in memoriam*) pelo companheirismo e força. Às minhas primas Kátia e Karoline, pela acolhida na cidade de Rio Verde e, que me fizeram sentir em casa nos momentos difíceis. À minha tia e “mãedrinha” Sebastiana, por todo o apoio em minha vida.

À minha orientadora professora Dr.^a Juliana de Fátima Sales, pela confiança, amizade, orientação e dedicação.

Aos meus coorientadores professores Dr. Diego Ismael Rocha e Dr. Jacson Zuchi, pela amizade, incentivo, orientações, paciência e aprendizado.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Campus Rio Verde (IF Goiano/Campus Rio Verde), Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pela infraestrutura disponibilizada. À secretária da Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Vanilda Campos, pela amizade, dedicação, competência e profissionalismo. Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pela contribuição na minha formação acadêmica e profissional.

À equipe do Laboratório de Sementes, do IF Goiano/Campus Rio Verde, em especial ao Dr. Gessimar Nunes e pós-doutoranda Dra.^a Kelly Juliane Nascimento e aos colegas de pós-graduação Anailda Angélica Drumond, Melícia Gavazza, Deyner Damas, Jhonatas Cantuária, Dymas Cruvinel, Perciliana Bueno e aos alunos de iniciação científica Stefani, Pablio, Moara Mariely, Stella Castro e Geovani Borges, pela acolhida e auxílios.

À equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal, do IF Goiano/Campus Rio Verde, Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos-Filho, Dra. Valdnéa Casagrande Dalvi, Arthur Almeida e Douglas Almeida, pela disponibilidade e atenção concedida.

Ao Laboratório de Análise Ultraestrutural, da Universidade Federal de Lavras, à técnica Elisa de Melo Castro, ao Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro e à Dra.^a Alessandra Ribeiro, pelo auxílio e colaboração das análises em Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), do Instituto de Física, da Universidade Federal de Goiás, Campus Goiânia, em especial aos técnicos Msc. Henrique Santiago e Dra. Tatiane Oliveira pelo apoio e suporte nas análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura.

Ao professor Dr. Fabiano Guimarães Silva, do IF Goiano Rio Verde, pelo apoio financeiro que permitiu as análises no LabMic.

À Universidade Federal de Jataí (UFJ), Unidade Acadêmica Especial Ciências Biológicas, particularmente aos Laboratórios de Anatomia Vegetal e de Morfofisiologia, pela parceria, pela infraestrutura e suporte científico para o desenvolvimento da pesquisa.

Às Dra.^a Mariana Machado Rocha e Dr.^a Kelly Juliane Teles, pelo auxílio na condução dos experimentos de análises bioquímicas.

Aos amigos e ex-colegas de trabalho da UFG/REJ, Dr. Daniel Sousa Bartoli, Dr. Diego Ismael Rocha, Dr.^a Mônica Ferreira Machado Rodrigues, Dr. Ricardo de Mattos Santa-Rita, Dr. Antônio Paulino Costa Netto, Dr. Christiano Peres Coelho, Dr.^a Érica Virgínia Amaral e Msc. Maríllia Assis Lima, pelo encorajamento, incentivo e compreensão pela ausência no trabalho.

Aos alunos estagiários do Laboratório de Anatomia Vegetal, Lana Laene Lima, Lázara Aline Simões, Mateus Souza Silva, Matheus Assis Zanolla, Nayara Paulla Carvalho e Richelle Garcia, pelo apoio na instalação e coleta dos dados dos experimentos realizados, também, pelo companheirismo, amizade e convivência em todos os momentos.

Aos atuais colegas de trabalho Profs. Dr. André Kipnis e Dr.^a Ana Paula Junqueira Kipnis, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da UFG Regional Goiânia, pela acolhida e compreensão na reta final da minha tese.

Sou enormemente grata a todos que foram citados e também, a todas as pessoas e indiretamente contribuíram com a realização desta pesquisa.

***“Eu só quero agradecer por ter vocês,
para me acompanhar nas minhas loucuras,
me deixar bem mais segura
daquilo que eu posso ser...”
(Ana Vilela)***

Muito obrigada! Valeu a pena!

BIOGRAFIA DA AUTORA

Lília Cristina de Souza Barbosa nasceu em 19 de abril de 1984, na cidade de Jataí, Goiás. Em 2001, iniciou a licenciatura em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí (UFG/REJ), que foi concluída em 2004. Em setembro de 2007 se tornou mestre em Biologia, na área de concentração Biologia Celular e Molecular, pelo Instituto de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Goiás (ICB/UFG), Campus Goiânia. Foi orientada pela professora Dr.^a Maria Helena Rezende e coorientada pelos professores Dr. José Realino de Paula e Dr.^a Dalva Graciano-Ribeiro, no trabalho intitulado “Morfo-anatomia e fitoquímica de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (Poaceae: Panicoideae)”. Atuou como professora substituta, no Departamento de Morfologia do ICB/UFG, lecionando a disciplina de Anatomia Humana e Comparada, no período de março de 2008 a dezembro de 2009. Em janeiro de 2010, foi efetivada no quadro de técnicos da UFG/REJ, atualmente Universidade Federal de Jataí, onde atua como responsável técnica pelos Laboratórios de Microscopia e Morfofisiologia e exerce atividades nas áreas de Histologia Animal e Anatomia Vegetal. Em março de 2015, ingressou no doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Agronomia, área de concentração “Produção Vegetal Sustentável no Cerrado”, sob orientação da professora Dr.^a Juliana de Fátima Sales e Coorientação dos professores Dr. Diego Ismael Rocha e Dr. Jacson Zuchi, encerrando esta etapa profissional com esta tese para a obtenção do título de doutora.

ÍNDICE GERAL

	Páginas
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Dormência física de sementes.....	5
2.2. Morfologia das sementes pela análise dos raios X.....	7
2.3. Germinação, mobilização de reservas e desenvolvimento pós-seminal.....	8
2.4. Produção de espécies reativas durante a germinação.....	9
3. OBJETIVOS.....	11
3.1. Objetivo Geral.....	11
3.2. Objetivos Específicos.....	11
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
CAPÍTULO 1 – Análise do efeito dos tratamentos pré-germinativos na superação de dormência de sementes de <i>Delonix regia</i> (Bojer ex. Hook.) Raf. (Fabaceae, Caesalpinoideae).....	24
Resumo.....	24
Abstract.....	25
Introdução.....	25
Material e Métodos.....	28
Resultados.....	32
Discussão.....	41
Conclusão.....	44
Agradecimentos.....	45
Referências Bibliográficas.....	45
CAPÍTULO 2 – Aspectos morfoanatômicos e da mobilização das reservas na germinação de sementes e desenvolvimento pós-seminal de <i>Delonix regia</i> (Bojer	

ex. Hook.) Raf. (Fabaceae, Caesalpinoideae).....	52
Resumo.....	52
Abstract.....	53
Introdução.....	53
Material e Métodos.....	55
Resultados.....	59
Discussão.....	68
Conclusão.....	73
Agradecimentos.....	73
Referências Bibliográficas.....	73
CAPÍTULO 3 – Respostas anti-oxidativas durante a germinação de sementes de	
<i>Delonix regia</i> (Bojer ex. Hook.) Raf. (Fabaceae, Caesalpinoideae).....	84
Resumo.....	84
Abstract.....	85
Introdução.....	85
Material e Métodos.....	87
Resultados.....	92
Discussão.....	97
Conclusão.....	100
Referências Bibliográficas.....	100
CONCLUSÃO GERAL.....	109

ÍNDICE DE TABELAS

	Páginas
INTRODUÇÃO	
Quadro 1. Classes de dormência de sementes (Modificado de Nikolaeva, 1977 e Baskin e Baskin, 1998).....	4
 CAPÍTULO 1	
Figura 1. Porcentagem de sementes de <i>D. regia</i> encontrada em cada categoria, confirme as imagens obtidas pelas análises em raios X.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

INTRODUÇÃO

Figura 1. <i>Delonix regia</i> (Bojer ex Hook.) Raf.....	3
Figura 2. Secção longitudinal representativa da semente de espécie da família Fabaceae, subfamília Papilionoideae.....	6

CAPÍTULO 1

Figura 1. Porcentagem de sementes germinadas e índice de velocidade de germinação aos 11° dias após a semeadura.....	33
Figura 2. Análise da morfologia interna das sementes de <i>D. regia</i> por análise em raios X e porcentagem de plântulas normais, anormais, sementes duras e mortas..	34
Figura 3. Porcentagem do teor de água nas sementes de <i>Delonix regia</i> , nos diferentes tratamentos pré-germinativos.....	36
Figura 4. Curva de embebição das sementes de <i>Delonix regia</i>	37
Figura 5. Mudanças morfológicas durante a germinação de sementes de <i>D. regia</i> .	38
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tegumento de <i>Delonix regia</i> sob diferentes tratamentos pré-germinativos.....	39
Figura 7. Ultraestrutura (à esquerda) e microscopia de luz (à direita) do tegumento de <i>Delonix regia</i> , em vista lateral.....	40
Figura 8. Concentração de MDA nas sementes de <i>D. regia</i> submetida aos diferentes tratamentos pré-germinativos.....	41

CAPÍTULO 2

Figura 1. Germinação e desenvolvimento de plântula de <i>Delonix regia</i> do 1° ao 11° dias após a semeadura (DAS).....	
Figura 2. Morfometria e incremento na germinação e desenvolvimento pós-seminal de <i>Delonix regia</i>	59
Figura 3. Análise anatômica do epicótilo, hipocótilo e raiz primária durante o desenvolvimento da plântula de <i>D. regia</i>	60

Figura 4. Análise ultraestrutural da epiderme do cotilédone e eófilos de <i>D. regia</i> durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal.....	61
Figura 5. Alterações no citoplasma das células do mesofilo dos cotilédones de <i>D. regia</i> durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal.....	62
Figura 6. Análise ultraestrutural das células do mesofilo cotiledonar de <i>Delonix regia</i> entre o 1° ao 7° dias após a sementeira (DAS).....	63
Figura 7. Análise da mobilização de reserva nos cotilédones de <i>D. regia</i> , por testes histoquímica, durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal.....	65
Figura 8. Mobilização das reservas dos cotilédones de <i>D. regia</i> durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal.....	66
Figura 9. Análise do consumo de amido durante a germinação até o estabelecimento de plantas jovens de <i>D. regia</i> , do 1° ao 30° DAS.....	67
Figura 10. Modelo esquemático do consumo de amido durante a germinação até o estabelecimento das plantas jovens de <i>D. regia</i>	68
Figura 11. Síntese dos eventos morfológicos e da mobilização de reserva durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal de <i>D. regia</i>	72

CAPÍTULO 3

Figura 1. Porcentagem de germinação de sementes de <i>D. regia</i>	92
Figura 2. Análise do padrão de embebição durante a germinação das sementes de <i>D. regia</i>	93
Figura 3. Determinação da porcentagem de teor de água por base úmida (% b.u.) em sementes de <i>D. regia</i>	94
Figura 4. Concentração de superóxido e peróxido de hidrogênio durante a germinação de sementes de <i>D. regia</i>	94
Figura 5. Atividade das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD) durante a germinação de sementes de <i>D. regia</i>	95
Figura 6. Análise da concentração de malondialdeído durante a germinação de sementes de <i>D. regia</i>	96
Figura 7. Atividade das enzimas α - e β -amilase durante a germinação de sementes de <i>D. regia</i>	97

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

Símbolos / Siglas / Abreviações / Unidades	Significado
µm	Micrômetro
°C	Graus centígrado
%	Porcentagem
ABA.....	Ácido abscísico
APX	Ascorbato peroxidase
AST.....	Açúcares solúveis totais
ANOVA.....	Análise de variância
B.O.D.	Biochemical Oxygen Demand
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CO ₂	Dióxido de carbono
DAS.....	Dias após a sementeira
DNS.....	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EDTA.....	Etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAA 70%	Formaldeído, ácido acético e álcool etílico 70%
FeNH ₄	Sulfato de amônio e ferro(II)
GA.....	Ácido giberélico
GP.....	Ganho de peso
H ₂ O ₂	Peróxido de oxigênio
IF	Instituto de Física
IF Goiano	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano
IVG	Índice de velocidade de germinação
Kv.....	Quilovolt
LabMic	Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução
LME.....	Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural
M.....	Molar
MDA.....	Malondialdeído
MET	Microscopia eletrônica de transmissão

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Massa fresca
Mg.....	Miligrama
mg/g	Miligrama por grama
mg/mL.....	Miligrama por mililitro
mL.....	Mililitro
mm	Milímetro
N.....	Normal
NADPH oxidase.....	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases
NaOH.....	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
$\cdot\text{O}_2$	Oxigênio singlet ou dióxigênio
O_2^-	Ânion Superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxila
OsO_4	Tetróxido de ósmio
PEF.....	Phanerocotylar-epigeal-foliaceous ou fanéreo-epígeo-foliáceo
Pf.....	Peso final
Pi.....	Peso inicial
pH.....	Potencial Hidrogeniônico
PMSF.....	Fluoreto de fenilmetilsulfônico
POX	Peroxidase
PVP.....	Polivinilpirrolidona
p/v.....	Peso por volume
REJ	Regional Jataí
Rpm.....	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TBA.....	Ácido tiobarbitúrico
TCA.....	Ácido tricloroacético
Trx.....	Tiorredoxina
UFLA.....	Universidade Federal de Lavras
UFG	Universidade Federal de Goiás
UV.....	Ultravioleta
Xg.....	vezes gravidade

RESUMO

Delonix regia (Bojer ex Hook.) Raf., pertence à família Fabaceae e subfamília Caesalpinoideae. É uma espécie arbórea nativa do Madagascar e amplamente adaptada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Apresenta importância ornamental, medicinal e industrial. Estudos que elucidam a biologia da germinação de espécies nativas e exóticas podem subsidiar a tecnologia de produção e manejo de mudas, para diversos fins, principalmente na recuperação de áreas naturais degradadas e comerciais. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo, estudar a biologia da germinação de sementes de *D. regia*, com enfoque nos efeitos promovidos pelos diferentes tratamentos de escarificação, análises da morfoanatomia e da mobilização de reservas durante o desenvolvimento pós-seminal e respostas anti-oxidativas na germinação. Sementes foram coletadas do banco de solo e os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente ao acaso. Sementes de *D. regia* apresentam dormência física e diferentes respostas germinativas frente às escarificações térmica, mecânica e química. As escarificações térmica a 90°C por 1 e 3 minutos e a escarificação mecânica com a lixa no lado oposto do embrionário foram os mais eficientes na superação da dormência física. Sementes expostas ao ácido sulfúrico possivelmente tiveram danos nas membranas internas. As plântulas de *D. regia* concluem seu desenvolvimento aos 11° DAS e são do tipo fanéreo-epígeo-cotiledonar. As proteínas e lipídios constituem as reservas iniciais nos cotilédones e são mobilizadas durante o desenvolvimento da plântula. As reservas de amido foram completamente exauridas no 30° DAS e coincidiu com o período em que os cotilédones senesceram. Concentrações de peróxido de hidrogênio e superóxido foram observadas durante toda a germinação das sementes e possivelmente atuaram na sinalização da biossíntese de ácido giberélico. As enzimas catalase, ascorbato peroxidase, peroxidase e superóxido dismutase atuam nas respostas anti-oxidativas, removendo o peróxido de hidrogênio e o superóxido. As enzimas α - e β -amilase apresentam atividade durante a germinação de sementes de *D. regia*, na mobilização das reservas de amido. Conjuntamente, os dados permitem observar que esta espécie, após a superação da dormência física e início da embebição, apresenta um metabolismo que estimula a síntese de hormônios que levam à mobilização de reservas e promovem a formação de novos compostos e energia.

Palavras-chave: mobilização de reservas, plântula, tecnologia de produção de mudas.

ABSTRACT

Delonix regia (Bojer ex Hook.) Raf., belongs to the family Fabaceae and subfamily Caesalpinoideae. It is a tree species native to Madagascar and widely adapted in the tropical and subtropical regions of the world. It presents ornamental, medicinal and industrial importance. Studies that elude the germination biology of native and exotic species can subsidize the seedlings production technology and management, for several purposes, mainly in the degraded natural areas recovery and commercial uses. The aim of this research was to study the *D. regia* seed germination biology, focusing on the effects promoted by different scarification treatments, morphoanatomy and reserve mobilization during post-seminal development and antioxidative responses in the germination. Seeds were collected from the soil bank and the experiments were carried out in a completely randomized design. *D. regia* seeds present physical dormancy and different germinative responses to thermal, mechanical and chemical scarification. Thermal scarring at 90°C for 1 and 3 minutes and mechanical scarification with sandpaper on the opposite side of the embryo were the most efficient in overcoming physical. Seeds exposed to sulfuric acid may have damaged internal membranes. The *D. regia* seedlings conclude their development at 11° DAS and are of the pheneo-epigeno-cotyledon type. Proteins and lipids constitute the initial reserves in the cotyledons and are mobilized during the seedling development. The starch reserves were completely depleted in the 30° DAS and coincided with the period in which the cotyledons had subsided. Concentrations of hydrogen peroxide and superoxide were observed throughout the seed germination and possibly acted on the signaling of gibberellic acid biosynthesis. The enzymes catalase, ascorbate peroxidase, peroxidase and superoxide dismutase act on the anti-oxidative responses, removing hydrogen peroxide and superoxide. The α - and β -amylase enzymes present activity during the *D. regia* seeds germination, in the mobilization of starch reserves mobilization. Together, the data allow us to observe that this species, after overcoming physical numbness and beginning of imbibition, presents a rapid metabolism that stimulates the hormones synthesis that stimulate the reserves mobilization and promote the formation of new compounds and energy.

Keywords: reserves mobilization, seedling, seedling production technology.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os estudos morfológicos, anatômicos, fisiológicos e bioquímicos de sementes e plântulas podem auxiliar na compreensão da biologia da germinação e desenvolvimento pós-seminal de espécies florestais nativas e exóticas. Dessa forma, estes dados podem subsidiar pesquisas taxonômicas, a compreensão de mecanismos de dormência, dispersão e sucessão, além da interpretação dos testes realizados na fisiologia de sementes em laboratório e do reconhecimento das espécies em bancos de sementes do solo e de plântulas em formações florestais (MELO et al., 2004; LOUREIRO et al., 2013).

Delonix regia (Bojer ex. Hook.) Raf. é uma espécie florestal exótica, conhecida como popularmente como flamboyant ou poinciana. pertence à família Fabaceae e subfamília Caesalpinoideae (WANG et al., 2016). Nativa do Madagascar, foi introduzida por todo o mundo (RIVERS, 2014) e amplamente utilizada como ornamental em áreas tropicais, tais como Taiwan, Índia, Vietnam, Malásia e região central da América do Sul (WANG et al., 2016), devido a suas densas folhagens e exuberantes flores (ADEWUYI et al., 2010; TAMAKI et al., 2010). Extratos das folhas e cascas de *D. regia* apresentam antocianina, carotenoides, flavonoides e fenóis (ADJÉ et al., 2010; VEIGAS et al., 2012), que são usadas na medicina tradicional principalmente na Índia, por apresentar atividades anti-inflamatórias (SHEWALE et al., 2012), antioxidantes (CHAI et al., 2012) e antimicrobiana (SALEM et al., 2014). Galactomananas são extraídas das sementes de *D. regia*, como matéria-prima na indústria farmacêutica, na produção de cápsulas que revestem drogas, e na alimentícia, com propriedades espessantes (TAMAKI et al., 2010; BETANCUR-ANCONA et al., 2011).

D. regia é uma espécie arbórea decídua, de 5 a 20 metros de altura, com flores de coloração vermelha a alaranjada que recobrem a copa de folhas (ADEWUYI et al., 2010; BARNABY et al., 2016) (Figura 1A). As folhas são alternas, bipenadas e recompostas, com 10 a 20 pares de foliólulos e as flores de coloração vermelha brilhante, possuem de 8 a 11 cm de diâmetro e uma pétala superior maior e distinta, com coloração amarelada (Figura 1B) e o florescimento ocorre entre os meses de setembro a janeiro. *D. regia* apresenta vagens, de 30 a 50 cm de comprimento (DU PUY et al., 1995), que caem gradualmente após a maturação (figura 1C) e são usadas

como matéria-prima para a produção de carvão ativado (VARGAS et al., 2011). As sementes apresentam coloração marrom-claro (figura 1D), são ortodoxas e apresentam dormência física (ATAÍDE et al., 2013; JAGANATHAN et al., 2013; JAYASURIYA et al., 2013). A dormência física presente nas sementes de *D. regia* dificulta a germinação e propagação desta espécie no meio nativo é difícil, devido à dormência física das sementes, que dificulta a germinação e a propagação no meio nativo (STEBBINS, 1999).



Figura 1. *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. A – Aspecto geral da árvore; B – Detalhe da flor (barra = 2 cm); C – Fruto tipo legume (vagem) maduro aberto (barra = 5 cm); D – Sementes no banco de solo (barra = 1,5 cm). Fonte: arquivo pessoal da autora.

A dormência de sementes é um estado fisiológico em que as sementes não germinam mesmo quando em condições adequadas de água, luz, temperatura e oxigênio

(BASKIN E BASKIN, 2003; BASKIN E BASKIN, 2004; EINALI e VALIZADEH, 2017). A dormência é uma importante estratégia que garante que as espécies dispersem novos indivíduos ao longo de um espaço de tempo, por permitir com que as sementes germinem sob condições ambientais adequadas (KOS et al., 2012; NONOGAKI, 2014; HOYLE et al. 2016). Assim, a dormência de sementes garante a sobrevivência, dispersão e persistência das sementes no solo além de determinar a composição e a dinâmica da comunidade vegetal e subsidiar a compreensão de aspectos biológicos das plantas (PAULSEN et al., 2013). Entretanto, a dormência de sementes ocasiona problemas na produção de mudas de espécies nativas e cultivadas e dessa forma, métodos devem ser aplicados para superação a fim de elevar a taxa de germinação das sementes (PEREIRA et al., 2016).

Nas sementes, a origem da dormência pode ser primária e/ou secundária. A dormência primária ocorre durante o desenvolvimento e maturação das sementes, enquanto que na dormência secundária, as sementes ao serem maduras e dispersas da planta-mãe percebem sinais desfavoráveis do ambiente e então, tornam-se dormentes (BASKIN e BASKIN, 2004). Dentre esses tipos de origem da dormência de sementes, há cinco classes de dormência conforme as causas envolvidas de acordo com Baskin e Baskin (2003) (quadro 1).

Quadro 1. Classes da dormência de sementes (modificado de Nikolaeva, 1977 e Baskin e Baskin, 1998)	
Classe da dormência	Causa(s) da dormência
Fisiológica	Baixo desenvolvimento do embrião, devido à resistência do tegumento ou envoltórios que impede o potencial crescimento do embrião
Morfológica	Embrião indiferenciado ou subdesenvolvido e que necessita de um tempo para concluir seu desenvolvimento após dispersão das sementes, para que possam germinar
Morfofisiológica	Combinação do embrião subdesenvolvido ou indiferenciado e embrião fisiologicamente dormente
Física	Semente (ou fruto) revestida(o) por camada(s) de células em paliçada, impermeável à água.
Combinada (física + fisiológica)	Semente (ou fruto) revestida por camada impermeável à água e embrião fisiologicamente dormente

(BASKIN e BASKIN, 2003)

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dormência física de sementes

A dormência física ocorre em aproximadamente 15 famílias das Angiospermas, sendo elas: Anacardiaceae, Bombacaceae, Cannaceae, Cistaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Geraniaceae, Fabaceae (incluindo as três subfamílias Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae), Malvaceae, Musaceae, Nelumbonaceae, Rhamanaceae, Sapindaceae, Sterculiaceae e Tiliaceae (BASKIN et al., 2000).

A dormência física é causada pela presença de uma ou mais camadas de macroesclereídeos lignificados e dispostos em paliçada, denominadas células malpighianas, no tegumento das sementes (BASKIN et al., 2000; BASKIN, 2003; BASKIN e BASKIN, 2003; BASKIN e BASKIN, 2004; RODRIGUES-JÚNIOR et al., 2014). As células malpighianas tornam o tegumento impermeável à água, pois são revestidas por substâncias hidrofóbicas (GEISLER et al., 2017). A natureza destas substâncias é diversificada entre as espécies e em geral, constitui a suberina, lignina e calose (KELLY et al., 1992; JAYASURIYA et al., 2007). Além da impermeabilidade à água, estas substâncias presentes no tegumento das sementes com dormência física constituem defesas químicas contra predadores, patógenos e microrganismos, favorecendo assim, a formação do banco de sementes no solo (DALLING et al., 2011).

Em diferentes ecossistemas do mundo, bancos de sementes no solo são formados por sementes com dormência física de espécies arbóreas pioneiras (DALLING et al., 2011; ZAMALEA et al., 2015). O banco de sementes no solo constitui uma forma de estocar sementes viáveis no solo e é importante de manutenção da diversidade ecológica em ecossistemas naturais (SAVADOGO et al., 2016). Investigar fatores envolvidos na superação da dormência física das sementes é importante para conhecer a reprodução destas espécies pioneiras com o intuito de regenerá-las e, conseqüentemente, atuar na recuperação de ambientes naturais degradados (DALLING et al., 1998; HONNAY et al., 2008; DOUH et al., 2018).

A dormência física de sementes é superada em condições naturais (altas temperaturas, secas e queimadas, resfriamento/descongelamento e passagem pelo trato digestivo de animais são fatores naturais que atuam na superação de dormência física de sementes) e artificiais (escarificações mecânica, física e química) (BASKIN e BASKIN, 1998; BASKIN et al., 2000; BASKIN e BASKIN, 2003; BASKIN e BASKIN, 2004).

Estas condições promovem um ponto de abertura (“water gap”) de uma estrutura anatômica especializada no tegumento das sementes que permite a entrada de água (BASKIN et al., 2000; BASKIN e BASKIN, 2003; GAMA-ARACHCHIGE et al., 2013; JAGANATHAN et al., 2016). Conhecer os fatores ambientais envolvidos que favoreçam o ponto de abertura do tegumento de sementes com dormência física, pode explicar como ocorre a germinação em condições naturais (GAMA-ARACHCHIGE et al., 2013).

Na maioria das espécies da família Fabaceae, a abertura para a entrada de água nas sementes ocorre um ponto de abertura no estrofiolo, que é uma estrutura primária de abertura (JAYASURIYA et al., 2012; GAMA-ARACHCHIGE et al., 2013; HUDSON et al., 2015), como em ocorre em sementes de *Delonix regia* (JAGANATHAN et al., 2016) e *Senna multifuga* (RODRIGUES-JÚNIOR et al., 2014). O estrofiolo se fecha quando a semente atinge a maturidade (figura 2A e B) e abre em resposta para algum sinal ambiental, como altas temperaturas, por exemplo. Para isso, os macroesclereídeos se afastam da região do estrofiolo, para o ponto de abertura em que a água entra na semente (figura 2C) (BASKIN, 2003).

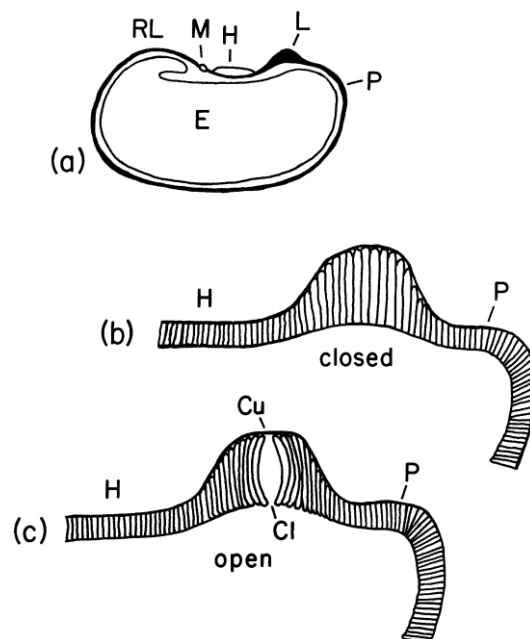


Figura 2. Secção longitudinal representativa da semente de espécie da família Fabaceae, subfamília Papilionoideae. A - aspecto geral; B - detalhe da região da semente demonstrando o estrofiolo fechado; C - detalhe da porção da semente demonstrando o estrofiolo aberto. Cl – fenda; Cu – cutícula; E - embrião; H – hilo; L – estrofiolo; M – micrópila; P – camada impermeável de células em paliçada do tegumento; RL – radícula (BASKIN, 2003).

Quando ocorre a formação deste ponto de abertura, o estrofiolo não pode mais se fechar e a germinação se inicia imediatamente se tiver disponibilidade de água, luz e

oxigênio, exceto para as sementes que apresentam dormência combinada: dormência física + fisiológica (BASKIN e BASKIN, 2004). Outras estruturas, como o hilo, atuam como o ponto de abertura para a entrada da água, assim, o estrofiolo serve como estrutura secundária de abertura, como em sementes de *Sophora alopecuroides* (HU et al., 2008), *Peltophorum dubium*, *Mimosa bimucronata* (GEISLER et al., 2017), *Dimorphandra exaltata* e *D. wilsonii* (MATHEUS et al., 2017).

A estrutura primária e secundária do ponto de abertura em sementes com dormência física é coletivamente denominada de “complexo de ponto de abertura”. O termo “ponto de abertura” refere-se apenas à abertura primária no tegumento das sementes durante a superação da dormência (GAMA-ARACHCHIGE et al., 2013). Conforme o tipo de abertura que se desenvolve, o complexo do ponto de abertura pode ser classificado em três tipos: tipo I, ponto de abertura com a abertura estreita e linear coberta por células em paliçada alongadas; tipo II, o ponto de abertura é circular ou estreita coberta por estrutura similar a uma tampa formada pelas células em paliçada e tipo III, o ponto de abertura apresenta abertura estreita ou circular coberta por estrutura semelhante a uma tomada formada pelas células esclerenquimáticas (GAMA-ARACHCHIGE et al., 2013).

2.2. Morfologia interna das sementes pela análise em raios X

Condições ambientais desfavoráveis como altas temperaturas, escassez ou excesso de água e doenças podem afetar o metabolismo das plantas que comprometem a formação das sementes e, conseqüentemente, reduzem a germinação e o vigor (SILVA et al., 2012). O uso dos raios X em sementes florestais tem auxiliado nas análises da qualidade fisiológica, por serem comumente alvos de predação, de injúrias, má-formação estrutural e do embrião, que podem ocasionar danos na germinação (OLIVEIRA et al., 2003; MASETTO et al., 2007; SILVA et al., 2012). As injúrias mecânicas ocasionadas durante o beneficiamento e a infestação por insetos nas sementes são de difícil observação, porém são facilmente detectadas pelas radiografias (OLIVEIRA et al., 2004).

O estudo da morfologia interna, por meio de raios X, foi primeiramente utilizado por Simak e Gustafsson em 1953, para sementes de *Pinus sylvestris* L. (PUPIM et al., 2008; AMARAL et al., 2011; KOBORI et al., 2012). Os raios X é uma técnica promissora para a análise da qualidade fisiológica de sementes indicada pela ISTA –

“International Seed Testing Association” - desde a década de 1980 (ISTA, 2009) e desde então, vêm sendo aprimorado para o estudo de sementes de diversas espécies cultivadas e florestais (PUPIM et al., 2008).

Os raios X constituem um método simples, não destrutivo, eficiente e rápido para a análise da morfologia interna das sementes, por permitir visualizar as partes das sementes, identificando o grau de maturação e as alterações (PINTO et al., 2009; BELIN et al., 2011). Por não ser destrutivo, é possível aliar as condições físicas das sementes observadas nas análises em raios X com testes de germinação e vigor, permitindo obter vários parâmetros da qualidade fisiológica das sementes (TONETTI et al., 2006; ARRUDA et al., 2016).

A técnica tem como princípio a absorção de raios X em diferentes intensidades pelos vários tecidos das sementes, que apresentam espessuras, densidades e composição distintas, além do comprimento de onda da radiação (BINO et al., 1993). As sementes são postas entre um filme fotossensível e uma fonte de baixa energia de raios X. Quando as sementes são expostas à radiação, os raios X a atravessam e atingem o filme, é gerada uma imagem com áreas mais escuras, e os raios X penetraram com maior facilidade em áreas mais claras, que correspondem as partes mais densas da semente (ISTA, 2009).

Diante da importância de reflorestamento de áreas nativas devastadas e conservação de espécies florestais nativas em forma *ex situ*, a avaliação da qualidade fisiológica de sementes faz-se necessário para aprimorar a propagação das espécies de maneira bem-sucedida (MASETTO et al., 2007).

2.3. Germinação, mobilização de reservas e desenvolvimento pós-seminal

A germinação das sementes se inicia com a embebição e culmina com a protrusão da radícula (BEWLEY, 1997; NONOGAKI et al., 2010). Fisiologicamente, a germinação é um evento complexo em que ocorrem muitas atividades moleculares, metabólicas e celulares (BAILLY, 2004). A germinação é dividida em três fases: fase I ou inicial, em que se inicia com a embebição; fase II ou estacionária, com baixa embebição, mas alta atividade metabólica e fase III, que termina com a protrusão da radícula (BEWLEY, 1997; NONOGAKI et al., 2010). A entrada de água nas sementes ortodoxas durante a fase I resulta no reestabelecimento da conformação das membranas celulares. Após o início da embebição, há a retomada do metabolismo, em que enzimas

presentes na semente reassumem suas funções, com aumento do consumo de oxigênio e da atividade respiratória (BEWLEY, 1997).

Consequentemente há retomada do metabolismo, há ativação de síntese proteica que induz a produção de enzima hidrolíticas, que promovem a mobilização das reservas (BEWLEY, 1997; DANTAS et al., 2008; NONOGAKI et al., 2010). que constituem a fonte heterotrófica de energia (GALLARDO et al., 2008). Os constituintes de reservas são principalmente as proteínas, lipídeos e carboidratos, sintetizados e acumulados nos cotilédones e/ou endosperma durante o desenvolvimento e maturação fisiológica das sementes (BEWLEY, 1997; REN et al., 2007; GALLARDO et al., 2008; SORIANO et al., 2011). As reservas devem estar presentes nas sementes em quantidade suficiente para que as plântulas se desenvolvam e estabeleçam (SANTOS e BUCKERIDGE, 2004; MENA-ALÍ e ROCHA, 2005).

Com o início da germinação, há ativação de síntese proteica que induz a produção de enzima hidrolíticas, que promovem a mobilização das reservas (BEWLEY, 1997; DANTAS et al., 2008; NONOGAKI et al., 2010). As proteínas armazenadas nas reservas das sementes são clivadas em aminoácidos livres para a biossíntese de outras proteínas e compostos nitrogenados (TAN-WILSON e WILSON, 2012). Os corpos lipídicos presentes nas reservas de sementes contêm triacilgliceróis, que são mobilizados por intermédio da beta-oxidação dos ácidos graxos e ciclo do glioxilato, via gliconeogênese para a síntese de amido (DOMAN et al., 1982; HUANG, 1994; ROCHA et al., 2012; MA et al., 2016). O amido fornece glicose para suprir o carbono na constituição das membranas e paredes celulares durante o crescimento do embrião na germinação (KLERK et al., 1986; MAGALHÃES et al., 2010).

O estudo dos aspectos biológicos da germinação e do desenvolvimento das plântulas de espécies florestais podem fornecer informações para a interpretação de testes de vigor e da qualidade fisiológica das sementes (SILVA e MÔRO, 2009), subsidiar estudos taxonômicos (ABOZEID et al., 2017) e na compreensão das estratégias fisiológicas e ecológicas das espécies, tais como mecanismos de dispersão, sucessão e regeneração natural (SILVA e MÔRO, 2008; Soriano et al., 2011; SILVA et al. 2015; DUARTE et al., 2016; PAULA et al., 2016). Além disso, conhecer as reservas presentes nas sementes destas espécies podem esclarecer como ocorre a permanência das sementes no banco de solo e sua susceptibilidade à predação (RAIJOU e DEBEAUJON, 2008).

2.4. Produção de espécies reativas de oxigênio durante a germinação

Nas sementes, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são comumente reconhecidas por ocasionar danos às membranas e constituintes celulares (MOOTHOO-PADAYACHIE et al., 2016). As EROs podem reagir com os lipídios, DNA e proteínas. No caso das proteínas, a oxidação pode desencadear modificações de suas propriedades ligantes e enzimáticas e levar a diversas alterações funcionais (ORACZ et al., 2007; RAIJOU e DEBEAUJON, 2008). As EROs são produtos formados ao longo de vários processos fisiológicos, como a fotossíntese e fotorrespiração, por exemplo (RECALDE et al., 2018). Além disso, também atuam nas vias de sinalização, durante o desenvolvimento das plantas, em resposta às reações fisiológicas e sinais ambientais (SUZUKI et al., 2011).

As EROs são o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), peróxido de oxigênio (H_2O_2) e superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) formados a partir de um, dois ou três elétrons transferidos para o dióxigênio (O_2) e são subprodutos tóxicos de vários processos do metabolismo que consomem O_2 celular, como por exemplo, a cadeia transportadora de elétrons (SCHOPHER et al., 2001; MORCHER et al., 2015). Geralmente, a produção das EROs é intracelular e ocorre nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (FARNESE et al., 2016).

Para se protegerem contra os danos ocasionados pelas EROs, as sementes apresentam mecanismos não enzimáticos e enzimáticos (BAILLY, 2004; SHARMA et al., 2018). Entre esses compostos antioxidantes não enzimáticos podem citar o α -tocoferol (YANG et al., 2001; SIMONTACCHI et al., 2003), os flavonoides e fenóis (YANG et al., 2001) e os carotenoides e o ácido ascórbico (SHARMA et al., 2018) e as enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APO) e glutathione redutase (GR) (PUKACKA e RATAJCZAK, 2005; SHARMA et al., 2018).

Apesar dos efeitos danosos, as EROs também atuam como mensageiros secundários ao enviar sinais para as vias de transdução, que controlam diversos processos tais como o crescimento e desenvolvimento das plantas, respostas ao estresse e morte celular programada (GECHEV et al., 2006; KRANNER et al., 2010). Durante o processo de germinação, na fase estacionária ocorre maior produção de EROs (BAILLY, 2004; BOGDANOVIĆ et al., 2008), que estimulam diversos processos bioquímicos e fisiológicos durante a germinação de sementes, como a produção de

ácido giberélico (YE et al., 2012). No entanto, ainda são desconhecidos os locais em que as EROs são formadas durante a germinação. Bailly (2004) ressalta que o eixo embrionário, tegumento e camada de aleurona são possíveis locais de síntese. A produção extracelular de EROs levam ao enfraquecimento das paredes celulares e promovem a alongação celular durante a germinação de sementes (MÜLLER et al., 2009). Kranner et al (2010) observaram que durante a germinação de *Pisum sativum*, as EROs eram produzidas no embrião, principalmente na radícula. Estes autores verificaram ainda que o peróxido de hidrogênio, dióxigênio e hidroxila atuavam no crescimento e diferenciação, desenvolvimento de pelos radiculares e enfraquecimento das paredes das células no eixo hipocótilo-radícula para a alongação celular, respectivamente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Objetivou-se estudar a biologia da germinação e desenvolvimento pós-seminal de *Delonix regia* (Bojer ex. Hook) Raf. sob os aspectos fisiológicos, morfoanatômicos e bioquímicos.

3.2. Objetivos Específicos

- Ampliar os conhecimentos acerca da germinação de sementes de *D. regia*, quanto à superação de dormência física, morfologia interna das sementes pelo uso da técnica de raios X, comportamento de embebição, teor de água e alterações estruturais no tegumento sob diferentes tratamentos pré-germinativos;
- Caracterizar a morfoanatomia na germinação e desenvolvimento das plântulas de *D. regia*;
- Identificar a mobilização das reservas de *D. regia* durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal, sob aspectos histoquímicos e bioquímicos;
- Compreender as respostas antioxidativas quanto à produção de espécies reativas de oxigênio, de enzimas antioxidativas e das enzimas que atuam na mobilização de reservas na germinação de sementes de *D. regia*;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOZEID, A.; TURKI, Z.; EL-SHAYEB, F.; TANG, Z. Embryo and seedling morphology of some *Trigonella* L. species (Fabaceae) and their taxonomic importance. *Flora*. 230: 57–65. 2017. Doi: 10.1016/j.flora.2017.02.026.
- ADJÉ, F.; LOZANO, Y.F.; LOZANO, P.; ADIMA, A.; CHEMAT, F.; GAYDOU, E.M. Optimization of anthocyanin, flavonol, and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. *Industrial Crops Products*. 32(3): 439-444. 2010. Doi: 10.1016/j.indcrop.2010.06.011.
- ADEWUYI, A.; ODERINDE, R.A.; RAO, B.V.S.K.; PRASAD, R.B.N.; ANJANEYULU, B. Chemical component and fatty acid distribution of *Delonix regia* and *Peltophorum pterocarpum* seed oils. *Food Science and Technology Research*. 16(6): 565 – 570. 2010. Doi: 10.3136/fstr.16.565.
- AMARAL, J.B.; MARTINS, L.; FORTI, V.A.; CÍCERO, S.M.; MARCOS FILHO, J. X-ray test to evaluate the physiological potential of *Tabebuia heptaphylla* seeds. *Revista Brasileira de Sementes*. 33(4): 601-607. 2011. Doi: 10.1590/S0101-31222011000400001
- ARRUDA, N.; CÍCERO, S.M.; GOMES JÚNIOR, F.G. Radiographic analysis to assess the seed structure of *Crotalaria juncea* L. *Journal of Seed Science*. 38(2): 1-8. 2016. Doi: 10.1590/2317-1545v38n2155116.
- ATAÍDE, G.M.; BICALHO, E.M.; DIAS, D.C.F.S.; CASTRO, R.V.O.; ALVARENGA, E.M. Overcoming seed dormancy of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. *Revista Árvore*. 37(6): 1145-1152. 2013. Doi: 10.1590/S0100-67622013000600016.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*. 14: 93–107. 2004. Doi: 10.1079/SSR2004159.
- BARNABY, A.G.; REID, R.; RATTRAY, V.; WILLIAMS, R.; DENNY, M. Characterization of Jamaican *Delonix regia* and *Cassia fistula* Seed Extracts. *Biochemistry Research International*. 1-8. 2016. Doi: 10.1155/2016/3850102.
- BASKIN, C.C. Breaking physical dormancy in seeds – focussing on the lens. *New Phytologist*. 150(2): 229-232. 2003. Doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00751.x.

- BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C.; LI, X. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*. 15: 139-152. 2000. Doi: 10.1046/j.1442-1984.2000.00034.x.
- BASKIN J.M., BASKIN C.C. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. 14: 1-6. 2004. Doi: 10.1079/SSR2003150.
- BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. Classification, biogeography and phylogenetic relationships of seed dormancy. Pp. 518-544. *In*: Smith, R.D.; Dickie, J.B.; Linington, S.H.; Pritchard, H.W.; Probert, R.J. *Seed conservation: turning science into practice*. London: The Royal Botanic Gardens, Kew. 1023 pp. 2003.
- BELIN, E.; ROUSSEAU, D.; LÉCHAPPÉ, J.; LANGLOIS-MEURINNE, M.; DÜRR, C. Rate-distortion tradeoff to optimize high-throughput phenotyping systems. Application to X-ray images of seeds. *Computers and Electronics in Agriculture*. 77: 188-194. 2011. Doi: 10.1016/j.compag.2011.05.002.
- BETANCUR-ANCONA, D.; PACHECO-AGUIRRE, J.; CASTELLHANOS-RUELAS, A.; CHEL-GUERREIRO, L. Microencapsulation of papain using carboxymethylated flamboyant (*Delonix regia*) seed gum. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 12: 67-72. 2011. Doi: 10.1016/j.ifset.2010.11.002.
- BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9: 1055-1066. 1999. Doi: 10.1105/tpc.9.7.1055.
- BINO, R.J.; AARTSE, J.W.; BURG, W.J. Non-destructive X-ray of Arabidopsis embryo mutants. *Seed Science Research*. 3(3): 167-170. 1993. Doi: 10.1017/S0960258500001744.
- BOGDANOVIĆ, J.; RADOTIĆ, K.; MITROVIĆ, A. Changes in activities of antioxidant enzymes during *Chenopodium murale* seed germination. *Biologia Plantarum*. 52(2): 396-400. 2008. Doi: 10.1007/s10535-008-0083-7.
- CHAI, W.M.; SHI, Y.; FENG, H.L.; QIU, L.; ZHOU, H.C.; DENG, Z.W.; YAN, C.L.; CHEN, Q.X. NMR, HPLC-ESI-MS, and MALDI-TOF MS analysed of condensed tannins from *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. and their bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 5013-5022. 2012. Doi: 10.1021/jf300740d.

- DALLING, J.W.; SWAINE, M.D.; GARWOOD, N.C. Dispersal patterns and seed bank dynamics of pioneer tree species in moist tropical forest, Panama. *Ecology*. 79: 564–578. 1998. Doi: 10.1890/0012-9658(1998)079[0564:DPASBD]2.0.CO;2.
- DALLING, J.W.; DAVIS, A.S.; SCHUTTE, B.J.; ARNOLD, A.E. Seed survival in soil: interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. *Journal of Ecology*. 99(1): 89–95. 2011. Doi: 10.1111/j.1365-2745.2010.01739.x.
- DANTAS, B.F.; CORREIA, J.S.; MARINHO, L.B.; ARAGÃO, C.A. Biochemical changes during imbibition of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. seeds. *Revista Brasileira de Sementes*. 30(1): 221-227, 2008. Doi: 10.1590/S0101-31222008000100028.
- DOMAN, D.C.; WALKER, J.C.; TRELEASE, R.N.; MOORE, B.D. Metabolism of carbohydrate and lipid reserves. *Planta*. 155:502-510. 1982. Doi: 10.1007/BF01607574.
- DOUH, C.; DAINOUB, K.; LOUMETOC, J.J.; MOUTSAMBOTEC, J.M.; FAYOLLEA, A.; TOSSOB, F.; FORNIF, E.; FLEURYF, S.G.; DOUCETA, J.L. Soil seed bank characteristics in two central African forest types and implications for forest restoration. *Forest Ecology and Management*. 409: 766–776. 2018. Doi: 1016/j.foreco.2017.12.012.
- DU PUY, D.J.; PHILLIPSON, P.P.; RABEVOHITRA, R. The genus *Delonix* (Leguminosae: Caesalpinoideae: Caesalpinieae) in Madagascar. *Kew Bulletin*. 50: 445-475. 1995. Doi: 10.2307/4110322.
- DUARTE, M.M.; PAULA, S.R.P.; FERREIRA, F.R.L.; NOGUEIRA, A.C. Morphological characterization of fruit, seed and seedling and germination of *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae) ('Jatobá'). *Journal of Seed Science*. 38(3): 204-211. 2016. Doi: 10.1590/2317-1545v38n3159734.
- EINALI, A.; VALIZADEH, J. Storage reserve mobilization, gluconeogenesis, and oxidative pattern in dormant pistachio (*Pistacia vera* L.) seeds during cold stratification. *Trees*. 31(2): 659-671. 2017. Doi 10.1007/s00468-016-1498-y.
- FARNESE, F.S.; MENEZES-SILVA, P.E.; GUSMAN, G.S.; OLIVEIRA, J.A. When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Sciences*. 7: 471. 2016. Doi: 10.3389/fpls.2016.00471.

- GALLARDO, K.; THOMPSON, R.; BURSTIN, J. Reserve accumulation in legume seeds. *Compte Rendues Biologiques*. 331(10): 755–762. 2008. Doi: 10.1016/j.crv.2008.07.017
- GAMA-ARACHCHIGE, N.S.; BASKIN, J.M.; GENEVE, R.L.; BASKIN, C.C. Identification and characterization of ten new water gaps in seeds and fruits with physical dormancy and classification of water-gap complexes. *Annals of Botany*. 112: 69–84. 2013. Doi: 10.1093/aob/mct094.
- 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*. 47: 56–62. 2009. Doi: 10.1016/j.plaphy.2008.09.003.
- GECHEV, T.S.; VAN BREUSEGEM, F.; STONE, J.M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*. 28: 1091–101. 2006. Doi: 10.1002/bies.20493.
- GEISLER, G.E.; PINTO, T.T.; SANTOS, M.; PAULILO, M.T.S. Seed structures in water uptake, dormancy release, and germination of two tropical forest Fabaceae species with physically dormant seeds. *Brazilian Journal of Botany*. 40(1): 67-77. 2017. Doi: 10.1007/s40415-016-0334-3.
- HONNAY, O.; BOSSUYT, B.; JACQUEMYN, H.; SHIMONO, A.; UCHIYAMA, K. Can a seed bank maintain the genetic variation in the above ground plant population? *Oikos*. 117: 1-5. 2008. Doi: 10.1111/j.2007.0030-1299.16188.x.
- HOYLE, G.L.; STEADMAN, K.; GOOD, R.B.; MCINTOSH, E.; GALEA, L.M.E.; NICOTRA, A.B. Seed germination strategies: an evolutionary trajectory independent of vegetative functional traits. *Frontiers in Plant Science*. 6: 1-13. 2015. Doi: 10.3389/fpls.2015.00731.
- HU, X.W.; WANG, Y.R.; WU, Y.P.; NAN, Z.B.; BASKIN, C.C. Role of the lens in physical dormancy in seeds of *Sophora alopecuroides* L. (Fabaceae) from north-west China. *Australian Journal of Agricultural Research*. 59: 491-497. 2008. Doi: 10.1071/AR07265.
- HUANG, A.H.C. Structure of plant seed oil bodies. *Current Opinion of Structural Biology*. 4: 493-498. 1994. Doi: 10.1016/S0959-440X(94)90210-0.

- HUDSON, A.R.; AYRE, D.J.; OOI, M.K.J. Physical dormancy in a changing climate. *Seed Science Research*. 1: 1-16. 2015. Doi: 10.1017/S0960258514000403.
- ISTA - International Rules For Seed Testing. *Seed Science and Technology*, Zurich. 50th edition. 2009.
- JAGANATHAN, G.K.; WU, G.R.; HAN, Y.Y.; LIU, B.L. Role of the lens in controlling physical dormancy break and germination of *Delonix regia* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *Plant Biology*. 19(1) :53-60. 2016. Doi: 10/111/plb.12451.
- JAYASURIYA, K.M.G.; BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C.; FERNANDO, M.R.T. Variation in seed dormancy and storage behavior of three liana species of *Derris* (Fabaceae, Faboideae) in Sri Lanka and ecological implications. *Research Journal of Seed Science*. 5: 1-18. 2012. Doi: 10.3923/rjss.2012.1.18.
- JAYASURIYA, K.M.G.; WIJETUNGA, A.S.T.B.; BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. Seed dormancy and storage behaviour in tropical Fabaceae: a study of 100 species from Sri Lanka. *Seed Science Research* 23(04): 257-269. 2013. Doi: 10.1017/S0960258513000214.
- JOSÉ, A.C.; DAVIDE, A.C.; OLIVEIRA, S.L. Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) seedling production for recuperating bauxite mined areas. *Cerne*. 11(2): 187-196. 2005.
- KELLY, K.M.; VAN STADEN, J.; BELL, W.E. Seed coat structure and dormancy. *Plant Growth Regulation*. 11: 201-209. 1992. Doi: 10.1007/BF00024559.
- KLERK, G.J.; WILLEKENS, P.; KOK, H.; JACOBSEN, J.V. Amylolytic activity in germinated *Agrostemma githago* L. seeds. *Planta*. 168: 77- 83. 1986. Doi: 10.1007/BF00407012.
- KRANNER, I.; ROACH, T.; BECKETT, R.P.; WHITAKER, C.; MINIBAYEVA, F.V. Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology* 167: 805–811. 2010. Doi: 10.1016/j.jplph.2010.01.019.

- KOBORI, N.N.; CÍCERO, S.M.; MEDINA, P.F. X-Ray test to evaluate castor bean seed quality. *Revista Brasileira de Sementes*. 34(1): 125-133. 2012. Doi: 10.1590/S0101-31222012000100016.
- KOS, M.; BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. Relationship of kinds of seed dormancy with habitat and life history in the Southern Kalahari flora. *Journal of Vegetation Science* 23: 869–879. 2012. Doi: 10.1111/j.1654-1103.2012.01415.x.
- LOUREIRO, M.B.; TELES, C.A.S.; VIRGENS, I.O.; ARAÚJO, B.R.N.; FERNANDEZ, L.G.; CASTRO, R.D. Morphology, anatomy and physiological aspects of seeds and seedlings of *Amburana cearensis* (Fr. All.) A.C. Smith (Leguminosae-Papilionoideae). *Revista Árvore*. 37(4): 679-689. 2013. Doi: 10.1590/S0100-67622013000400011.
- MA, Z; MARSOLAIS, F; BERNARDS, M.A.; SUMARAH, M.W.; BYKOVA, N.V.; IGAMBERDIEV, A.U. Glyoxylate cycle and metabolism of organic acids in the scutellum of barley seeds during germination. *Plant Science*. 248: 37-44. 2016. Doi: 10.1016/j.plantsci.2016.04.007.
- MAGALHÃES, S.R.; BORGES, E.E.L.; BERGER, A.P.A. Seed reserve mobilization in the embryonic axis and cotyledons of *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake during the germination. *Ciência Florestal*. 20(4): 589-595. 2010. Doi: 10.5902/198050982417 .
- MASETTO, T.E.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A.; FARIA, J.M.R. Evaluation of seed quality in *Eugenia pleurantha* - (Myrtaceae) by x-ray test. *Revista Brasileira de Sementes*.29(3): 170-174. 2007.
- MATHEUS, M.T.; RODRIGUES-JÚNIOR, A.G.; OLIVEIRA, D.M.T.; GARCIA, Q.S. Seed longevity and physical dormancy break of two endemic species of *Dimorphandra* from Brazilian biodiversity hotspots. *Seed Science Research*. 27: 199-205. 2017. Doi: 10.1017/S0960258517000204.
- MELO, M.G.G.; MENDONÇA, M.S.; MENDES, A.M.S. Morphological analysis of seeds, germination, and seedlings of jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae–Caesalpinoideae). *Acta Amazonica*. 34(1): 9-14. 2004. Doi: 10.1590/S0044-59672004000100002.

- MELO, M.G.G., MENDONÇA, M.S.; NAZÁRIO, P.; MENDES, A.M.S. Dormancy in seeds of three *Parkia* species. *Revista Brasileira de Sementes*. 33(3): 533-542. 2011. Doi: 10.1590/S0101-31222011000300016.
- MENA-ALÍ, J.I.; ROCHA, O.J. Selective seed abortion affects the performance of the offspring in *Bauhinia unguolata*. *Annals of Botany*. 95: 1017–1023, 2005. doi:10.1093/aob/mci109
- MOOTHOO-PADAYACHIE, A.; VARGHESE, B.; PAMMENTER, N. W.; GOVENDER, P.; SERSHEN. Germination associated ROS production and glutathione redox capacity in two recalcitrant-seeded species differing in seed longevity. *Botany*. 94: 1103–1114. 2016. Doi: 10.1139/cjb-2016-0130.
- MORSCHER, F.; KRANNER, I.; ARC, E.; BAILLY, C.; ROACH, T. Glutathione redox state, tocochromanols, fatty acids, antioxidant enzymes and protein carbonylation in sunflower seed embryos associated with after-ripening and ageing. *Annals of Botany*. 116: 669–678. 2015. Doi:10.1093/aob/mcv108.
- MÜLLER, K.; LINKIES, A.; VREEBURG, R.A.M.; FRY, S.C.; KRIEGER-LISZKAY, A.; LEUBNER-METZGER, G. *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*. 150(4): 1855–1865. 2009. Doi: 10.1104/pp.109.139204.
- NIKOLAEVA, M.G. Factors controlling the seed dormancy pattern. pp. 51–74. *In: Khan, A.A. (Ed.) The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Amsterdam, North-Holland. 1977.
- NONOGAKI, H. Seed dormancy and germination – emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontier in Plant Science*. 5: 233. 2014. Doi: 10.3389/fpls.2014.00233.
- NONOGAKI, H.; BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D. Germination – Still a mystery. *Plant Science*. 179: 574–581. 2010. Doi:10.1016/j.plantsci.2010.02.010.
- OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A.C. Utilizing x-ray tests to evaluate the quality of canafistula seeds (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). *Revista Brasileira de Sementes*. 25(1): 116-120. 2003. Doi: 10.1590/S0101-31222003000100018.

- OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; GUIMARÃES, R.M.; MASETTO, T.E. Evaluation of seed quality in *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. and *T. impetiginosa* (Martius Ex A. P. de Candolle) Standley - (Bignoniaceae) by x-ray test. *Revista Brasileira de Sementes*. 26(2): 138-143. 2004. Doi: 10.1590/S0101-31222004000200019.
- ORACZ, K.; BOUTEAU, H.E.M.; FARRANT, J.M.; COOPER, K.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; JOB, D.; CORBINEAU, F.; BAILLY, C. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *The Plant Journal*. 50: 452-465. 2007. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03063.x.
- PAULA, S.O.; SOUSA, J.A.; BRITO, E.S.; GALLÃO, M.I. The morphological characterization of the dry seeds and reserve mobilization during germination in *Morinda citrifolia* L. *Revista Ciência Agronômica*. 47(3): 556-563. 2016. Doi: 10.5935/1806-6690.20160067
- PAULSEN, T.R.; COLVILLE, L.; KRANNER, I.; DAWS, M.I.; HOGSTEDT, G.; VANDVIK, V.; THOMPSON, K. Physical dormancy in seeds: a game of hide and seek?. *New Phytologist*. 198: 496-503. 2013. Doi: 10.1111/nph.12191.
- PEREIRA, M.P.; CORRÊA, F.F.; POLO, M.; CASTRO, E.M.; CARDOSO, A.A.; PEREIRA, F.J. Seed germination of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) as related to its anatomy and dormancy alleviation. *Seed Science Research*. 26(4): 351-361. 2016. Doi: 0.1017/S0960258516000167.
- PINTO, T.L.P.; MARCOS FILHO, J.; FORTI, V.A.; CARVALHO, C.; GOMES JÚNIOR, F.G. Evaluation of the *Jatropha curcas* L. seed viability by tetrazolium and x-ray tests. *Revista Brasileira de Sementes*. 31(2):195-2001. 2009. Doi: 10.1590/S0101-31222009000200023.
- PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E. Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. *Journal of Plant Physiology*. 162: 873-885. 2005. Doi: 10.1016/j.jplph.2004.10.012.
- PUPIM, T.L.; NOVENBRE, A.D.L.C.; CARVALHO, M.L.M.; CÍCERO, S.M. Using x-ray test to evaluate the quality of embaúba seeds (*Cecropia pachystachya* Trec.). *Revista Brasileira de Sementes*. 30(2): 28-32. 2008. Doi: 10.1590/S0101-31222008000200004.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Compte Rendues Biologiques* 331(10): 796–805. 2008. Doi: 10.1016/j.crvi.2008.07.021.

REN, C.; BILYEU, D.; ROBERTS, C.A.; BEUSELINCK, P.R. Factors regulating the mobilization of storage reserves in soybean cotyledons during post-germinative growth. *Seed Science and Technology*; 35(2): 303–317. 2007. Doi:10.15258/sst.2007.35.2.06

RICALDE, L.; VÁSQUEZ, A.; GROPPA, M.D.; BENAVIDES, M.P. Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in polyamine-induced growth inhibition in wheat plants. *Protoplasma*. 1-13. 2018. Doi: 10.1007/s00709-018-1227-z.

RIVERS, M. *Delonix regia*. The IUCN red list of threatened species. 2014. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T32947A2828337.en>. Acesso em 31/01/2018.

RODRIGUES-JUNIOR, A.G.; FARIA, J.M.R.; VAZ, T.A.A.; NAKAMURA, A.T.; JOSÉ, A.C. Physical dormancy in *Senna multifuga* (Fabaceae, Caesalpinoideae) seeds: the role of seed structures in water uptake. *Seed Science Research*. 24: 147-157. 2014. Doi: 10.1017/S0960258514000087.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histological and histochemical evidences. *Protoplasma*. 249(3): 747-758. 2012. Doi: 10.1007/s00709-011-0318-x.

SALEM, M.Z.M.; ABDEL-MEGEED, A.; ALI, H.M. Stem wood and bark extracts of *Delonix regia* (Boj. Ex. Hook): chemical analysis and antibacterial, antifungal and antioxidant properties. *BioResources*. 9(2): 2382-2395. 2014.

SANTOS, H.P.; BUCKERIDGE, M.S.S. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Annals of Botany*. 94: 819–830. 2004. Doi:10.1093/aob/mch209

SAVADOGO, P.; SANOU, L.; DJIBRIL DAYAMBA, S.; BOGNOUNOU, F.; THIOMBIANO, A. Relationships between soil seed banks and above-ground vegetation along a disturbance gradient in the W National Park trans-boundary biosphere reserve. West Africa. *Journal of Plant Ecology*. 10: 349–363. 2016. Doi: 10.1093/jpe/rtw025.

- SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin and abscisic acid. 125: 1591-1602. 2001. Doi: 10.1104/pp.125.4.1591.
- SHARMA, S.N.; MAHESHWARI, A.; SHARMA, C.; SHUKLA, N. Gene expression patterns regulating the seed metabolism in relation to deterioration/ageing of primed mung bean (*Vigna radiata* L.) seeds. Plant Physiology and Biochemistry 124: 40–49. 2018. Doi: 10.1016/j.plaphy.2017.12.036.
- SHEWALE, V.D.; DESHMUKH, T.A.; PATIL, L.S.; PATIL, V.P. Anti-inflammatory activity of *Delonix regia* (Boj. Ex. Hook.). Advances in Pharmacological Sciences. 5(Suppl 3):1–4. 2012. Doi: 10.1155/2012/789713.
- SILVA, B.M.S.; MÔRO, F.V. Aspectos morfológicos do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal de faveira (*Clitoria fairchildiana* R. A. Howard. - Fabaceae). Revista Brasileira de Sementes. 30(3): 195-201. 2008. Doi: 10.1590/S0101-31222008000300026.
- SILVA, B.M.S.; SILVA, C O.; MÔRO, F.V.; VIEIRA, R.D. Morphoanatomy of fruit, seed and seedling of *Ormosia paraensis* Ducke. Journal of Seed Science. 37(4): 192-198.2015. Doi: 10.1590/2317-1545v37n4151436.
- SILVA, V.N.; CÍCERO, S.M.; BENETT, M. Relationship between eggplant seed morphology and germination. Revista Brasileira de Sementes. 34(4): 597 – 9604. 2012. Doi: 10.1590/S0101-31222012000400010.
- SIMONTACCHI, M.; SADOVSKY, L.; PUNTARULO, S. Profile of antioxidant content upon developing of *Sorghum bicolor* seeds. Plant Science. 164(5): 709-715. 2003. Doi: 10.1016/S0168-9452(03)00027-X.
- SOLTANI, E.; BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. A graphical method for identifying the six types of non-deep physiological dormancy in seeds. Plant Biology. 19(5):673-682. 2017. Doi: 10.1111/plb.12590.
- SORIANO, D.; OROZCO-SEGOVIA, A.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J.; KITAJIMA, K.; GAMBOA-DE-BUEN, A.; HUANTE, P. Seed reserve composition in 19 tree species of a tropical deciduous forest in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. Annals of Botany. 107: 939–951. 2011. Doi:10.1093/aob/mcr041.

- STEBBINS, M.K. Flowering trees of Florida. Pineapple Press, Sarasota, Florida. 144 p. 1999.
- SUZUKI, N.; MILLER, G.; MORALES, J.; SHULAEV, V.; TORRES, M.A.; MITTLE, R. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 14: 691–699. 2011. Doi: 10.1016/j.pbi.2011.07.014.
- TAMAKI, Y.; TERUYA, T.; TAKO, M. The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 74(5): 1110-1112. 2010. Doi: 10.1271/bbb.90935.
- TAN-WILSON, A.L.; WILSON, K.A. Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*. 145(1): 140-153. 2012. Doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01535.x.
- TONETTI, O.A.O.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A. Physical and physiological quality of *Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac. Leish. *Revista Brasileira de Sementes*. 28(1): 114-121. 2006. Doi: 10.1590/S0101-31222006000100016.
- VARGAS, A.M.M.; CAZETTA, A.L.; GARCIA, C.A.; MORAES, J.C.G.; NOGAMI, E.M.; LENZI, E.; COSTA, W.F.; ALMEIDA, V.C. Preparation and characterization of activated carbon from a new raw lignocellulosic material: Flamboyant (*Delonix regia*) pods. *Journal of Environmental Management*. 92: 178-184. 2011. Doi: 10.1016/j.jenvman.2010.09.013.
- VEIGAS, J. M.; DIVYA, P.; NEELWARNE, B. Identification of previously unreported pigments among carotenoids and anthocyanins in floral petals of *Delonix regia* (Hook.) Raf. *Food Research International*. 47(1), 116-123. 2012. Doi: 10.1016/j.foodres.2012.02.008.
- VIANI, R.A.G.; RODRIGUES, R.R. Survival in nursery of native species saplings obtained from natural regeneration of forest fragments. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 42(8): 1067-1075. 2007. Doi: 10.1590/S0100-204X2007000800002.
- WANG, L.S.; LEE, C.T.; SU, W.L.; HUANG, S.C.; WANG, S.C. *Delonix regia* leaf extract (DRLE): a potential therapeutic agent for cardioprotection. *PLOS One*. 9: 1-17. 2016. Doi: 10.1371/journal.pone.0167768.

YANG, F.; BASU, T.K.; OORAIKUL. B. Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 52: 319–330. 2001. Doi: 10.1080/09637480120057567.

YE, N.; ZHU, G.; LIU, Y.; ZHANG, A.; LI, Y.; LIU, R.; SHI, L.; JIA, L.; ZHANG, J. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. *Journal of Experimental Botany*. 63(5): 1809–1822. 2012. Doi: 10.1093/jxb/err336.

ZAMALEA, P.C.; SARMIENTO, C.; ARNOLD, A.E.; DAVIS, A.S.; DALLING, J.W. Do soil microbes and abrasion by soil particles influence persistence and loss of physical dormancy in seed of tropical pioneers? *Frontiers in Plant Science*. 5: 1-14. 2015. Doi: 10.3389/fpls.2014.00799.

ZAMITH, L.R.; SCARANO, F.R. Seedling production of *Restinga* species of Rio de Janeiro Municipality, RJ, Brazil. *Acta Botanica Brasilica*. 18: 161-176. 2004. Doi: 10.1590/S0102-33062004000100014 .

CAPÍTULO 1

Análise do efeito dos tratamentos pré-germinativos na superação da dormência física de sementes de *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. (Fabaceae: Caesalpinoideae)

Resumo

Estratégias artificiais para a superação de dormência física em sementes são utilizadas para alterar a estrutura do tegumento, tornando-o mais impermeável a água. Dessa forma, esta pesquisa objetivou estudar as possíveis alterações que estes métodos podem ocasionar no tegumento e na estrutura interna das sementes de *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. Sementes foram coletadas em banco de solo e submetidas a escarificações térmica, mecânica e física. Em delineamento inteiramente ao acaso, foram analisados a taxa de germinação, teor de água, padrão de embebição, a morfologia interna das sementes por análises em raios X, a ultraestrutura do tegumento e a produção de malondialdeído (MDA). As sementes de *D. regia* apresentam um teor inicial de água de aproximadamente 2% e demonstrou um padrão trifásico de embebição. A escarificação mecânica com a lixa no lado oposto do eixo embrionário promoveu a formação de uma abertura artificial no tegumento e foi o método mais eficiente na superação da dormência física das sementes de *D. regia*, com 98% de sementes germinadas. Sementes submetidas à temperatura de 90°C tiveram aproximadamente 60% de taxa de germinação. Análises ultraestruturais demonstraram que altas temperaturas promovem a formação de rachaduras no tegumento destas sementes. No entanto, sementes submetidas ao ácido sulfúrico concentrado demonstraram até 88% de sementes mortas. Foi observado que este método promove a formação de rachaduras grandes e profundas e maior produção de MDA quando comparado com os demais tratamentos. As análises de raios X não permitiram distinguir alguma alteração ou dano interno promovido por esses diferentes métodos de escarificação. Dessa forma, foi possível observar que o conjunto de análises da germinação, morfológicos, ultraestruturais e bioquímicos podem associar a eficiência dos métodos de superação de dormência física.

Palavras-chave: análise ultraestrutural, escarificação, raios X, malondialdeído.

Analysis of the pre-germination treatments effect on seeds the physical dormancy of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. (Fabaceae: Caesalpinoideae)

Abstract

Artificial methods for overcoming seeds physical dormancy are used to alter the integument structure, making it more impermeable to water. Thus, this research aimed to study the possible changes that these methods can promote in the integument and internal structure of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf seed. Seeds were collected on soil banks and subjected to thermal, mechanical and physical scarification. In a completely randomized design, the germination rate, water content, imbibition pattern, internal seed morphology by X-ray analysis, tegument ultrastructure and malondialdehyde (MDA) production were analyzed. *D. regia* seeds had an initial water content of approximately 2% and demonstrated a three-phase imbibition pattern. The mechanical scarification with sandpaper on the opposite side of the embryonic axis promoted the formation of an artificial opening in the tegument and was the most efficient method to overcome the physical dormancy of *D. regia* seeds, with 98% germinated seeds. Seeds submitted to 90 ° C had approximately 60% germination rate. Ultrastructural analyzes have shown that high temperatures promote the disruption in the seed coat of these seeds. However, seeds submitted to concentrated sulfuric acid showed up to 88% of dead seeds. It was observed that this method promotes the formation of large and deep disruptions and higher MDA production when compared to the other treatments. The X-ray analysis did not allow us to distinguish some alteration or internal damage promoted by these different scarification methods. Thus, it was possible to observe that the set of germination analyzes, morphological, ultrastructural and biochemical can associate the efficiency of the overcoming physical methods.

Keywords: ultrastructural analysis, scarification, X-rays, malondialdehyde.

Introdução

A dormência física é ocasionada pela presença de uma ou mais camadas de macroesclereídeos lignificados e dispostos em paliçada, denominadas células Malpighianas, na exotesta do tegumento das sementes (BASKIN et al., 2000; BASKIN,

2003; BASKIN e BASKIN, 2003; BASKIN e BASKIN, 2004; RODRIGUES-JÚNIOR et al., 2014). As células Malpighianas tornam o tegumento impermeável à água, pois são revestidas por substâncias hidrofóbicas (GEISLER et al., 2017), de natureza diversificada, que constituem geralmente suberina, lignina e calose (KELLY et al., 1992; JAYASURIYA et al., 2007). Além da impermeabilidade à água, estas substâncias também atuam nas defesas químicas contra predadores, patógenos e microrganismos, favorecendo assim, a formação do banco de sementes no solo (DALLING et al., 2011; PAULSEN et al., 2013; JAYASURIYA et al., 2015).

A germinação de sementes com dormência física ocorre quando o tegumento se torna permeável à água (HU et al., 2009). Na maioria das espécies da família Fabaceae, a abertura para a entrada de água nas sementes ocorre em um ponto de abertura, que geralmente é o estrofiolo (JAYASURIYA et al., 2012; GAMA-ARACHCHIGE et al., 2011; GAMA-ARACHCHIGE et al., 2013; HUDSON et al., 2015). O estrofiolo se fecha quando a semente atinge a maturidade e abre em resposta para algum sinal ambiental adequado (FERRERAS et al., 2018). Altas temperaturas, secas e queimadas, disponibilidade de água, resfriamento/descongelamento e passagem pelo trato digestivo de animais são fatores naturais que atuam na superação de dormência física de sementes (BASKIN et al., 2000; JAYASURIYA et al., 2012). Durante a formação do ponto de abertura, os macroesclereídeos se afastam da região do estrofiolo e conseqüentemente, a semente torna-se permeável à água (BASKIN, 2003). A abertura do estrofiolo é um evento irreversível e dessa forma, não pode mais fechar (BASKIN e BASKIN, 2014).

Pesquisas que simulam condições naturais são extremamente importantes para elucidar a biologia da germinação e dormência física de sementes de espécies florestais. Entretanto, nestas condições, podem levar entre meses a dois anos para que as sementes superem a dormência física, como em *Delonix regia* (JAGANATHAN et al., 2016), *Dimorphandra wilsonii* e *D. exaltata* (MATHEUS et al., 2017) e *Vachellia cavea* (FERRERAS et al., 2018). Deste modo, a fim de acelerar a germinação de sementes, principalmente para a produção de mudas, podem-se aplicar tratamentos pré-germinativos para a superação de dormência física, como as escarificações mecânica, química e térmica (BASKIN e BASKIN, 2004). As escarificações visam tornar as sementes duras mais permeáveis à entrada de água, luz e temperatura (BRUNO et al., 2001).

Dentre os métodos de escarificação, encontram-se a imersão das sementes em ácidos, bases fortes, água quente ou fria, álcool, peróxido de hidrogênio ou impactos sobre superfícies sólidas (BRUNO et al., 2001). Entretanto, a aplicabilidade e a eficácia destes métodos dependem da intensidade da dormência, que é variável entre as diferentes espécies e até mesmo, nas mesmas espécies encontradas em diferentes locais e, também da época de coleta (PASSOS et al., 2007). Além disso, estes métodos devem ser eficazes na superação da dormência, sem ocasionar danos nas sementes (PASSOS et al., 2007), e apresentarem alto grau de reprodutibilidade (ZAIDEN e BARBEDO, 2004).

Comumente, é adotado o teste de germinação para se determinar a eficácia dos métodos de escarificação, que pode ser uma análise imprecisa (DELL'AVILA, 2007). Além da dormência, sementes de espécies florestais possuem altos riscos de predação, podem ser vazias e apresentar má-formação do embrião (MASETTO et al.; 2007). Dessa forma, é interessante associar diferentes tratamentos pré-germinativos por escarificação com outras técnicas físicas, fisiológicas e bioquímicas, a fim de possibilitar a análise da qualidade fisiológica das sementes (DELL'AQUILA, 2007). A técnica de raios X tem sido adotada pelo ISTA (International Seed Testing Association) por realizar estudos morfológicos e fisiológicos de sementes de espécies florestais (FARIA et al., 2018). Trata-se de um método físico, simples, rápido e não destrutivo que permite observar a morfologia interna das sementes (DELL'AQUILA, 2007; MASETTO et al., 2007; MAHAJAN et al., 2018) e conseqüentemente, possibilita distinguir sementes malformadas e vazias de um lote, as quais podem influenciar nos resultados de germinação (AMARAL et al., 2011). Por outro lado, a análise da peroxidação de lipídios das membranas internas pela formação de malondialdeído (MDA) (BAILLY et al., 2000), podem fornecer suportes adicionais na investigação do nível de danos promovidos pelas escarificações em sementes.

A dormência física está presente em sementes de aproximadamente 15 famílias das Angiospermas, dentre estas, encontra-se a família Fabaceae (BASKIN et al., 2000), incluindo espécies que possuem importância econômica e ecológica (RODRIGUES-JÚNIOR et al., 2014), como *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. *D. regia* apresenta sementes com dormência física (ATAÍDE et al., 2003; ZWIRTES et al., 2013; JAGANATHAN et al., 2016). É uma espécie com alto potencial ornamental por causa de suas densas folhagens e exuberantes flores vermelhas (TAMAKI et al., 2010), na

medicina tradicional (SHEWALE et al., 2012; CHAI et al., 2012; SALEM et al., 2014), na indústria farmacêutica e alimentícia (TAMAKI et al., 2010; BETANCUR-ANCONA et al., 2011).

Estudos que analisam os efeitos dos diferentes tipos de escarificações para a superação de dormência física, associando-os com a morfologia interna da semente, além das possíveis alterações estruturais no tegumento e na degradação das membranas dos tecidos internos das sementes, correlacionando-os com a germinação ainda são escassos. Neste contexto, esta pesquisa objetivou analisar a biologia da germinação das sementes de *D. regia* quanto aos diferentes tratamentos pré-germinativos e os possíveis efeitos que estes tratamentos poderiam promover no tegumento e na estrutura internas.

Material e métodos

Espécie de estudo – *Delonix regia* (Bojer ex. Hook.) Raf., conhecida como popularmente como flamboyant. pertence à família Fabaceae e subfamília Caesalpinoideae, e é nativa do Madagascar e introduzida por todo o mundo (RIVERS, 2014). É uma árvore decídua que pode atingir entre 5 a 20 metros de altura, as folhas são alternas, recompostas, bipinadas, com 10 a 20 pares de foliólulos e frutos com 30 a 50 cm de comprimento, de coloração marrom escura e deiscentes quando maduros. Apresenta flores de coloração vermelha brilhante, de 8 a 11 cm de diâmetro e uma pétala superior maior e distinta, com coloração amarelada e o florescimento ocorre entre os meses de setembro a janeiro (DU PUY et al., 1995).

Coleta e beneficiamento - As sementes foram coletadas no banco de sementes do solo de indivíduos de *Delonix regia* em Rio Verde, Goiás, Brasil (17°80'31"S e 50°90'7"W) entre março de 2017 a fevereiro de 2018. No beneficiamento, foram selecionadas apenas sementes visivelmente íntegras. Experimentos de superação de dormência, germinação, curva de embebição e localização de entrada de água, alterações morfológicas e anatômicas foram realizados nos Laboratórios de Sementes, do IF Goiano (Rio Verde, Goiás, Brasil) e Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí (UFG/REJ, Jataí, Goiás, Brasil).

Tratamentos pré-germinativos para a superação da dormência – As sementes foram submetidas aos diferentes tratamentos pré-germinativos, a fim de se realizar a superação da dormência: tratamento controle (T0); escarificação térmica em água destilada (T1 – a 80°C por 1 minuto; T2 – a 80°C por 3 minutos; T3 – a 90°C por 1 minuto; T4 – a 90°C por 3 minutos); escarificação mecânica com lixa n° 08, no lado oposto do eixo embrionário (T5); escarificação química em ácido sulfúrico concentrado (T6 – por 60 minutos; T7 – por 90 minutos; T8 – por 120 minutos). Para cada tratamento foram utilizadas 120 sementes, em que todas foram analisadas quanto à morfologia interna por uso da técnica de raios X.

Morfologia interna das sementes pela técnica de raios X – Após os tratamentos pré-germinativos, as sementes foram aderidas em placas de acrílico transparente com o auxílio de fita adesiva dupla face. Em seguida, foram analisadas em equipamento de raios X, sob 26 Kv de intensidade em 14,5 segundos de exposição. A análise das radiografias obtidas foi realizada em que as sementes foram divididas em três categorias: sementes preenchidas (100% cheias), sementes com cotilédones defeituosos (danos \leq 50%) e sementes defeituosas no cotilédone e embrião (danos $>$ 50%). Do total de 120 sementes analisadas, 100 sementes foram destinadas ao teste de germinação, 10 para a determinação do teor de água e 10 para análise da peroxidação de lipídios, escolhidas ao acaso.

Teste de germinação – As sementes foram germinadas em papel germitest, umedecido com 2,5 vezes o peso do papel em volume de água destilada, com quatro repetições de 25 sementes, em câmara tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*), a 25°C, sob condições de fotoperíodo 12/12 horas luz/escuro. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes germinadas, considerando aquelas que apresentaram protrusão da radícula. Concomitantemente com o teste de germinação, foram realizados o índice de velocidade de germinação (IVG) conforme Maguire (1962).

Determinação do teor de água – Foram selecionadas dez sementes para cada um dos tratamentos pré-germinativos realizados para a superação de dormência. As sementes foram submetidas à estufa a 103 \pm 5°C por sete dias consecutivos, em que se

realizou a pesagem diariamente em balança analítica de precisão. A determinação do teor de água foi obtida de acordo com as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009),

Análise da peroxidação de lipídios – A fim de se avaliar os danos em membranas celulares, foi analisado a intensidade da peroxidação de lipídios pela concentração estimada de malondialdeído (MDA), conforme Cakmak e Horst (1991). Sementes foram submetidas aos diferentes tratamentos pré-germinativos e depois ao nitrogênio líquido a fim de cessar o metabolismo. Em seguida, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o início do ensaio. A fim de extrair as amostras [cotilédones + eixo embrionário], as sementes foram novamente submetidas ao nitrogênio líquido e quebradas com auxílio de um martelo, devido ao alto grau de dureza do tegumento. Em balança analítica de precisão, foram pesadas, em triplicata, proximamente 0,150 mg das amostras, que foram posteriormente maceradas em nitrogênio líquido e 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1%. (p/v) Em seguida, foram centrifugadas em 12000 rpm xg, por 15 minutos, à temperatura de 4°C . Alíquota de 0,5 μL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 μL ao meio de reação constituído de TCA 15%.(p/v) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) e incubados em estufa a 97°C , por 30 minutos. Após, foi cessada a reação em banho de gelo e centrifugado 9000 rpm xg, por 5 minutos, à temperatura de 4°C . A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro UV-visível [Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts – EUA], e a absorbância específica do sobrenadante foi determinada no comprimento de onda de 532 nm e a absorbância inespecífica a 600 nm. A concentração de TCA foi calculada pelo coeficiente molar de $155 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HODGES et al., 1989) e os resultados foram expressos em nmol g^{-1} de massa fresca.

Curva de embebição - Foi determinada a partir da pesagem sistemática de quatro repetições de 25 sementes, em intervalos de uma hora no período nas primeiras 12 horas, seguidos de intervalos de três horas e, posteriormente de seis horas, até que 50% das sementes apresentassem emissão de radícula. A partir das análises realizadas para a superação de dormência (ver “*resultados*”), determinou-se utilizar o tratamento pré-germinativo mais efetivo, ou seja, que teve a maior taxa de germinação. As sementes foram embebidas em rolo de papel com três folhas umedecidas com água

destilada, no volume 2,5 vezes o peso seco, mantidas em câmara B.O.D. nas mesmas condições de temperatura e luz pré-estabelecidas no teste de germinação. O ganho de peso (GP) foi calculado de forma indireta, baseando-se no teor de água inicial das sementes e o peso úmido destas nos diferentes intervalos, conforme metodologia de Zuchi et al. (2012) e Albuquerque et al. (2009), utilizando a seguinte fórmula: $GP = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100$, em que P_f corresponde à massa final das sementes obtido a cada intervalo de pesagem e P_i , à massa inicial das sementes antes da embebição.

Análise das alterações morfológicas das sementes durante a superação da dormência e germinação - Sementes foram submetidas à escarificação mecânica com a lixa no lado oposto do eixo embrionário e postas para germinar. Realizou-se a observação e registros diariamente, após o início da embebição até a protrusão da radícula, conforme Rodrigues-Júnior et al. (2014).

Análise ultraestrutural dos efeitos dos tratamentos pré-germinativos no tegumento - as sementes foram imediatamente coletadas após submetidas aos tratamentos pré-germinativos e secas sob papel toalha. Posteriormente, foram conduzidas ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), do Instituto de Física, da Universidade Federal de Goiás (IF/UFG, Goiânia, Goiás, Brasil). As sementes foram diretamente metalizadas em ouro, de acordo com Matheus et al. (2017), em equipamento Dentum Vacuum Desk V. As análises em MEV foram realizadas em microscópio eletrônico Jeol JSM-6610.

Análise anatômica e micromorfológica do tegumento das sementes durante a fase inicial da germinação - para o estudo em microscopia de luz, as sementes submetidas à escarificação mecânica com a lixa no lado oposto do eixo embrionário foram postas para germinar e coletadas no 1° e 3° DAS. Fragmentos do tegumento foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), desidratados em série etanólica crescente [30, 50, 70, 90 e 100%], por uma hora cada. As amostras dos fragmentos foram incluídas e montadas em resina de metacrilato (Leica®, Alemanha), conforme as especificações do fabricante. As secções transversais foram obtidas a 5 µm de espessura em micrótomo rotativo Leica RM 2235 (Wetzlar, Alemanha) e coradas em azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964). As análises foram realizadas em microscópio

de luz Leica modelo DM 750, com câmera acoplada ICCHD 50 (Wetzlar, Alemanha), no Laboratório de Morfofisiologia, da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí (UFG/REJ, Jataí Goiás, Brasil). Para a análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas nas amostras desidratadas em série crescente de acetona, secadas em ponto crítico de CO₂ em equipamento Bal Tec CPD 030, metalizadas em ouro em aparelho evaporador de ouro (Sputtering) Bal Tec SCD 050 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss LEO EVO 40 XVP, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil).

Análise estatística – realizou-se delineamento inteiramente ao acaso para todos os experimentos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão, análise de variância (ANOVA) e teste Tukey ($P \leq 0,005$). Os softwares Statistica (Palo Alto, CA, USA) e SygmaPlot 14.0 (Systat Software Inc., São José, Califórnia, EUA) foram usados para os testes estatísticos e gráficos, respectivamente.

Resultados

Germinação das sementes e morfologia interna nos diferentes tratamentos pré-germinativos para a superação de dormência

A porcentagem de sementes germinadas e IVG nos diferentes tratamentos pré-germinativos para a superação de dormência de sementes de *D. regia* estão expressos na figura 1. As sementes que não foram submetidas aos tratamentos pré-germinativos, ou seja, tratamento controle (T0) não apresentaram germinação e, portanto, continuaram dormentes. A escarificação mecânica pela lixa no lado oposto do eixo embrionário (T5) obteve 98% de sementes germinadas. Dentre as sementes tratadas sob escarificação térmica e química, a maior porcentagem de germinação foi observada no tratamento com água a 90°C por três minutos (T4), com 57% e no ácido sulfúrico concentrado por 120 minutos, com 24% de germinação (T8). As porcentagens de sementes germinadas não diferiram entre si, nos tratamentos de escarificação química com ácido sulfúrico concentrado (T7, T8 e T9). O IVG apresentou valores significativamente maiores nas sementes de *D. regia* que foram escarificadas com a lixa (T5) em 26,35 (figura 1). Em

seguida, as sementes submetidas à escarificação térmica em água destilada a 90°C por 1 e 3 minutos, demonstraram IVG de valor relevante, com 14,11 e 15,28, respectivamente.

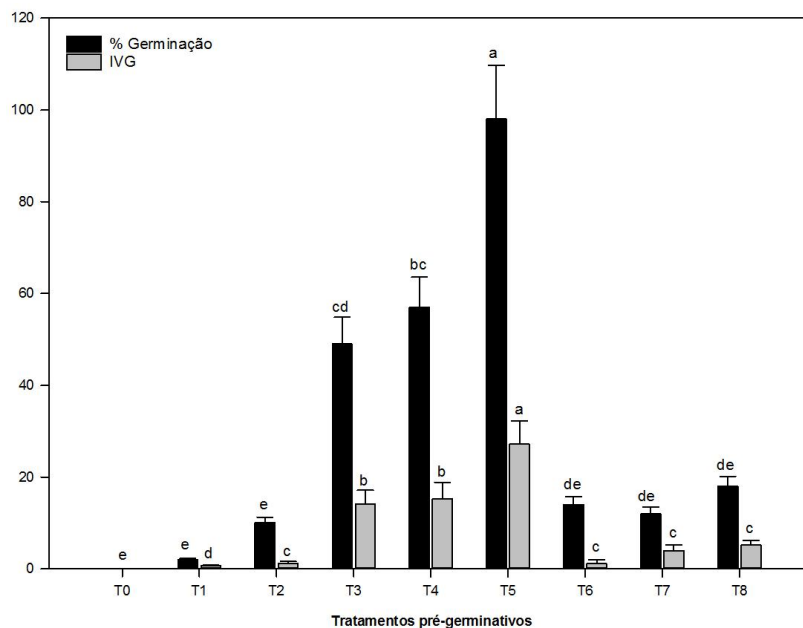


Figura 1. Porcentagem de sementes germinadas e índice de velocidade de germinação aos 11° dias após a semeadura. T0 - tratamento controle; Escarificação térmica em água destilada a 80°C, T1 - 1 minuto e T2 - por 3 minutos; Escarificação térmica em água destilada a 90°C, T3 - por 1 minuto e T4 - por 3 minutos; T5 - escarificação mecânica com lixa no lado oposto do eixo embrionário; Escarificação química em ácido sulfúrico concentrado, T6 - por 60 minutos, T7 - por 90 minutos e T8 - por 120 minutos. Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em análises de raios X, foi observado que *D. regia* apresentou sementes completamente preenchidas (Figura 2A) que resultaram em plântulas normais (Figura 2B) ou em sementes duras (Figura 2C), nos diferentes tratamentos de escarificação (Tabela 1). Verificou-se que o T5 foi o método que teve a maior taxa de plântulas normais, de 85%. Sementes que apresentaram cotilédone defeituoso (Figura 2D) formou plântulas anormais (Figura 2E), em que o dano compreendia uma área menor que 50% da área total interna da semente. A maior porcentagem de sementes com cotilédone defeituoso e de plântulas anormais foi verificado nas sementes submetidas à escarificação com a lixa, de 22% (Figura 2F). Sementes que apresentaram cotilédones e eixo embrionário defeituosos (Figura 2G) resultaram em sementes mortas (Figura 2H), em que é possível observar que estas sementes estão intumescidas, mas a má-formação de suas estruturas internas, as impediram de germinar. Sementes expostas ao ácido sulfúrico por 60, 90 e 120 minutos foram as que tiveram maior número de sementes

defeituosas internamente e mortas (Figura 2I). Entretanto, nessas sementes foi observado que aproximadamente 97% estavam preenchidas (Figura 1).

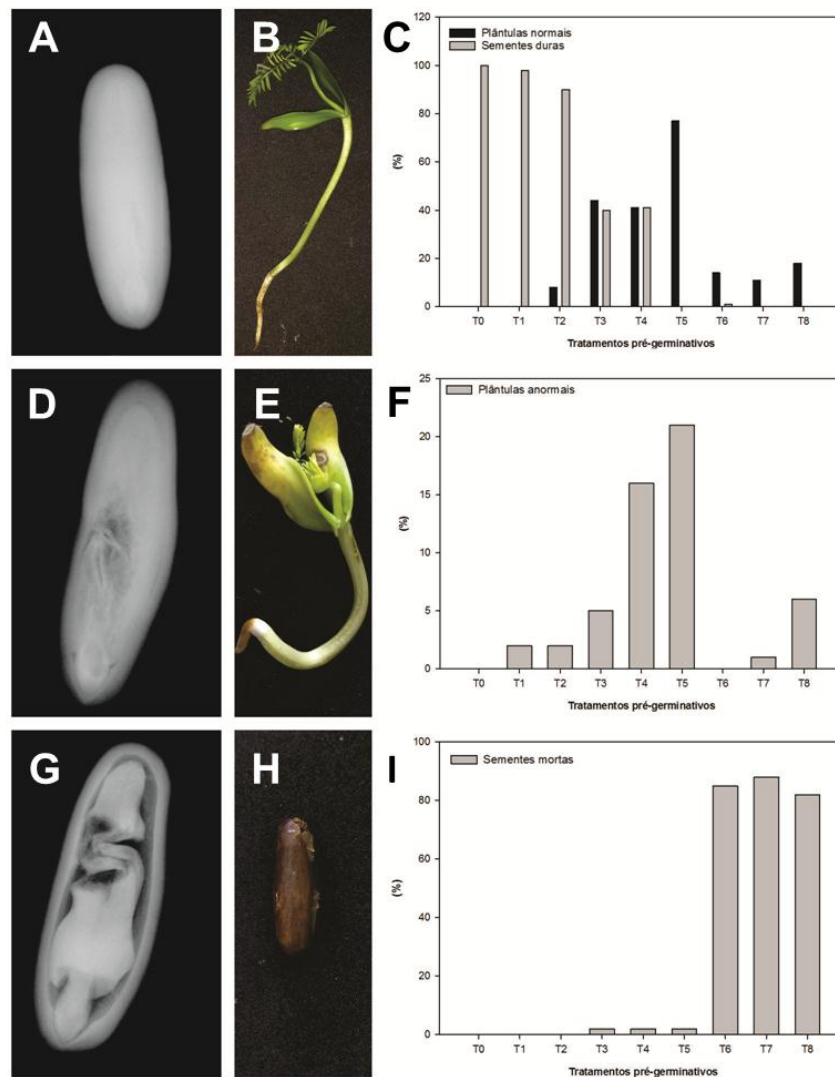


Figura 2. Análise da morfologia interna das sementes de *D. regia* por análise em raios X e porcentagem de plântulas normais, anormais, sementes duras e mortas. A – semente preenchida; B – plântula normal; C – porcentagem de plântulas normais e sementes duras; D – semente com cotilédono parcialmente defeituoso; E – plântula anormal; F – porcentagem de plântulas anormais; G – semente com cotilédono e eixo embrionário defeituosos; H – semente morta; I – porcentagem de sementes mortas.

Tabela 1. Porcentagem de sementes de *D. regia* encontradas em cada categoria, conforme as imagens obtidas pelas análises em raios X.

Tratamentos pré-germinativos	Categorias		
	Sementes preenchidas (100% cheias)	Sementes com cotilédone defeituoso (danos ≤ 50%)	Sementes com cotilédone e embrião defeituosos (danos > 50%)
T0	97	3	---
T1	97	3	---
T2	95	5	---
T3	92	6	2
T4	91	5	4
T5	91	8	1
T6	98	1	1
T7	98	2	---
T8	97	3	---

Análise do teor de água das sementes de *D. regia* nos diferentes tratamentos pré-germinativos

As sementes de *D. regia* apresentaram perda de água até o 5º dia após o início do ensaio em todos os tratamentos pré-germinativos (Figura 3). O teor de água das sementes dormentes, ou seja, do tratamento controle, inicialmente foi de 1,89% e atingiu 9,42% (Figura 3A). Sementes sob escarificação térmica em água destilada a 80°C por 1 minuto obteve teor de água inicial de 5,81% e atingiu 9,90% (Figura 3B). As sementes escarificadas mecanicamente com lixa no lado oposto do eixo embrionário tiveram inicialmente 6,11% de teor de água e atingiram 8,58% (Figura 3C). Nas sementes escarificadas com ácido sulfúrico concentrado por 60 e 120 minutos, obtiveram teor de água inicial de 1,52% e 3,27% e atingiram 11,03% e 7,78%, respectivamente (Figura 3D).

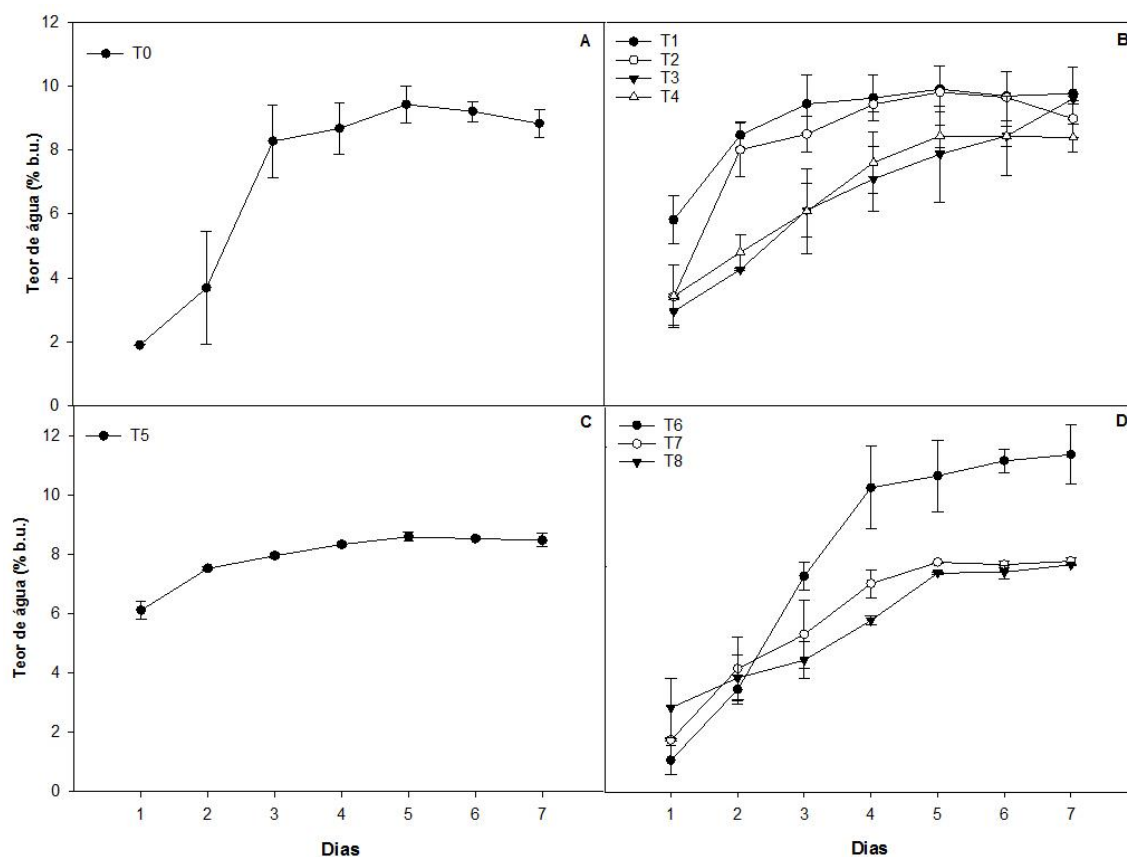


Figura 3. Porcentagem do teor de água nas sementes de *Delonix regia*, nos diferentes tratamentos pré-germinativos A – tratamento controle (T0); B – Escarificação térmica em água destilada a 80°C por 1 minuto (T1) e 3 minutos (T2) e a 90°C por 1 minutos (T3) e 3 minutos (T4); C – Escarificação mecânica com a lixa no lado oposto do eixo embrionário (T5); D – Escarificação química com ácido sulfúrico concentrado por 60 minutos (T6), 90 minutos (T7) e 120 minutos (T8).

Padrão de embebição durante a germinação das sementes

Em sementes controle (não tratadas) não houve aumento de massa fresca, que se manteve aproximadamente estável durante todo o experimento. Sementes submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico concentrado por 120 minutos e escarificação térmica com água destilada a 80°C por três minutos obtiveram ganho de massa fresca baixo, indicando que tais tratamentos pré-germinativos permitiram pouca entrada de água durante a embebição até as 124 horas. Sementes escarificadas com a lixa no lado oposto do eixo embrionário apresentaram ganho de massa continuamente até as 124 horas após o início da embebição. Neste tratamento, a embebição apresenta-se rápida nas primeiras 54 horas (fase I), com período de embebição mais lenta no intervalo de 54 até as 90 horas após o início da embebição (fase II) e novamente segue-se absorção mais rápida de água após as 90 horas até as 124 horas, com a protrusão da radícula (figura 4).

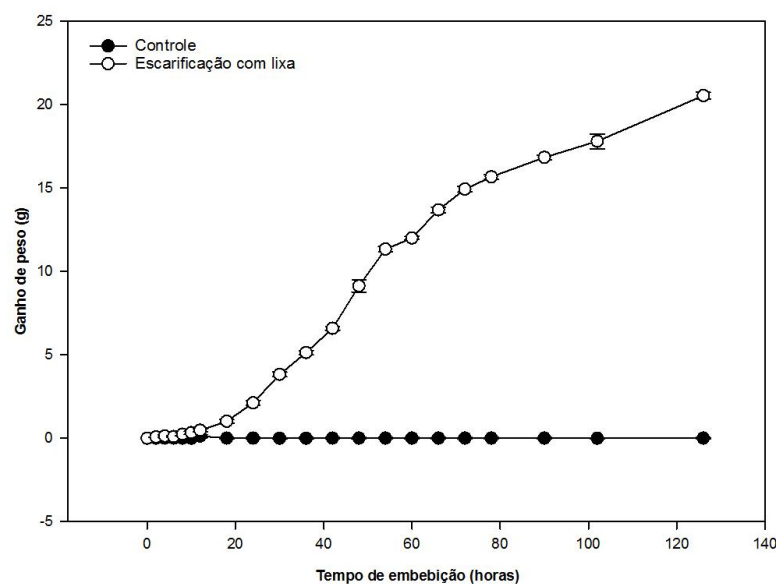


Figura 4. Curva de embebição das sementes de *Delonix regia*. Peso fresco em miligramas (mg) das sementes controle (T0), ou seja, não tratadas e sementes escarificadas mecanicamente com lixa d'água no lado oposto do eixo embrionário (T5).

Alterações morfológicas durante a superação de dormência e germinação

As sementes secas de *D. regia* apresentaram tegumento marrom-claro opaco e rígido e o pleurograma esteve presente, como uma linha mais escura que circunda todo o bordo da semente (Figura 5A). Com a escarificação mecânica do lado oposto do eixo embrionário, ocorreu o desgaste do tegumento (Figura 5B). Após 24 horas de embebição, observou-se que metade da semente apresentou característica de semente seca e outra metade de semente embebida, em que se encontrava entumescida e nesta região, o tegumento começou a descamar (Figura 5C). Às 48 horas após a embebição, a semente aumentou de tamanho, encontrou-se entumescida em dois terços de sua extensão e a descamação do tegumento foi mais evidente (Figura 5D). Após 72 horas, a semente estava totalmente entumescida e a raiz primária rompeu o tegumento na região próxima ao hilo (Figura 5E) e às 96 horas, a raiz primária estava completamente exposta (Figura 5F).

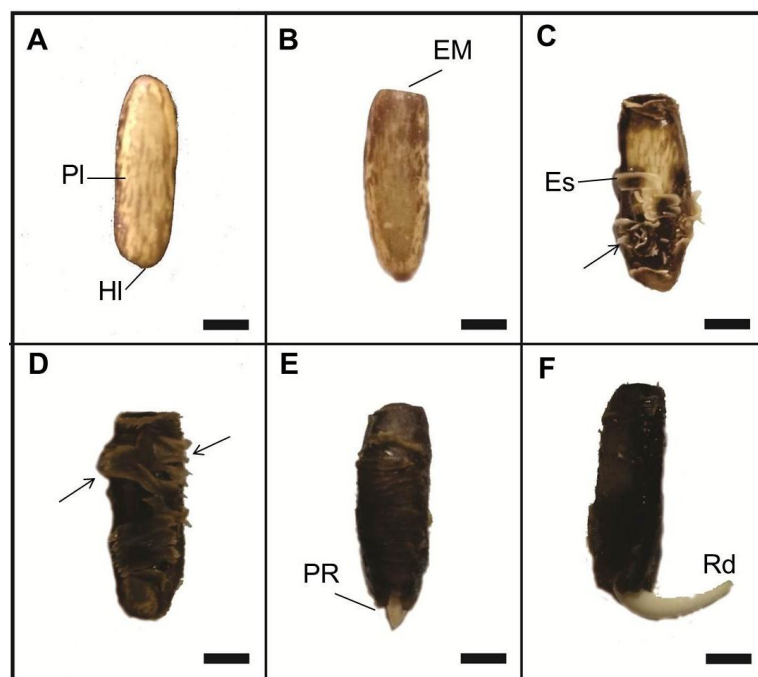


Figura 5. Mudanças morfológicas durante a germinação de sementes de *D. regia*. A – semente seca; B – semente seca e escarificada mecanicamente (EM) com a lixa nº 80 no lado oposto do eixo embrionário; C – semente após 24 horas de embebição; D – semente após 48 de embebição; E – semente germinada após 72 horas de embebição; F – semente germinada, com protrusão da radícula (PR), após 96 horas de embebição, com radícula exposta. Seta = limite da região seca/entumescida. EM – escarificação mecânica; ES – escamas; HI – hilo; PL – pleurograma; PR – protrusão da radícula; Rd – radícula; setas – escamas.

Análise ultraestrutural dos efeitos das escarificações térmica, química e mecânica no tegumento e estruturas das sementes

As análises em MEV do tegumento estão presentes na figura 6. Sementes dormentes, ou seja, as do tratamento controle (T0) apresentaram superfície externa do tegumento recoberta por cutícula com poucas fissuras presentes (Figura 6A). Sementes que foram submetidas à escarificação térmica a 80°C e 90°C por 1 e 3 minutos cada, apresentaram o despreendimento da cutícula (Figura 6B,C,D e E), além disso, quando expostas à temperatura por maior tempo, observou-se a formação de rachaduras de maior porte (Figura 6C e E). Em sementes escarificadas mecanicamente com a lixa nº 80 não apresentaram rachaduras no tegumento (Figura 6F) e tiveram estrutura similar às sementes do tratamento controle. Por outro lado, sementes escarificadas em ácido sulfúrico por 60, 90 e 120 minutos apresentaram a formação de poros (Figura 6G, H e I) e as que foram expostas por 120 minutos demonstraram ranhuras grandes e profundas que permitiram observar a face periclinal dos macroesclereídeos ou células Malpighianas (Figura 6I).

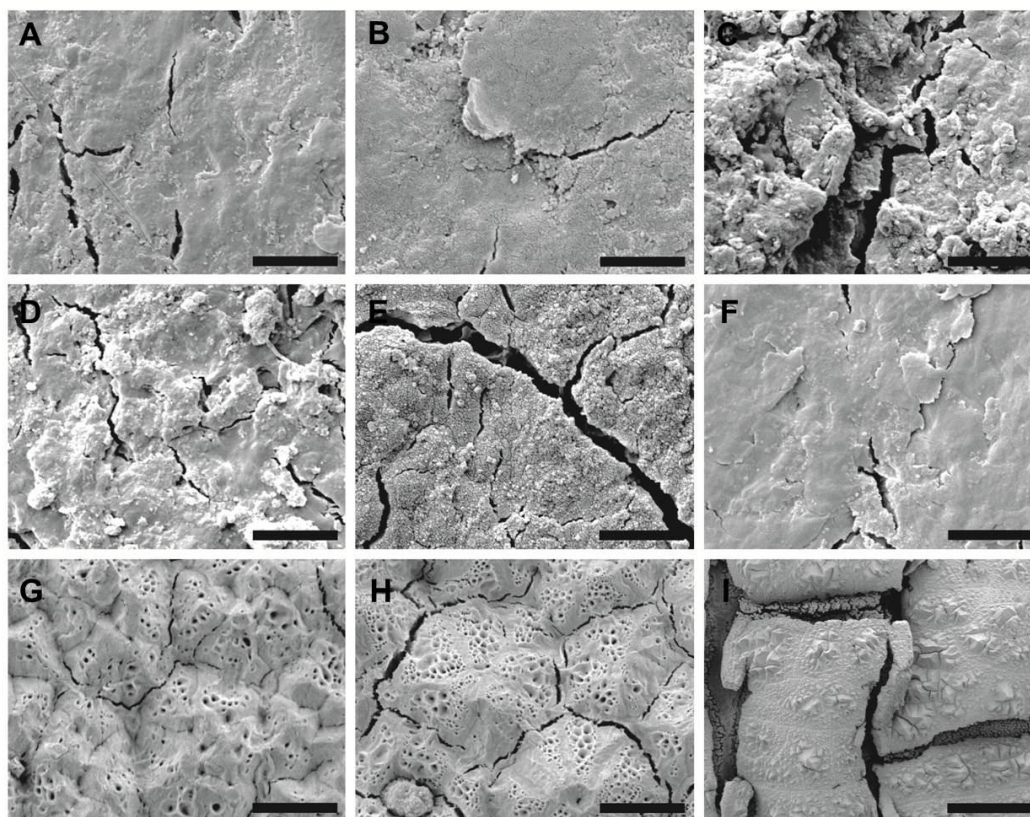


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tegumento de *Delonix regia* sob diferentes tratamentos pré-germinativos. A – sementes controle (T0); B - escarificação a 80°C por 1 minuto (T1); C – escarificação a 80°C por 3 minutos (T2); D – escarificação a 90°C por 1 minuto (T3); E – escarificação a 90°C por 3 minutos (T4); F – escarificação mecânica com lixa (T5); G – escarificação com ácido sulfúrico concentrado por 60 minutos (T6); H - escarificação com ácido sulfúrico concentrado por 90 minutos (T7); J – escarificação com ácido sulfúrico concentrado por 120 minutos.. Barra: 5 µm.

Alterações estruturais do tegumento no início da germinação das sementes

No 1º DAS, é possível observar que a exotesta do tegumento é constituída por macrosclereídeos dispostos em paliçada ou células Malpighianas (Figura 7A e B). Entre as duas camadas de macrosclereídeos, observou-se a linha branca. Abaixo da exotesta, encontra-se a hipoderme e em seguida, a mesotesta composta por células parenquimáticas compactadas (Figura 7A e B). A exotesta estava ausente no 3º DAS (Figura 7C e D), porém a hipoderme constituía a camada mais externa, seguida da mesotesta com células mais compactadas do que no 1º DAS (Figura 7D).

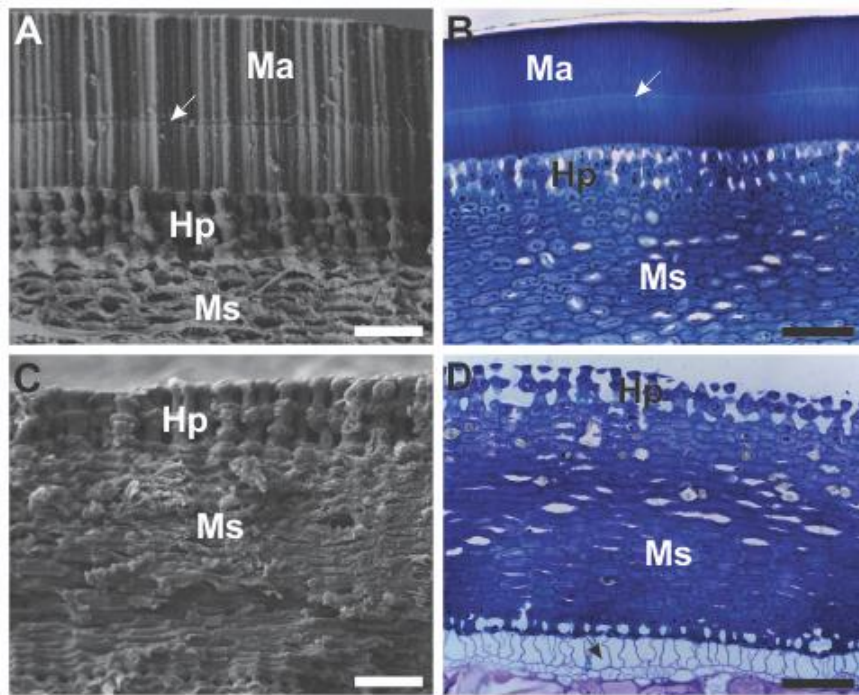


Figura 7. Ultraestrutura (à esquerda) e microscopia de luz (à direita) do tegumento de *Delonix regia*, em vista lateral. A – B: 1º dia após a semeadura (DAS) e C- D; 3º DAS. Hp – hipoderme; Ma – macroesclereídeos, Ms – mesotesta; seta branca – linha branca; seta preta - osteosclereídeos. A e C (barras = 50 μ m); B e D (barras = 100 μ m).

Avaliação dos danos nas membranas celulares de tecidos internos das sementes

Nessas análises foi observado que nas sementes dormentes (T0), a concentração de MDA foi de 29,25 μ mol, enquanto nos demais tratamentos, a formação de MDA não variou estatisticamente entre si. Entretanto, nas sementes submetidas à escarificação química por ácido sulfúrico concentrado por 90 minutos (T7), a concentração de MDA foi de 58 μ mol (Figura 8).

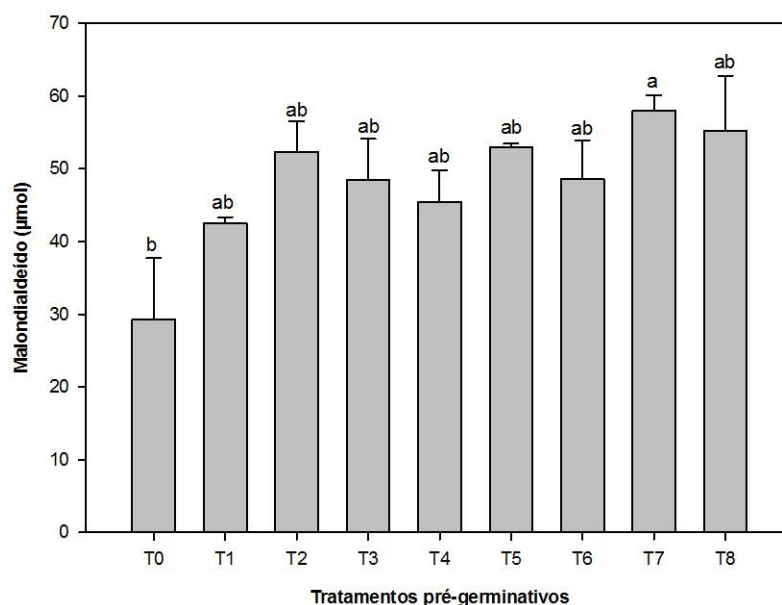


Figura 8. Concentração de MDA nas sementes de *D. regia* submetida aos diferentes tratamentos pré-germinativos.

Discussão

Estes dados demonstraram que as sementes de *D. regia* apresentam dormência física imposta pelo tegumento impermeável à água, que as impediram de embeber e conseqüentemente, germinarem. A impermeabilidade no tegumento das sementes de Fabaceae é conferida por camadas de macrosclereídeos dispostos em paliçada, denominadas células Malpighianas (VERNIER et al., 2012; BASKIN e BASKIN, 2014; RODRIGUES-JÚNIOR et al., 2014). Além disso, o grau de embebição em sementes com dormência física está também correlacionado com a presença de lignina e calose revestindo a exotesta do tegumento (VERNIER et al., 2012). De fato, as análises em microscopia de luz (ML) e em microscopia eletrônica de varredura (MEV) corroboram ao demonstrar a exotesta do tegumento de *D. regia* formado pelos macrosclereídeos em paliçada. Essa impermeabilidade conferida pelo tegumento de sementes de *D. regia* impediu tanto a entrada quanto a saída de água. Isso é possível observar que o teor de água inicial era de aproximadamente 2% nas sementes dormentes e que a perda de água que presente no citoplasma e que constituíam membranas ocorreu gradualmente durante os setes dias de ensaio, quando comparada com as demais sementes submetidas aos tratamentos pré-germinativos. Assim, a impermeabilidade é uma característica que atua não apenas na dispersão das sementes, mas também promove proteção contra perda ou

entrada de água, ataque de patógenos e choques físicos, permitindo com que a semente seja viável por um longo período de tempo (DEBEAUJON et al., 2007).

Alterações estruturais no tegumento ocorreram à medida que as sementes de *D. regia* eram embebidas e por fim, germinaram. Dentre as alterações que foram observadas em nossas análises, a deformação no pleurograma e mudança na tonalidade do tegumento foram também verificadas por Rodrigues-Júnior et al. (2014), assim como a descamação da exotesta do tegumento foi evidenciada por Melo et al. (2004) à medida que a sementes se intumescem. Dessa forma, a perda de cutícula e da exotesta pode conferir uma adaptação da semente em resposta à germinação, a fim de diminuir ao grau de dureza do tegumento, que facilite a sua ruptura e ocorra a protrusão da radícula.

As escarificações térmica, mecânica e química provocaram diferentes graus de germinação em sementes de *D. regia*, conforme também já evidenciados por Ataíde et al. (2003), Zwirtes et al. (2013) e Jaganathan et al. (2016). Nestes estudos, a escarificação mecânica por lixa no lado oposto do eixo embrionário foi o tratamento mais eficiente, assim como observado também por Ataíde et al. (2003) e Zwirtes et al. (2013) para as sementes desta espécie. As análises em MEV demonstram que não foram observadas alterações ultraestruturais no tegumento de *D. regia*, entretanto, a escarificação mecânica promoveu o desgaste do tegumento e a formação artificial de um ponto de abertura, sem que houvesse alteração ultraestrutural. Com isso, possibilitou a rápida entrada de água nas sementes de *D. regia* durante a embebição, similarmente ao observado em sementes de *Cassia roxburghii* em estudos realizados por Jaganathan et al. (2018).

Condições ambientais naturais foram simuladas por Jaganathan et al. (2016), a fim de elucidar a germinação de sementes de *D. regia* em banco de sementes de solo. Esses autores evidenciaram que o estrofiolo das sementes de *D. regia* se abrem em altas temperaturas e dessa forma, permitem a entrada de água. Esses autores verificaram que as sementes quando submetidas à água a 90°C por 1 e 5 minutos apresentaram até 90% de sementes germinadas em condições de laboratório e em 42% de germinação de sementes, após persistirem 16 meses em banco de solo. Quanto à eficácia da escarificação térmica em sementes de *D. regia*, em estudos realizados por Ataíde et al. (2003) foi observado aproximadamente 80% de germinação em sementes submetidas à 90°C por 1 minuto. Nestas análises, observou-se que apesar da escarificação térmica não apresentar a maior taxa de germinação entre todos os métodos, também foi eficaz

na superação da dormência, corroborando com as demais pesquisas. A superação de dormência promovida por altas ou baixas temperaturas são tratamentos mais efetivos na maioria das espécies que possuem dormência física, pois representam condições ambientais naturais em que as sementes estão expostas (JAYASURIYA et al., 2009). Foi observado que a escarificação térmica promoveu distintos níveis de desprendimento da camada externa de revestimento e a formação de ranhuras ao longo do tegumento de *D. regia*. Suportando nossas análises, o tegumento de sementes de *Dimorphandra wilsonii* e *D. exaltata* apresentaram quando expostas a altas e baixas temperaturas, respectivamente (MATHEUS et al., 2017). Esses autores indicam que as alterações estruturais no tegumento promovidas por temperaturas acompanham as mudanças na região hilar das sementes de Fabaceae para promover a entrada de água. Neste contexto, nossos dados demonstram que, além da alta temperatura ser um sinal externo que estimule a abertura do estrofíolo, pode também desgastar o tegumento ao ponto que altere a sua impermeabilidade do tegumento e possibilitar a entrada de água por meio deste. Suportando nossas observações, Ma et al. (2004) sugere que fissuras presentes na cutícula e na exotesta podem ser também pontos de entrada de água na semente. Janská et al. (2018) observaram que a camada de macroesclereídeos forneceu outra barreira que impede a entrada de água em tegumentos de sementes com dormência física. Entretanto, para esses autores, as mudanças de temperatura e umidade, podem alterar a composição da cutícula e expandir o embrião, o que ocasiona força mecânica e promove a formação de rachaduras no tegumento, que permitem a entrada de água em sementes com dormência física

A escarificação química pelo ácido sulfúrico concentrado não foi um método eficiente na superação de dormência de sementes de *D. regia* em nossos estudos. Análises ultraestruturais demonstraram que este método promove a formação de poros na camada externa que reveste o tegumento, chegando a formar profundas rachaduras no tegumento, que possibilitou ver a camada de macroesclereídeos. Como, a taxa de germinação observadas nessas sementes foi baixa, levando a supor que a exposição ao ácido sulfúrico concentrado havia promovido danos internos. Entretanto, as análises da morfologia interna das sementes por raios X não permitiram verificar nenhum dano aparente nos cotilédones e eixo embrionário. As análises da morfologia interna das sementes de *D. regia*, pela técnica de raios X, possibilitaram que as sementes fossem classificadas em sementes preenchidas, sementes com cotilédones defeituosos e

sementes com eixo embrionário e cotilédones defeituosos, que resultaram em plântulas normais ou sementes duras, plântulas anormais e sementes mortas, respectivamente. Sementes que eram completamente preenchidas, porém permaneceram duras, nos indicam que foram indiferentes aos tratamentos pré-germinativos aplicados. As análises de sementes em raios X permitem avaliação específica da viabilidade da semente, porém indicam características morfológicas correlacionadas ao vigor (OLIVEIRA et al., 2003). Como esperado, a maior porcentagem de sementes duras foi observada em sementes dormentes. Entretanto, a maior porcentagem de sementes mortas foi verificada em sementes submetidas ao ácido sulfúrico concentrado e aparentemente eram preenchidas quando analisadas pelos raios X. Dessa forma, permite concluir que as técnicas de raios X não possibilitam observar se os diferentes métodos de escarificação promoveram alterações estruturais internas.

Por sua vez, os resultados da análise da concentração de malondialdeído (MDA) permitiram verificar que os tratamentos pré-germinativos ocasionam a produção de MDA quando comparado aos resultados obtidos nas sementes controle. Como esperado, a maior concentração de MDA foi verificado em sementes submetidas à escarificação química. Estes dados indicaram que houve estresse oxidativo, uma vez que a formação de MDA ocorre em resposta à peroxidação de lipídios presentes nas membranas, dos cotilédones e do eixo embrionário, ocasionada pelas EROs (GAO et al., 2016). O estresse oxidativo é desencadeado pela ação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que promovem vários danos aos lipídios, proteínas e DNA (KUMAR et al., 2015). Assim, futuras análises que detectam a concentração dessas EROs e enzimas antioxidativas podem reforçar esta hipótese.

Conclusão

A escarificação mecânica foi um método eficiente para a superação de dormência física de sementes de *D. regia*, ao formar uma entrada artificial para a introdução de água e promover poucas alterações estruturais no tegumento. Entretanto, as sementes de *D. regia* responderam bem à escarificação térmica a 90°C, que foi um método que propiciou a formação de ranhuras na cutícula do tegumento. Estes resultados permitiram supor que além da abertura do estrofíolo, as rachaduras formam pontos adicionais para a entrada de água nestas sementes expostas as altas temperaturas. Por outro lado, sementes submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico

concentrado não tiveram taxa de germinação satisfatória e em análise ultraestrutural, foi observado a formação de rachaduras profundas. Apesar de não ter sido observado nenhum dano interno nestas sementes pelas análises em raios X, a produção de malondialdeído pressupõe que o ácido sulfúrico concentrado promoveu danos nas membranas dos cotilédones e eixo embrionário, e pode ter reduzido a viabilidade das sementes.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte dos técnicos Ms. Henrique Camargo e Dr.^a Tatiane Oliveira, do Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), do Instituto de Física, da Universidade Federal de Goiás (IF/UFG), Regional Goiânia, Goiânia, Goiás, Brasil. Ao apoio técnico de Ms. Elisa de Melo Castro, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Referências bibliográficas

ALBUQUERQUE, K.S.; GUIMARÃES, R.M.; ALMEIDA, I.F.; CLEMENTE, A.C.S. Physiological and biochemical alterations during germination of sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.) seeds. *Revista Brasileira de Sementes*. 31: 12-19. 2009. Doi: 10.1590/S0101-31222009000100028.

AMARAL, J.B.; MARTINS, L.; FORTI, V.A.; CÍCERO, S.M.; MARCOS-FILHO, J. X-ray test to evaluate the physiological potential of *Tabebuia heptaphylla* seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, 33: 606-612. 2011. Doi: [10.1590/S0101-31222011000400001](https://doi.org/10.1590/S0101-31222011000400001).

ATAÍDE, G.M.; BICALHO, E.M.; DIAS, D.C.F.S; CASTRO, R.V.O.; ALVARENGA, E.M. Overcoming seed dormancy of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. *Revista Árvore*. 37: 1145-1152. 2003. Doi: 10.1590/S0100-67622013000600016.

BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Science Research*. 10: 35-42. 2000. Doi: 10.1017/S0960258500000040.

BASKIN, C.C. Breaking physical dormancy in seed – focusing on the lens. *New Phytologist*. 158: 227-238. 2003. Doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00751.x.

BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. Classification, biogeography and phylogenetic relationships of seed dormancy. Pp. 518-544. In: Smith, R.D.; Dickie, J.B.; Linington, S.H.; Pritchard, H.W.; Probert, R.J. Seed conservation: turning science into practice. London: The Royal Botanic Gardens, Kew. 1023 pp. 2003.

BASKIN, J.; BASKIN, C.C. A classification for seed dormancy. Seed Science Research. 14: 1-16. 2004. Doi: 10.1079/SSR2003150.

BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C.; LI, X. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. Plant Science Biology. 15: 139-152. 2000. Doi: 10.1046/j.1442-1984.2000.00034.x.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. 2^a edição. Elsevier. 2014.

BETANCUR-ANCONA, D.; PACHECO-AGUIRRE, J.; CASTELLHANOS-RUELAS, A.; CHEL-GUERREIRO, L. Microencapsulation of papain using carboxymethylated flamboyant (*Delonix regia*) seed gum. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 12: 67-72. 2011. Doi: 10.1016/j.ifset.2010.11.002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Brasília, Distrito Federal, Brasil. 398 p. 2009.

BRUNO, R.L.A.; ALVES, E.U.; OLIVEIRA, A.P.; PAULA, R.C. Tratamentos pré-germinativos para superar a dormência de sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. Revista Brasileira de Sementes. 23: 136-143. 2001. Doi: 10.17801/0101-3122/rbs.v23n2p136-143.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). Physiologia Plantarum, 83: 463-468. 1991. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x.

CHAI, W.M.; SHI, Y.; FENG, H.L.; QIU, L.; ZHOU, H.C.; DENG, Z.W.; YAN, C.L.; CHEN, Q.X. NMR, HPLC-ESI-MS, and MALDI-TOF MS analysed of condensed tannins from *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. and their bioactivities. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60: 5013-5022. 2012. Doi: 10.1021/jf300740d.

- DALLING, J.W.; DAVIS, A.S.; SCHUTTE, B.J.; ARNOLD, A.E. Seed survival in soil: interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. *Journal of Ecology*. 99: 89–95. 2011. Doi: 10.1111/j.1365-2745.2010.01739.x.
- DEBEAUJON, I.; LEPINIEC, L.; POURCEL, L.; ROUTABOUL, J.M. Seed coat development and dormancy. In: Bradford, K.L.; Nonogaki, H. *Seed Development, Dormancy and Germination*. 25-49 pp. 2007.
- DELL'AQUILA, A Towards new computer imaging techniques applied to seed quality testing and sorting. *Seed Science and Technology*. 35: 519–538. 2007. Doi: 10.15258/sst.2007.35.3.01.
- DU PUY, D.J.; PHILLIPSON, P.P.; RABEVOHITRA, R. The genus *Delonix* (Leguminosae: Caesalpinoideae: Caesalpinieae) in Madagascar. *Kew Bulletin*. 50: 445-475. 1995. Doi: 10.2307/4110322.
- FARIA, J.C.T.; MELO, L.A.; ASSUMPÇÃO, C.R.M. BRONDANI GE, BREIER, TB, FARIA JMR. Physical quality of seeds of *Moquiniastrum polymorphum*. *Brazilian Journal of Biology*. 2: 1-7. 2018. Doi: 10.1590/1519-6984.175407.
- FERRERAS, A.E.; MARCORA, P.I.; VERNIER, P.; FUNES, G. Different strategies for breaking physical seed dormancy in field conditions in two fruit morphs of *Vachellia caven* (Fabaceae). *Seed Science Research*. 28: 8-15. 2018. Doi: 10.1017/S096025851800003X
- GAMA-ARACHCHIGE NS, N.S.; BASKIN, J.M.; GENEVE, R.L.; BASKIN, C.C. Identification and characterization of the water gap in physically dormant seeds of Geraniaceae, with special reference to *Geranium carolinianum*. *Annals of Botany*. 105: 977–990. 2011. Doi: 10.1093/aob/mcq078.
- GAMA-ARACHCHIGE, N.S.; BASKIN, J.M.; GENEVE, R.L.; BASKIN, C.C. Identification and characterization of ten new water gaps in seeds and fruits with physical dormancy and classification of water-gap complexes. *Annals of Botany*. 112: 69–84. 2013. Doi:10.1093/aob/mct094.
- GAO, J.; FU, H.; ZHOU, X.; CHEN, Z.; LUO, Y.; CUI, B.; CHEN, G.; LIU, J. Comparative proteomic analysis of seed embryo proteins associated with seed storability in rice (*Oryza sativa* L) during natural aging. *Plant Physiology and Biochemistry*. 103: 31-44. 2016. Doi: 10.1016/j.plaphy.2016.02.026.

- GEISLER, G.E.; PINTO, T.T.; SANTOS, M.; PAULILO, M.T.S. Seed structures in water uptake, dormancy release, and germination of two tropical forest Fabaceae species with physically dormant seeds. *Brazilian Journal of Botany*. 40: 67-77. 2017. Doi: 10.1007/s40415-016-0334-3.
- HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*. 207: 604-611. 1999. Doi: 10.1007/s004250050524.
- HU, X.W.; WANG, Y.R.; WU, Y.P.; BASKIN, C.C. Role of the lens in controlling water uptake in seeds of two Fabaceae (Papilionoideae) species treated with sulphuric acid and hot water. *Seed Science Research*. 19: 73-80. 2009. Doi: 10.1017/S0960258509301099.
- HUDSON, A.R.; AYRE, D.J.; OOI, M.K.J. Physical dormancy in a changing climate. *Seed Science Research*. 1: 1-16. 2015. Doi: 10.1017/S0960258514000403.
- JAGANATHAN, G.K.; WU, G.R.; HAN, Y.Y.; LIU, B.L. Role of the lens in controlling physical dormancy break and germination of *Delonix regia* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *Plant Biology*. 19: 53-60. 2016. Doi: 10.1111/plb.12451.
- JAGANATHAN, G.K. Physical dormancy alleviation and soil seed bank establishment in *Cassia roxburghii* is determined by soil microsite characteristics. *Flora*. 244-245: 19-23. 2018. Doi: 10.1016/j.flora.2018.06.004.
- JANSKÁ, A.; PECKOVÁ, E.; SCZEPANIAK, B.; SMÝKAL, P.; SOUKUP, A. The role of the testa during the establishment of physical dormancy in the pea seed. *Annals of Botany*. 20: 1–15. 2018. Doi: 10.1093/aob/mcy213.
- JAYASURIYA, K.M.G.G.; BASKIN, J.M.; GENEVE, R.L.; BASKIN, C.C. Morphology and anatomy of physical dormancy in *Ipomoea lacunosa*: identification of the water gap in seeds of Convolvulaceae (Solanales). *Annals of Botany*. 100: 13-22. 2007. Doi: 10.1093/aob/mcm070.
- JAYASURIYA, K.M.G.G.; BASKIN, J.M.; GENEVE, R.L.; BASKIN, C.C. A proposed mechanism for physical dormancy break in seeds of *Ipomoea lacunosa* (Convolvulaceae). *Annals of Botany*. 103: 433 –445. 2009. Doi:10.1093/aob/mcn240.

- JAYASURIYA, K.M.G.G.; BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C.; FERNANDO, M.R.T. Variation in seed dormancy and storage behavior of three liana species of *Derris* (Fabaceae, Faboideae) in Sri Lanka and ecological implications. *Research Journal of Seed Science*. 5: 1-18. 2012. Doi: 10.3923/rjss.2012.1.18.
- JAYASURIYA, K.M.G.G.; ATHUGALA, Y.; WIJAYASINGHE, M.; BASKIN, J.; BASKIN, C.C.; MAHADEVAN, N. The crypsis hypothesis a stenopic view of the selective factors in the evolution of physical dormancy in seeds. *Seed Science Research*. 25: 127-137. 2015. Doi: 10.1017/S0960258515000124.
- JOHANSEN, D.A. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill.1940.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 27: 137-138. 1965.
- KELLY, K.M.; VAN STADEN, J.; BELL, W.E. Seed coat structure and dormancy. *Plant Growth Regulation*. 11: 201-209. 1992. Doi: 10.1007/BF00024559.
- KUMAR, S.P.J.; PRASAD, S.R.; BANERJEE, R.; THAMMINENI, C. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany*. 116: 663–668, 2015 Doi:10.1093/aob/mcv098.
- MA, F.; CHOLEWA, E.; MOHAMED, T.; PETERSON, C.A.; GIJZEN, M. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. *Annals of Botany* 94: 213–228. 2004. Doi: 10.1093/aob/mch133.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*. 2: 176-177. 1962. Doi: 10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x.
- MAHAJAN, S.; MITTAL, S.K.; DAS, A. Machine vision based alternative testing approach for physical purity, viability and vigour testing of soybean seeds (*Glycine max*). *Journal of Food Science and Technology*. 55: 3949–3959. 2018. Doi: 10.1007/s13197-018-3320-x.

- MASETTO, T.E.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A.; FARIA, J.M.R. Evaluation of seed quality in *Eugenia pleurantha* (Myrtaceae) by X ray test. *Revista Brasileira de Sementes*. 29: 170-174. 2007. Doi: 10.1590/S0101-31222007000300020.
- MATHEUS, M.T.; RODRIGUES-JUNIOR, A.G.; OLIVEIRA, D.M.T.; GARCIA, Q.S. Seed longevity and physical dormancy break of two endemic species of *Dimorphandra* from Brazilian biodiversity hotspots. *Seed Science Research*. 27: 199-205. 2017. Doi: 10.1017/S0960258517000204
- MELO, G.G.; MENDONÇA, M.S.; MENDES, M.A.S. Morphological analysis of seeds, germination and seedlings of jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Acta Amazônica*. 34(1): 9-14. 204. Doi: 10.1590/S0044-59672004000100002
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*. 59: 368-373. 1964.
- OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A.C. Utilizing x-ray tests to evaluate the quality of canafistula seeds (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). *Revista Brasileira de Sementes*. 25: 116-120. 2003. Doi: 10.1590/S0101-31222003000100018.
- PASSOS, M.A.; TAVARES, K.M.P.; ALVES, A.R. Germination of seeds of 'sabiá' (*Mimosa caesalpineafolia* Benth.). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 2: 51-56. 2007. Doi: 10.1590/S0100-67622004000500004.
- PAULSEN, C.; COLVILLE, L.; KRAMMER, I.; DAWS, M.; HÖGSTEDT, G.; VANDVIK, V.; THOMPSON, K. Physical dormancy in seeds: a game of hide and seek? *New Phytologist*. 198: 496-503. 2013. Doi: 10.1111/nph.12191.
- RIVERS, M. *Delonix regia*. The IUCN red list of threatened species. 2014. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T32947A2828337.en>. Access in 31/01/2018.
- RODRIGUES-JÚNIOR, A.G.; FARIA, J.M.R.; VAZ, T.A.A.; NAKAMURA, A.T., JOSÉ, A.C. Physical dormancy in *Senna multifuga* (Fabaceae: Caesalpinoideae) seeds: the role of seed structures in water uptake. *Seed Science Research*. 24: 147-157. 2014. Doi: 10.1017/S0960258514000087.

- SALEM, M.Z.M.; ABDEL-MEGEED, A.; ALI, H.M. Stem wood and bark extracts of *Delonix regia* (Boj. Ex. Hook): chemical analysis and antibacterial, antifungal and antioxidant properties. *BioResources*. 9: 2382-2395. 2014.
- SHEWALE, V.D.; DESHMUKH, T.A.; PATIL, L.S.; PATIL, V.P. Anti-inflammatory activity of *Delonix regia* (Boj. Ex. Hook.). *Advances in Pharmacological Sciences*. 5: 1-4. 2012. Doi: 10.1155/2012/789713.
- TAMAKI, Y.; TERUYA, T.; TAKO, M. The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 74: 1110-1112. 2010. Doi: 10.1271/bbb.90935.
- VERNIER, P.; FUNES, G.; CARRIZO-GARCÍA, C. Physical dormancy and histological features of seeds of five *Acacia* species (Fabaceae) from xerophytic forests in central Argentina. *Flora*. 207(1): 39-46; 2012. Doi: 10.1016/j.flora.2011.07.017.
- Z Aidan, L.B.P.; BARBEDO, C.J. Quebra de dormência em sementes. In: Ferreira AG, Borguetti F. *Germinação: do básico ao aplicado*. 1ª edição. Artmed. Porto Alegre 134-146 pp. 2004.
- ZUCHI, J.; PANOZZO, L.E.; HEBERLE, E.; ARAÚJO, E.F. Imbibition and electrical conductivity of castor bean seeds classified by size. *Revista Brasileira de Sementes*. 34: 504-509. 2012. Doi: 10.1590/S0101-31222012000300019.
- ZWIRTES, A.L.; BARONIO, C.A.; CANTARELLI, E.B.; RIGON, J.P.G.; CAPUANI, S. Methods for overcoming seed dormancy in Flamboyant. *Brazilian Journal of Forest Research*. 33, 463-467. 2013. Doi: 10.4336/2013.pfb.33.76.568.

CAPÍTULO 2

Aspectos morfoanatômicos e da mobilização de reserva na germinação das sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. (Fabaceae, Caesalpinoideae)

Resumo

Delonix regia é uma espécie nativa do Madagascar, amplamente distribuída nas regiões tropicais e neotropicais e utilizada para fins ornamental, medicinal e industrial. Este estudo objetivou analisar aspectos da morfoanatomia do eixo embrionário e dos cotilédones e da mobilização das reservas desde a germinação até o desenvolvimento das plântulas de *D. regia*. As análises foram realizadas em microscopia de luz e eletrônica, além de estudos histoquímicos e bioquímicos. A germinação das sementes ocorreu no 3º dia após a semeadura (DAS) e a plântula se desenvolveu no 11º DAS, com eófilos completamente expandidos, epicótilo, hipocótilo e radícula com estrutura primária. Observou que a plântula era fanero-epígea-foliáceo. As proteínas e lipídios constituíram as reservas iniciais nos cotilédones e foram exauridas durante o desenvolvimento da plântula, enquanto houve síntese de amido no 5º DAS. Os cotilédones assumiram função fotossintética e o consumo de amido seguiu um padrão centrípeto durante o estabelecimento das plantas jovens. Eses dados demonstram que *D. regia* apresentou desenvolvimento rápido e esta característica pode viabilizar o uso desta espécie na tecnologia de produção de mudas, para fins de recuperação de áreas naturais degradadas, bem como também, para usos econômicos.

Palavras-chave: fanero-epígea-foliáceo, lipídios, plântulas, proteínas.

Morphoanatomic aspects and reserve mobilization in seed germination and post-seminal development of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. (Fabaceae, Caesalpinoideae)

Abstract

Delonix regia is a native species to Madagascar, widely distributed in tropical and neotropical regions and used for ornamental, medicinal and industrial purposes. This study aimed to analyze the morphology and anatomy aspects of the embryonic axis and cotyledons and reserves mobilization from the germination to the development of the *D. regia* seedlings. The analyzes were performed under light and electronic microscopy, as well as histochemical and biochemical studies. Seed germination occurred on the 3rd day after sowing (DAS) and the seedling developed on the 11th DAS with fully expanded eophylls, epicotyl, hypocotyl and radicle with primary structure. The seedling was phanerocotylar-epigeal-foliaceous. Proteins and lipids constituted the initial reserves in cotyledons and were depleted during the seedling development, while there was starch synthesis in the 5th DAS. Cotyledons assumed photosynthetic function and the starch consumption followed a centripetal pattern during the sapling's establishment. These data demonstrate that *D. regia* showed a rapid development and this characteristic may allow the use of this species in seedling production technology, for the purpose of recovering degraded natural areas, as well as for economic uses.

Keywords: phanerocotylar-epigeal-foliaceous, lipids, seeding, proteins.

Introdução

A família Fabaceae é representada por espécies pioneiras e principalmente, secundárias (GRIS et al., 2012; LOPES et al., 2013), de grande importância na reconstituição de ambientes naturais degradados (ALMEIDA, 2016) e relevante interesse econômico e ecológico. *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf., popularmente conhecida como Flamboyant ou Ponciana, é nativa do Madagascar, de porte arbóreo, decídua, de 5 a 20 metros de altura e floresce entre os meses de setembro a janeiro (DU PUY et al., 1995). É amplamente utilizada como ornamental em áreas tropicais (TAMAKI et al., 2010; BARNABY et al., 2016; WANG et al., 2016), na medicina tradicional (CHAI et al., 2012; SHEWALE et al., 2012; SALEM et al., 2014), na

indústria farmacêutica e alimentícia (TAMAKI et al., 2010; BETANCUR-ANCONA et al., 2011). Na vegetação nativa, indivíduos de *D. regia* vêm sendo ameaçados devido à fragmentação, queimadas e pastagens de ambientes naturais, ocasionando declínio significativo do número de árvores (RIVERS, 2014). Indivíduos de *D. regia* levam de cinco a sete anos para atingir a maturidade reprodutiva (STEBBINS, 1999) e além disso, suas sementes apresentam dormência física (ATAÍDE et al., 2013; JAGANATHAN et al., 2016), e dificulta a germinação e propagação desta espécie no meio nativo,

A germinação de sementes é um estágio vital do ciclo de vida das plantas, constituindo a forma principal de propagação, a fim de produzir mudas, destinadas a restaurar ambientes degradados e reduzir riscos de extinção de espécies ameaçadas (MOHAMED et al., 2018). Entretanto, é uma etapa crítica pela alta vulnerabilidade das sementes aos fatores externos do ambiente, tais como doenças, injúrias e escassez de água (RAIJOU et al., 2012). Sob condições adequadas de água, luz e umidade, as sementes quiescentes iniciam a germinação e, após sucessivos eventos moleculares, bioquímicos e celulares, que promovem a alongação do eixo embrionário, há ruptura do tegumento e a protrusão da radícula (BEWLEY e BLACK, 1994; BEWLEY et al., 1997; NONOGAKI et al., 2010).

A germinação é uma breve fase heterotrófica da vida da planta (VERNA et al., 2015), em que as reservas armazenadas nas sementes constituem a fonte energética para a alongação do eixo embrionário (DOMAN et al., 1982; PENFIELD et al., 2007) e no desenvolvimento da plântula (REN et al., 2007). No estágio final do desenvolvimento e maturação fisiológica das sementes, ocorre a síntese de reservas que se acumulam nos cotilédones e/ou endosperma completamente desenvolvidos (BEWLEY, 1997; REN et al., 2007). Assim, o desenvolvimento e estabelecimento das plântulas é uma etapa crítica que está diretamente correlacionada com a quantidade suficiente de reservas das sementes (SANTOS e BUCKERIDGE, 2004; MENA-ALÍ e ROCHA, 2005).

As espécies apresentam propriedades intrínsecas que determinam a germinação de suas sementes e o estabelecimento de plantas, como os fatores genéticos envolvidos e as características das sementes (RAIJOU et al., 2012; MOHAMED et al., 2018). Ampliar o conhecimento acerca da biologia da germinação e do desenvolvimento das plântulas podem subsidiar a interpretação correta de testes de germinação e de vigor em laboratório e identificar a qualidade fisiológica das sementes (SILVA e MÔRO, 2009).

Além disso, essas análises podem auxiliar na taxonomia (ABOZEID et al., 2017) e na compreensão de estratégias fisiológicas e ecológicas das espécies, tais como mecanismos de dispersão, sucessão e regeneração natural (SILVA e MÔRO, 2008; SILVA et al. 2015; DUARTE et al., 2016; PAULA et al., 2016).

Diante do potencial ecológico e econômico de *D. regia*, faz-se necessário elucidar aspectos da morfoanatomia e mobilização de reservas durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal desta espécie, que ainda são desconhecidos. Neste contexto, esta pesquisa objetivou estudar a germinação de sementes e desenvolvimento pós-seminal de *D. regia* (I) caracterização das principais alterações na morfoanatomia das sementes e plântulas, (II) análise ultraestrutural e da mobilização das reservas nos cotilédones e (III) verificar o consumo de amido durante o estabelecimento das plantas jovens.

Material e Métodos

Coleta e germinação das sementes - Sementes foram coletadas de vagens maduras de árvores de *D. regia*, do Instituto Federal Goiano, Rio Verde, Goiás, Brasil, nas coordenadas 17°80'31"S e 50°90'7"W. As sementes intactas e livres de danos mecânicos visíveis a olho nu, foram conduzidas ao Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí (UFG/REJ), Goiás, Brasil. As sementes foram submetidas à escarificação mecânica, com auxílio de lixa d'água n° 80 no lado oposto do eixo embrionário para a superação da dormência física. Em seguida, foram germinadas em papel germitest umedecido com água destilada em 2,5 vezes o volume de água em peso do papel, em câmara tipo B.O.D., a 25°C com fotoperíodo de 12/12 horas.

Estudo das alterações morfoanatômicas e ultraestruturais

Coleta das amostras – foram coletadas amostras de cotilédones, eixo embrionário, hipocótilo, epicótilo e raiz primária de plântulas nos 1° ao 11° dias após a semeadura (DAS).

Análises morfométricas - O comprimento dos cotilédones, eixo hipocótilo-radícula e eófilos foram mensurados de 30 amostras com o auxílio de um paquímetro digital. Em seguida, as amostras foram pesadas individualmente em uma balança analítica de precisão para a obtenção do peso fresco. Cada amostra foi colocada em

sacos de papel devidamente identificados e levados à estufa de secagem em temperatura constante de 72°C por seis dias. Após este período, foram novamente pesadas individualmente para a obtenção do peso seco.

Análises morfoanatômicas - Os cotilédones, eixo hipocótilo-radícula e eófilos das amostras foram registrados usando uma câmera digital. As amostras foram fixadas em FAA 70% [formaldeído, ácido acético glacial, álcool etílico 70%] por 24 horas (JOHANSEN, 1940), desidratadas em série etílica crescente, infiltradas e embebidas em resina de metacrilato [Leica®, Heidelberg, Alemanha]. Secções transversais e longitudinais com 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo [Leica, RM2235] e corados em azul de toluidina pH 6,3 (O'BRIEN et al., 1965). As secções foram observadas em microscópio de luz [Leica, DM750] e obtidas com câmera digital [Leica, ICC50HD].

Análise ultraestrutural dos cotilédones em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) – As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky [glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4%, tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2] (KARNOVSKY, 1965). Para se realizar MEV, estas foram desidratadas em série crescente de acetona e submetidas à secagem ao ponto crítico de CO₂ [CPD 030, Bal-Tec], metalizadas em ouro [SCD 050, Bal-Tec] e analisadas em microscópio eletrônico de varredura [LEO EVO 40 XVP, Carl Zeiss] no Laboratório de Análise Ultraestrutural, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil. Para análise em MET, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) em mesmo tampão por 2 horas em temperatura ambiente. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente e embebidas em resina epoxi. As secções ultrafinas foram obtidas em ultramicrotômo [Leica EM UC7], a 50 µm de espessura e contratadas em solução saturada de acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). As análises ultraestruturais foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) [Jeol, JEM-2100, equipado com EDS, Thermo Scientific], no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), no Instituto de Física, da Universidade Federal de Goiás (IF/UFG), em Goiânia, Goiás, Brasil.

Estudo da mobilização das reservas e síntese de clorofila dos cotilédones

Coleta das amostras – foram coletados cotilédones nos 1°, 3°, 5°, 7° e 11° DAS.

Análises histoquímicas - Amostras frescas dos cotilédones foram submetidas ao sudan IV para identificação dos lipídios (JOHANSEN, 1940). Secções transversais das amostras incluídas em resina de metacrilato, como descrito anteriormente, foram submetidos ao lugol (Johanson, 1940), PAS/reagente de Schiff (MCMANUS, 1948) e ao Xylidine Ponceau (VIDAL, 1970) para evidenciar amido, polissacarídeos neutros e proteínas, respectivamente.

Análises bioquímicas - Para cada dia após a semeadura analisado neste trabalho, coletou-se 10 amostras cotilédones. Estas amostras foram maceradas utilizando nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C em frascos até a análise quantitativa de açúcares solúveis totais (AST), lipídios totais, proteínas totais e teor de clorofila, cada ensaio foi realizado com três repetições.

Determinação de açúcares solúveis totais (AST) - foi utilizada aproximadamente 0,01 g de amostra da matéria fresca em balança analítica de precisão e adicionados em 1 mL de ácido sulfúrico a 2N, submetidos ao banho-maria a 80°C, por 30 minutos. Em seguida, este material foi centrifugado por 10 minutos a 10 rpm e 20 µm do sobrenadante foram extraídos. Ao sobrenadante adotou-se o método colorimétrico fenol-sulfúrico de DUBOIS et al. (1956). Os AST foram quantificados em espectrofotômetro [Nova 2000UV] a 490 nm, utilizando-se de curva padrão de glicose de 1%.

Determinação de lipídeos totais – utilizou-se o método de SOEHLLET (1879), em que foram pesados aproximadamente 400g de matéria fresca em balança analítica de precisão, adicionados 2 mL de ácido clorídrico 8M e levados ao banho-maria a 70°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de álcool etílico absoluto, 2,5 mL de éter etílico e 2,5 mL de éter de petróleo, agitados em aparelho vórtex por 1 minuto e centrifugados por 5 minutos. O sobrenadante foi extraído e colocados em tubos de ensaios previamente pesados e submetidos ao banho-maria a 60°C para evaporar o solvente. A estes tubos foram repetidos a extração éter etílico-éter de petróleo, até que se completasse toda a extração de solvente em estufa a 50-60°C. Os tubos de ensaios foram pesados em balança analítica de precisão até que o peso se manteve constante entre pesagens consecutivas.

Determinação de proteínas totais - foram pesados aproximadamente 0,02 g de matéria fresca em balança analítica de precisão. Foi realizada a extração etanólica e o sobrenadante foi submetido ao método de BRADFORD (1976) e quantificados em espectrofotômetro a 595 nm, em que se utilizou a curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA).

Determinação do teor de clorofila – este ensaio foi realizado de acordo com Cross et al. (2006), em ambiente sem luz, adicionando 500 µL do sobrenadante obtido na determinação de proteínas totais com 1200 µL de álcool etílico 98%. Realizou-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 645 e 655 nm. Foram calculados o teor total de clorofila por mg/g de peso fresco dos cotilédones.

Análise do consumo de amido durante a germinação até o estabelecimento de plantas jovens

Foram utilizadas secções dos cotilédones obtidas nas análises histoquímicas, para o estudo do consumo de amido entre os 1° ao 11° DAS, que são os estádios da germinação e desenvolvimento pós-seminal. Para a análise do consumo de amido até o estabelecimento das plantas jovens, sementes escarificadas com lixa no lado oposto do eixo embrionário foram germinadas em tubetes de PVC, contendo substrato BioPlant®, na casa de vegetação, da UFG/REJ, irrigadas uma vez ao dia. Coletaram-se amostras dos cotilédones dos 13°, 16°, 21°, 24° e 30° DAS, que foram processadas em resina de metacrilato e seccionadas transversalmente em micrótomo conforme já descrito anteriormente. Todas as secções foram submetidas ao Lugol para detecção de amido (Johansen, 1940).

Análises estatísticas - Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente ao acaso. Os dados morfométricos e bioquímicos foram submetidos à regressão, análise de variância seguidos pelo teste Tukey ($p \leq 0,005$) em software Statistica (Palo Alto, Califórnia, EUA) e os gráficos foram construídos utilizando software SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc., São José, Califórnia, EUA).

Resultados

Estudo da morfoanatomia na germinação de sementes e desenvolvimento pós-seminal de *D. regia*

A figura 1 representa as alterações morfológicas observadas no decorrer da germinação até o desenvolvimento da plântula de *D. regia*. O eixo hipocótilo-radícula estava posicionado entre as folhas cotiledonares. No decorrer do 1° ao 11° DAS observou-se pequeno alongamento dos cotilédones e alteração na cor, de amarelo-claro para verde. Quanto aos cotilédones, a plântula é fanereo-epígeo-foliáceo (PEF, do inglês “*phanerocotylar-epigeal-foliaceous*”), ou seja, os cotilédones se expandiram e emergiram para fora do tegumento, cotilédones expostos fora do solo e que inicialmente, são carnosos e apresentaram reservas. Inicialmente, o eixo hipocótilo-radícula apresentou-se esférico com plúmulas bem desenvolvidas. A partir do 4° DAS, observou-se o alongamento do eixo hipocótilo-radícula mais pronunciado de forma que possibilitou distinguir com nitidez as duas regiões. No 5° DAS, foi possível distinguir o hipocótilo e a radícula com mais facilidade e o início do desenvolvimento dos eófilos, que se encontraram completamente expandidos no 11° DAS. No 7° DAS, a radícula apresentou raízes laterais desenvolvidas e no 11° DAS, verificou o maior alongamento do hipocótilo.



Figura 1. Germinação e desenvolvimento de plântula de *Delonix regia* do 1° ao 11° dias após a sementeira (DAS). A – 1° DAS; B – 4° DAS; C – 5° DAS; D – 7° DAS e E – 11° DAS. Cot – cotilédone; EE – eixo embrionário; Eo – eófilo; Epc – epicótilo; Hpc – hipocótilo; Pl – plúmula; RL – raiz lateral; RP – raiz primária. Para observação das partes, uma folha cotiledonar foi removida. Barras = 1 cm.

Nas análises morfométricas (figura 2A), observou-se que o eixo hipocótilo-radícula foi a parte que cresceu de forma mais significativa durante os 11° DAS, com comprimento inicial de aproximadamente 20 mm e ao final, atingiu aproximadamente 139 mm. Os cotilédones se expandiram durante o desenvolvimento pós-seminal de forma gradativa, com comprimento inicial de 5 mm e 25 mm aos 11° DAS, aproximadamente. Os eófilos tinham o comprimento de 5 mm no 7° DAS e atingiram 15 mm aos 11° DAS, aproximadamente. O peso fresco dos cotilédones e eixo hipocótilo-radícula inicial foi de 0,25 g, com incremento final de 1,25 g aos 11° DAS, aproximadamente (figura 2B). Por outro lado, o peso seco permaneceu praticamente constante, de 0,18 g durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal (figura 2B).

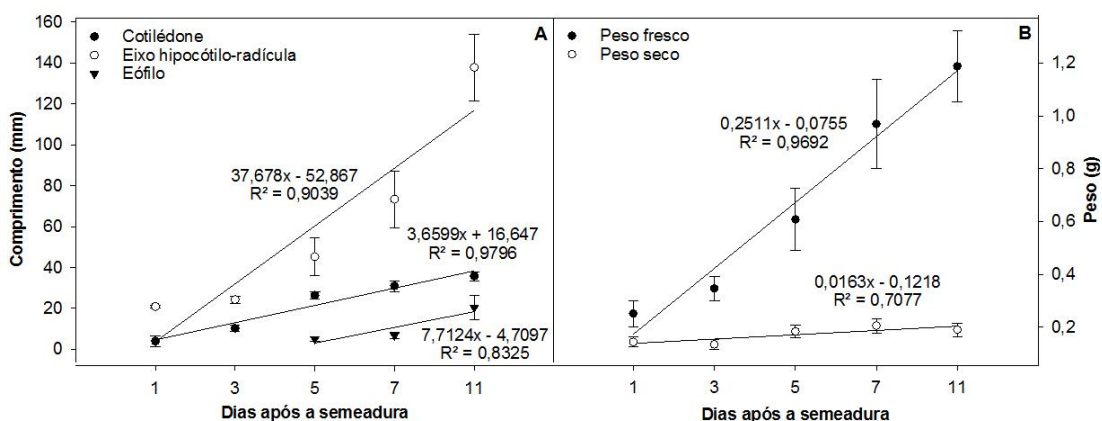


Figura 2. Morfometria e incremento na germinação e desenvolvimento pós-seminal de *Delonix regia*. A – comprimento em milímetro dos cotilédones, eixo hipocótilo-radícula e eófilos. B – peso fresco e seco em grammas durante a germinação e desenvolvimento das plântulas.

O epicótilo é constituído por procâmbio e meristema fundamental no 5° DAS (Figura 3A). No 7° DAS, foi possível observar pequenos vasos de xilema e floema (Figura 3B) e no 11° DAS, ocorriam o início do desenvolvimento secundário, com vasos de xilema e floema bem desenvolvidos e a presença de câmbio fascicular e interfascicular (Figura 3C). O hipocótilo apresentou estrutura primária nos 5° e 7° DAS (Figura 3D e E) e feixes de esclerênquima e câmbio vascular estavam presentes no 11° DAS (Figura 3F). Na raiz primária, há poucos elementos de metaxilema e a endoderme está em formação no 5° DAS (Figura 3G). No 7° DAS, a endoderme encontrava-se desenvolvida e os elementos de protoxilema e metaxilema estavam mais evidentes (Figura 3H). No 11° DAS, foi observado o início do crescimento secundário na raiz

primária, com endoderme, câmbio, vasos de floema formando os arcos entre os elementos de protoxilema (Figura 3I).

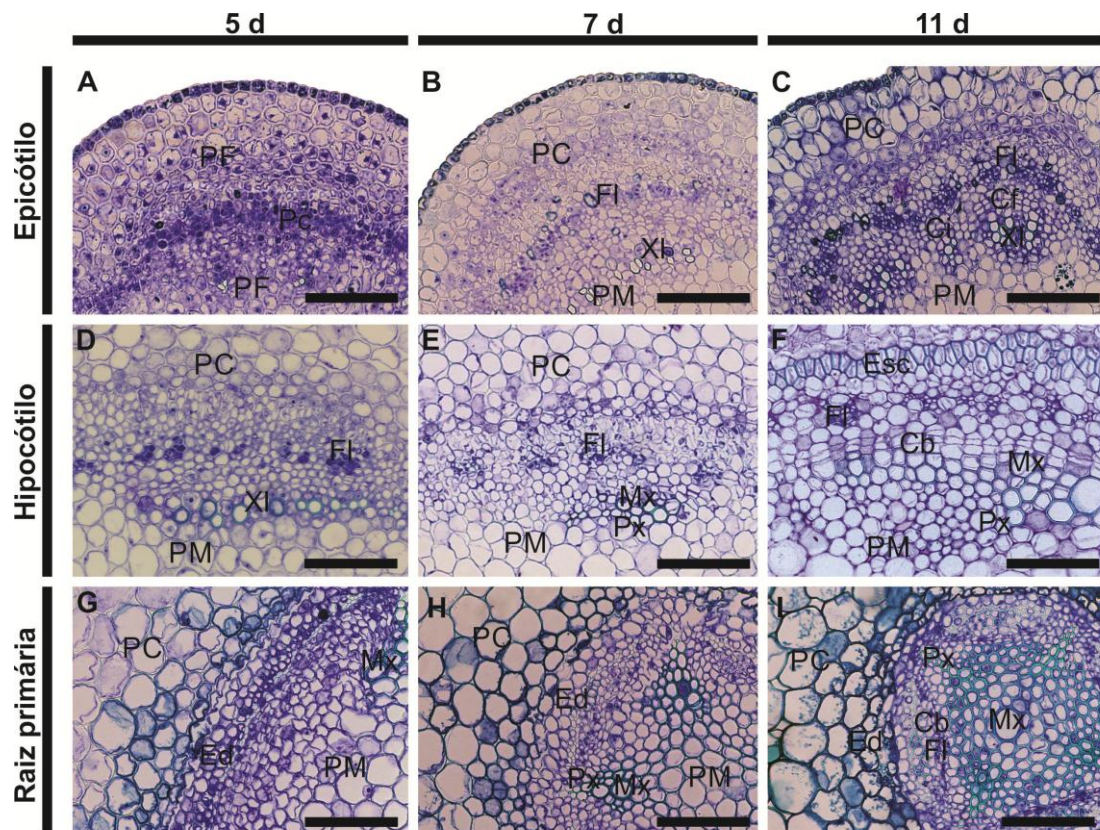


Figura 3. Análise anatômica do epicótilo, hipocótilo e raiz primária durante o desenvolvimento da plântula de *D. regia*. A-C: epicótilo; D-F: hipocótilo; G-I: raiz primária. Cb – câmbio; Cf – câmbio fascicular; Ci – câmbio interfascicular; Ed – endoderme; Esc – esclerênquima; FI – floema; Pc – procâmbio; PC – Parênquima cortical; PF – parênquima fundamental; Mx – metaxilema; Px – protoxilema; XI – xilema. Barra = 100 μ m.

A epiderme adaxial dos cotilédones apresenta poucos estômatos no 1° DAS (figura 4A) e 5° DAS (figura 4B). No 11° DAS, foram observados estômatos de maior dimensão e em maior quantidade, situados entre células epidérmicas comuns (figura 4C). A face adaxial da epiderme dos eófilos, no 7° DAS, não apresentaram estômatos (figura 4D), enquanto a face abaxial apresenta estômatos situados abaixo do nível das células epidérmicas (figura 4E). Na face abaxial dos eófilos no 11° DAS, os estômatos apresentam a mesma posição em relação às células epidérmicas que no 7° Das, entretanto, em maior número e com tamanho reduzido (figura 4F).

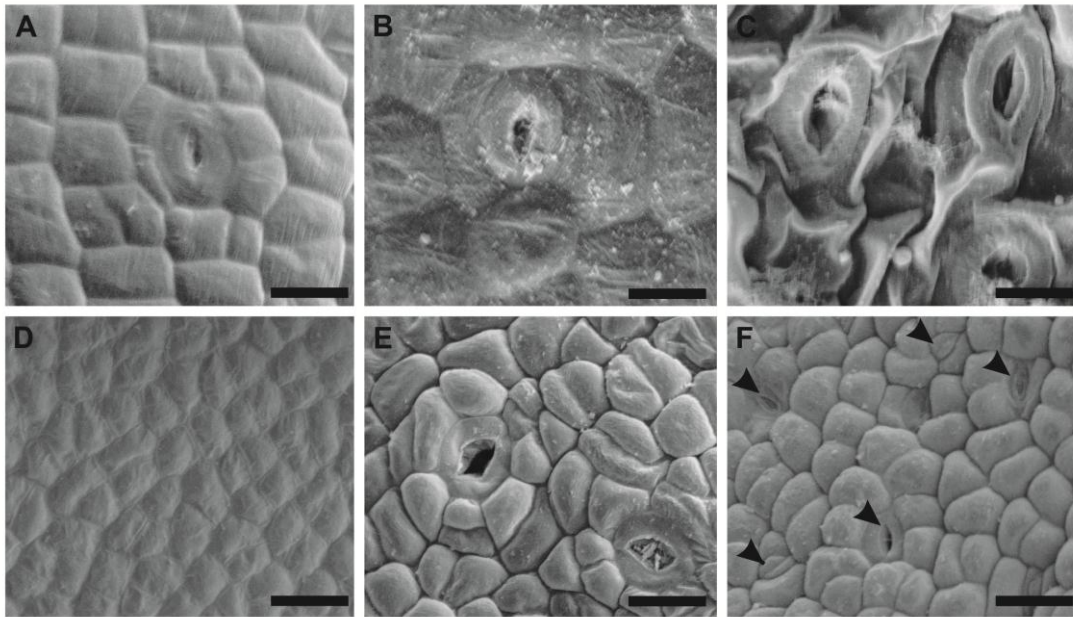


Figura 4. Análise ultraestrutural da epiderme do cotilédone e estômatos de *D. regia* durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal. A-C : cotilédone, face adaxial; D-F: estômatos. A – 1° DAS; B – 5° DAS; C – 11° DAS; D – 7° DAS, face adaxial; E – 9° DAS, face abaxial; F – 11° DAS, face abaxial. Ponta de seta: estômatos. Barra = 20 μm .

Análise das alterações celulares dos cotilédones

No 1° DAS, foi observado que o citoplasma das células do mesofilo se apresentava denso, ocupado por grânulos pequenos e agrupados (figura 5A). O citoplasma destas células ficou menos denso, com grânulos de diversos tamanhos e um pouco mais esparsos a partir do 2° e 3° DAS (figura 5B e C). Os grãos de amido tendem a ocupar a região periférica da célula do mesofilo no 5° DAS, com corpos proteicos isolados na região central da célula (figura 5D). A partir do 7° e 11° DAS, os corpos proteicos estiveram ausentes e os grãos de amido se localizaram na periferia da célula, adjacente à parede celular (figura 5E e F). Em análise ultraestrutural, foi observado que no 1° DAS, haviam vários corpos proteicos no citoplasma (figura 6A), que foram reduzindo em quantidades no 3° DAS foi possível verificar o tonoplasto (figura 6B). Glioxissomos e mitocôndria foram observados no 3° DAS (figura 6B). A partir do 5° DAS, foi visualizado um único vacúolo maior (figura 6C) e no 7° DAS, o tonoplasto encontrava-se adjacente à membrana plasmática na célula (figura 6D).

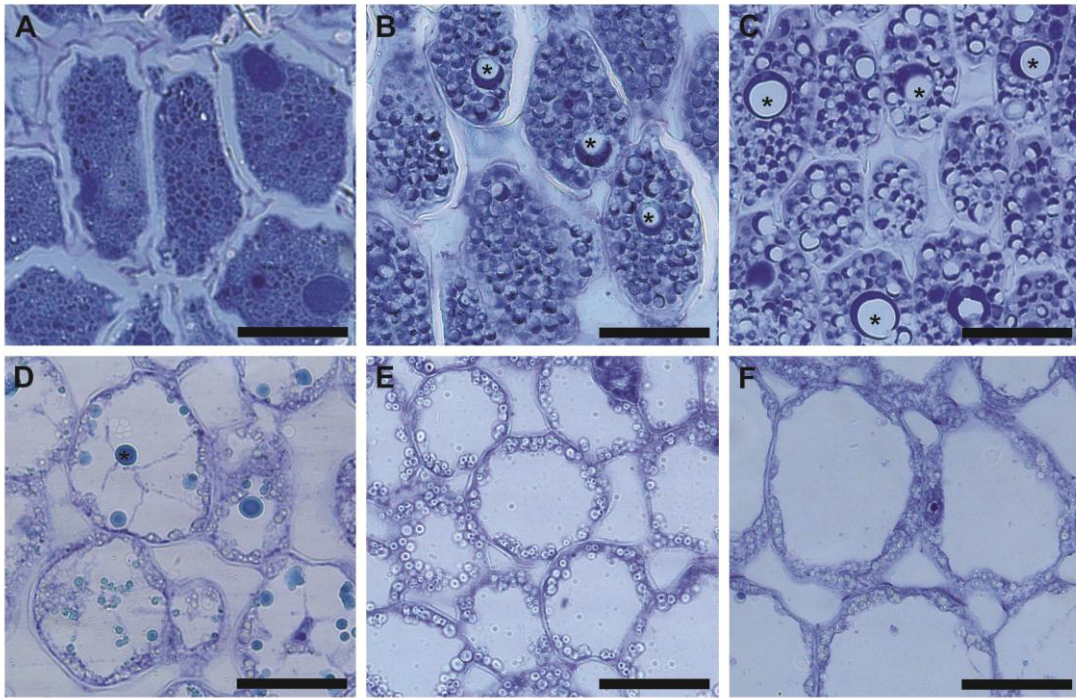


Figura 5. Alterações no citoplasma das células do mesofilo dos cotilédones de *D. regia* durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativo. A – 1° DAS, B – 2° DAS; C - 3° DAS, D – 5° DAS e E – 7° DAS; F – 11° DAS. Asteriscos(*) – corpos proteicos. Barra = 50 μm.

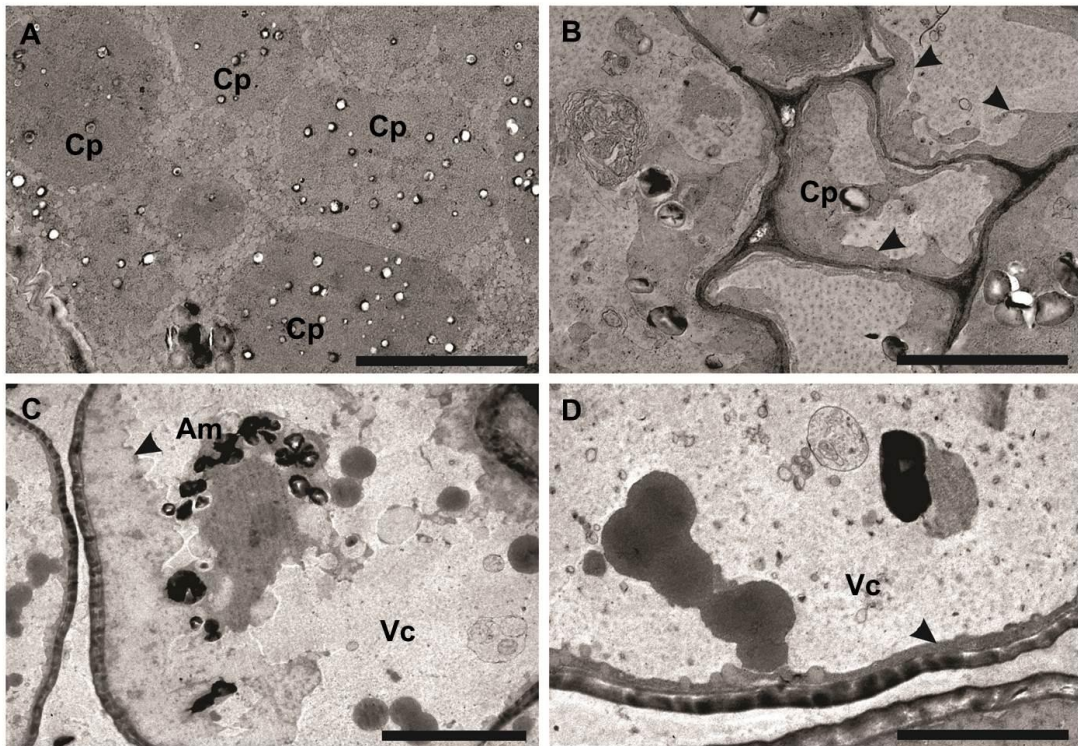


Figura 6. Análise ultraestrutural das células do mesofilo cotiledonar de *Delonix regia* entre o 1° ao 7° dias após a sementeira (DAS). A – 1° DAS; B – 3° DAS; C – 5° DAS; D – 7° DAS. Am – amido; Cp – corpos proteicos; Vc – vacúolo; cabeça de seta: tonoplasto. Barras: A, B e D = 5 μm e C = 10 μm.

Mobilização das reservas e teor de clorofila total durante a germinação e desenvolvimento da plântula

As análises histoquímicas demonstraram que nos cotilédones de *D. regia* as proteínas e lipídios eram as reservas iniciais (figura 7A e B). No 3° DAS, observou-se o consumo das reservas de proteínas com quantidade menor de corpos proteicos (figura 7D), sendo que a mobilização aconteceu de forma gradativa até o 11° DAS (figura 7G, J e M), sendo que nos 7° e 11° DAS, as reservas de proteínas se encontravam exauridas (figura 7J e M). Por outro lado, na mobilização dos lipídios, observou-se consumo no 3° DAS (figura 7E), sendo que permaneceu estável até o 5° DAS (figura 7H), com consumo gradativo até o 11° DAS (figura 7K e N), com corpos lipídicos exauridos no 11° DAS (figura 7N). Os grãos de amido não foram observados no 1° DAS (figura 7C), enquanto poucos grãos de amido foram detectados no 3° DAS (figura 7F). Aos 5° DAS, observou-se maior quantidade de grãos de amido (figura 7I) e no 7° DAS, houve consumo de amido (figura 7L). Entre os 7° e 11° DAS, o consumo dos grãos de amido permaneceu constante (figura 7L e Q). Polissacarídeos neutros estiveram ausentes no 1° DAS (Figura 7D) e 3° DAS (figura 7H). No 5° DAS, houve a síntese destes polissacarídeos (figura 7L), e nos 7° DAS (figura 7P) e 11° DAS (figura 7T) foi verificado que estes compostos foram consumidos.

Nas análises bioquímicas, a reserva inicial de lipídios totais foi de aproximadamente 0,044 mg/g de peso fresco (mg/g de PF) de cotilédone no 1° DAS, sendo que no 3° DAS foi de 0,034 mg/g de PF, e indicou consumo dos lipídios e, no 5° DAS, permaneceu constante com 0,033 mg/g de PF (figura 8A). Houve consumo gradativo até o 11° DAS, atingindo aproximadamente 0,008 mg/g de PF. A reserva inicial de proteínas totais foi de aproximadamente 23 mg/g de PF de cotilédone no 1° DAS e observou-se consumo crescente desta reserva até o 11° DAS, que atingiu aproximadamente 11 mg/g de PF (figura 8B). A concentração inicial de açúcares solúveis totais (AST) foi de aproximadamente 27,6 mg/g de PF de cotilédone no 1° DAS e ao 5° DAS, observou um pico de aproximadamente 50 mg/g de PF, sendo que até o 11° DAS houve consumo crescente de AST, atingindo 31,5 mg/g de PF (figura 8C). Durante toda a germinação e desenvolvimento pós-seminal, observou-se que o teor de clorofila total inicial foi de 10,77 mg/g PF e 19,52 mg/g PF, ao final do desenvolvimento pós-seminal.

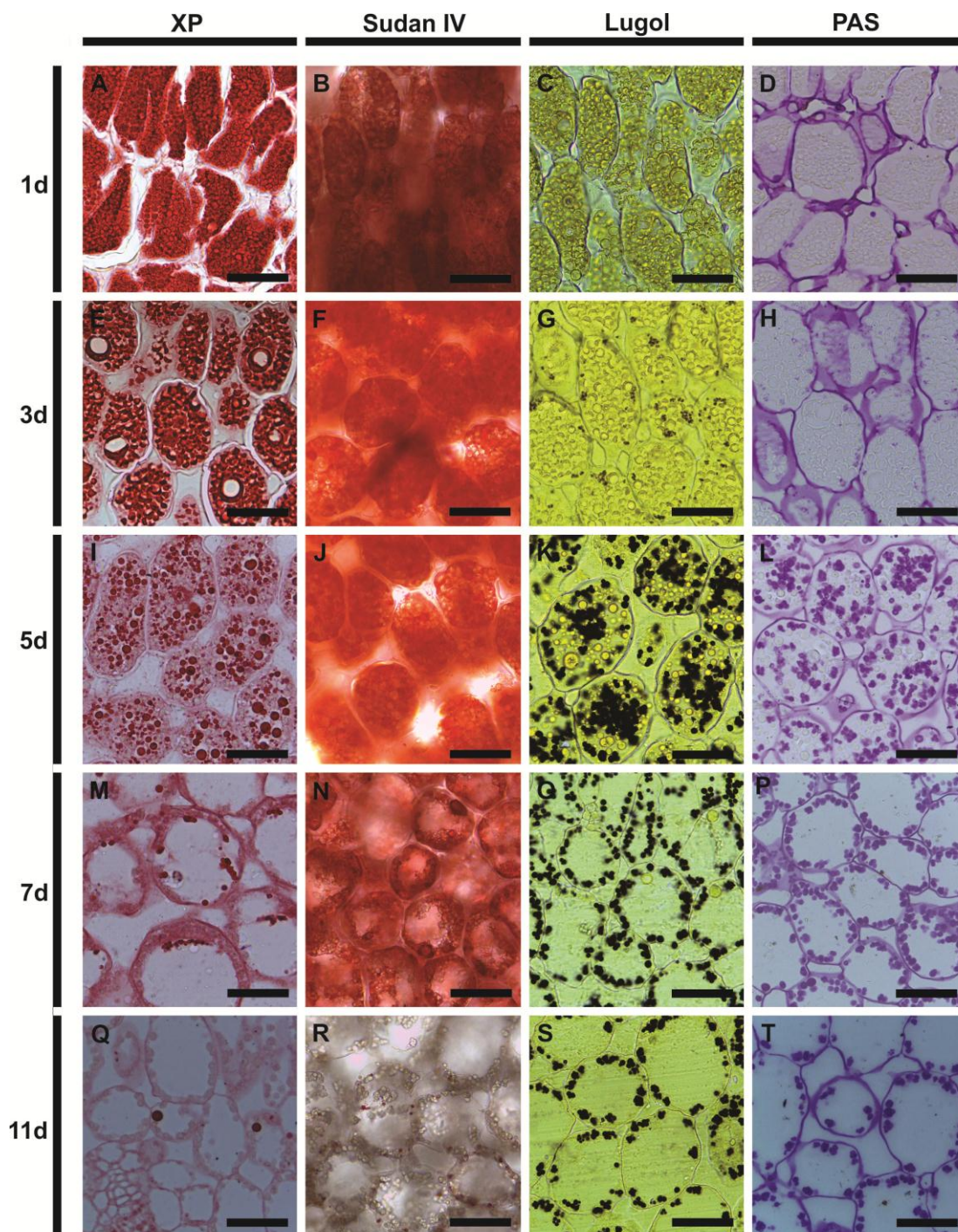


Figura 7. Análise da mobilização de reserva nos cotilédones de *D. regia*, por testes histoquímica, durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal. Secções transversais dos cotilédones submetidas ao Xylidine Ponceau (XP) para detecção de proteínas totais (Figura 7A, E, I, M e Q), ao sudan IV para detecção de lipídios (Figura 7B, F, J, N e R), ao lugol para detecção de amido (Figura 7C, G, K, O e S) e ao PAS/reagente de Schiff para carboidratos totais (Figura 7D, H, L, P e T). Barras = 50 μ m.

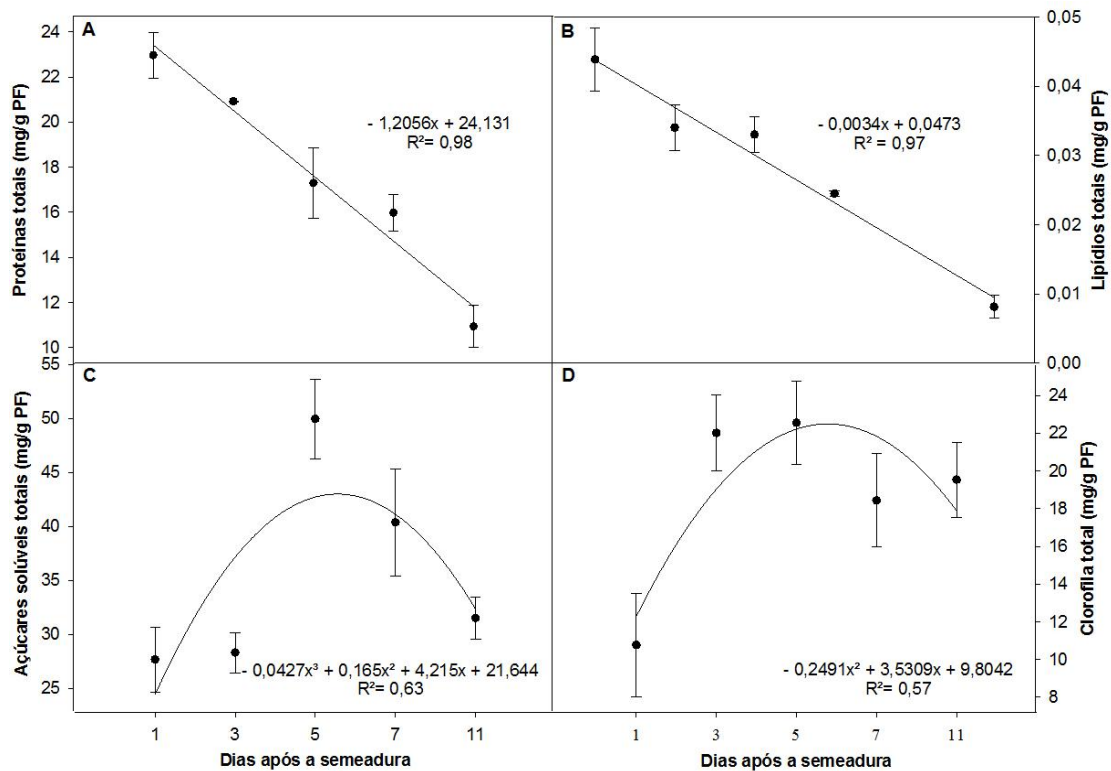


Figura 8. Mobilização das reservas dos cotilédones de *D. regia* durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal. A – lipídios totais em miligrama por grama de peso fresco de biomassa (mg/g PF); B – proteínas totais em mg/g PF; C – carboidratos solúveis totais em mg/g PF; D – clorofila total em mg/g PF.

Consumo do amido desde a germinação até o estabelecimento da planta jovem

A figura 9 demonstra o consumo dos grãos de amido no mesofilo cotiledonar de *Delonix regia*. Conforme já anteriormente descrito nas análises histoquímicas, no 1° DAS não foram observados grãos de amido no mesofilo cotiledonar (Figura 9A). No 5° DAS, verificou a houve síntese de amido (Figura 9B). Após este período, foi verificado consumo gradativo desta reserva (Figura 9C a H). Aos 11° DAS, duas camadas subepidérmicas do parênquima lacunoso já não apresentavam grãos de amido (Figura 9C) e 13° DAS, não foram encontrados grãos de amido na primeira camada do parênquima paliçádico, enquanto no parênquima lacunoso, o amido foi consumido nas três camadas mais externas, com grânulos reduzidos na quarta camada (Figura 9D). Esse padrão de mobilização prosseguiu no 16° DAS (Figura 9E) e no 21° DAS (Figura 9F). No 24° DAS, os grãos de amido foram observados somente na porção central do mesofilo até a face adaxial da epiderme (Figura 9G). Sendo que no 30° DAS, o mesofilo cotiledonar não apresentava mais grãos de amido e coincidiu com o início da senescência dos cotilédones nas plantas jovens de *D. regia* (Figura 9H). Assim, foi

observado que consumo de amido ocorreu em um padrão centrípeto, ou seja, do lado externo para o interior da folha cotiledonar, conforme modelo esquemático na figura 10.

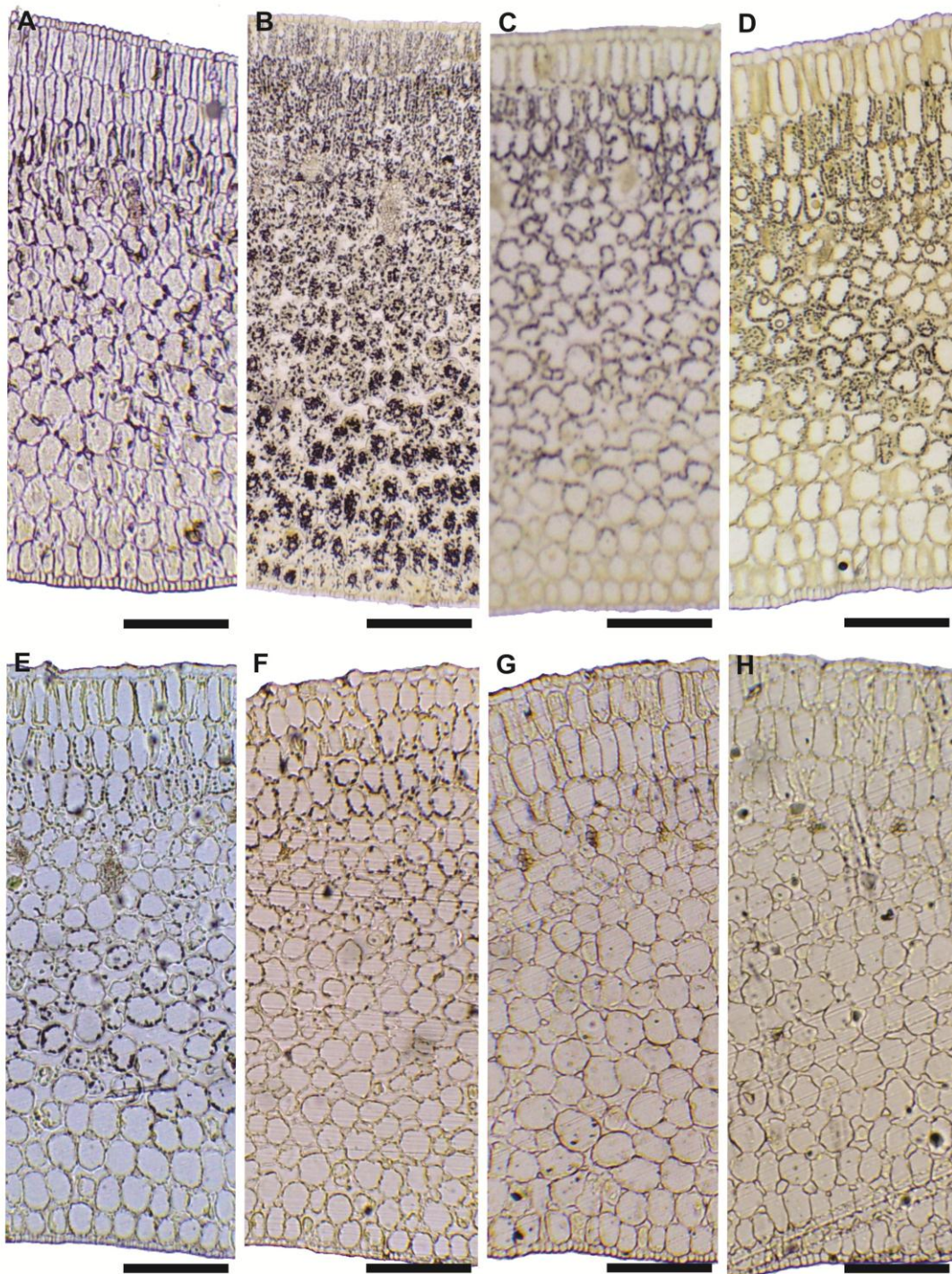


Figura 9. Análise do consumo de amido durante a germinação até o estabelecimento de plantas jovens de *D. regia*, do 1° ao 30° DAS. Aspecto geral do cotilédone em secção transversal. A – 1° DAS; B – 5° DAS; C – 11° DAS; D – 13° DAS; E – 16° DAS; F – 21° DAS; G – 24° DAS; H – 30° DAS (Barra = 200 μ m).

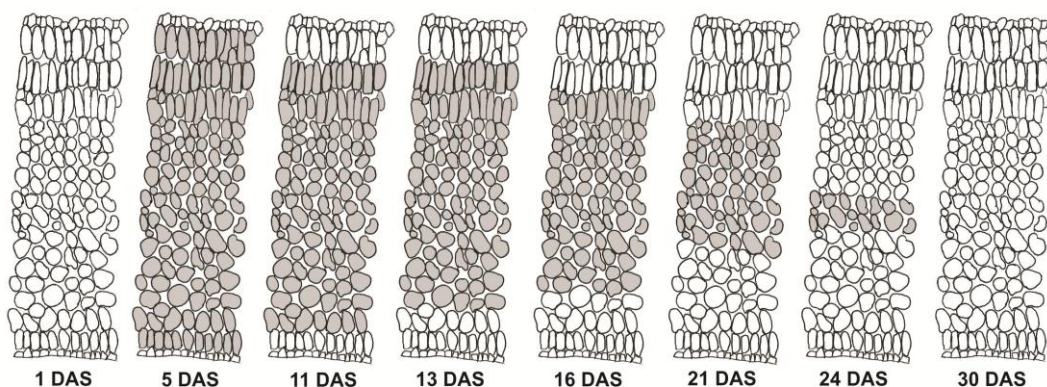


Figura 10. Modelo esquemático do consumo de amido durante a germinação até o estabelecimento das plantas jovens de *D. regia*.

Discussão

Estes dados indicam que *Delonix regia* apresenta características morfoanatômicas de espécie adaptada a regiões tropicais. As plântulas de *D. regia* são fanero-epígeo-foliáceo (PEF), conforme a exposição, posição e textura dos cotilédones por Miquel (1987) e Garwood (1996). Espécies da subfamília Caesalpinoideae geralmente possuem plântulas do tipo PEF (GATES, 1951), entretanto Duke e Polhill (1981) ressaltaram que os cotilédones podem ser foliáceos e carnosos neste grupo. De fato, há maior ocorrência de cotilédones foliáceos em Caesalpinoideae, como verificados em estudos de Oliveira (1991) e Ressel et al. (2004).

A ocorrência de plântulas do tipo PEF é maior em espécies arbóreas em florestas tropicais (ZANNE et al., 2005; BARALOTO e FORGET, 2007; LOBO et al., 2014) e em áreas de Cerrado (RESSEL et al., 2004). Apesar de plântulas do tipo PEF estarem inicialmente mais susceptíveis às condições adversas do ambiente e aos predadores, estas se desenvolvem e crescem de forma mais rápida que as plântulas dos demais tipos morfofuncionais (BARALOTO e FORGET, 2007). De acordo com Ng (1978), o desenvolvimento e crescimento rápido se devem aos cotilédones apresentarem fotossíntese nos estádios iniciais de desenvolvimento da plântula. Além disso, o desenvolvimento da raiz primária nos primeiros estágios de vida nas plântulas PEF, é extremamente importante para fornecer água e nutrientes, além de sustentá-la (LOBO et al., 2014). De fato, pode-se observar que as plântulas de *D. regia* completam seu desenvolvimento ao 11^o DAS, com grande incremento de matéria fresca e alongamento do eixo embrionário, que é um período relativamente curto quando comparado por outras espécies da família Fabaceae e subfamília Caesalpinoideae, como em

Dimorphandra mollis (FERREIRA et al., 2001), *D. wilsonii* (LOPES e MATHEUS, 2008) e *Guibourtia hymenifolia* (BATTILANI et al., 2011). Há correlação entre o tipo morfofuncional das plântulas com as características ecológicas, em que plântulas do tipo PEF geralmente são pioneiras na sucessão inicial de ambientes naturais e tendem a se desenvolver e crescer de forma rápida para competir por espaço e luminosidade (IBARRA-MANRIQUEZ et al., 2001 e RESSEL et al., 2004).

Estudos anatômicos que envolvem o desenvolvimento e crescimento inicial de espécies florestais são escassos e dessa forma, devem merecer mais destaque, por fornecer dados que suportem o comportamento destas espécies nos estágios iniciais de vida. Neste estudo, a anatomia possibilitou observar que o epicótilo apresenta tecidos meristemáticos no 5° DAS, possivelmente porque foi o primeiro estágio que esta parte surgiu durante o desenvolvimento da plântula de *D. regia*. Estas análises ainda permitiram evidenciar que o epicótilo, hipocótilo e a raiz primária da plântula de *D. regia* apresentam início de desenvolvimento da estrutura secundária aos 11° DAS. Este período pode ser considerado rápido quando comparado às plântulas de outras espécies. Por exemplo, o epicótilo, hipocótilo e raiz primária ainda se encontra em estrutura primária aos 18° DAS em *Apuleia moleis* (REIS et al., 2016). *Vitex megapotâmica* (COSMO et al., 2008) e *Campomanesia xantocarpa* (GOGOSZ et al., 2010) possuem plântulas que apresentaram estrutura secundária nestas mesmas partes aos 20° e 30° DAS, respectivamente. O rápido desenvolvimento dos feixes vasculares possibilita maior eficiência na condução dos fotoassimilados na plântula, que são provenientes da fotossíntese realizada pelos cotilédones e eófilos (TERRAZAS et al., 2011).

As plântulas PEF são exclusivamente fotossintetizantes (RESSEL et al., 2004). Entretanto em *D. regia* observou-se que estes cotilédones continham reservas iniciais de lipídios e proteínas, assim como em *Apuleia leiocarpa* (PONTES et al., 2002), *Caesalpinia peltophroides* (CORTE et al., 2006), *Hymenaea courbaril* (MELO et al., 2009), *Schizolobium parahyba* (MAGALHÃES et al., 2010) e *Melanoxylon brauna* (Ataíde et al., 2017). Em espécies com plântulas PEF, as reservas iniciais são rapidamente consumidas e os cotilédones assumem função fotossintética logo no início do desenvolvimento das plântulas (KITAJIMA, 2002), assim como observado em *D. regia*. A função fotossintética das plântulas PEF é de enorme vantagem para que as plântulas cresçam e se estabeleçam no meio (KITAJIMA, 2002; RESSEL et al., 2004).

A predominância de lipídios e proteínas nas reservas iniciais dos cotilédones de *D. regia* pode ser fator importante correlacionado no rápido crescimento e desenvolvimento desta espécie. Em *D. regia*, a concentração de lipídios foi inferior às demais reservas, no entanto, os lipídios geram duas vezes mais energia do que os carboidratos, que pode ser uma característica vantajosa no rápido desenvolvimento das plântulas (FINKELSTEIN e GRUBB, 2002). O aumento da proporção de ATP/ADP e ATPsintase foi correlacionado com a mobilização de reservas de lipídios (MA et al., 2016). A embebição das sementes ocasiona aumento de oxigênio e CO₂, que indica a respiração celular durante a retomada do metabolismo, na fase estacionária da germinação (NONOGAKI et al., 2011). As vias da respiração celular incluem a glicólise dos carboidratos e a beta-oxidação dos ácidos graxos, que geram intermediários para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), além de fornecer ATP pela cadeia transportadora de elétrons (GRAHAM, 2008; VAN DONGEN et al., 2011; ROSENTAL et al., 2014; MA et al., 2016). Entretanto, os lipídios não são reservas prontamente utilizadas pelas sementes. Dessa forma, é necessário que sejam convertidos em amido, através da beta oxidação, ciclo do glioxilato e gliconeogênese (PRITCHARD et al., 2002; GRAHAM, 2008; MA et al., 2016). Por sua vez, durante a germinação, as proteínas são clivadas por proteases e enzimas requeridas para a mobilização de lipídios e formam aminoácidos livres, para a biossíntese de novas proteínas e geração de energia (TAN-WILSON e WILSON, 2010). De fato, durante a germinação de sementes de *D. regia*, a reserva de lipídios e proteínas presentes nos cotilédones foi mobilizada acentuadamente, enquanto houve a síntese de amido no 5º DAS.

As reservas de lipídios e proteínas estão armazenadas nas sementes em corpos lipídicos e proteicos, respectivamente (TAN-WILSON e WILSON, 2010; HUANG, 2018). Os corpos lipídicos ou oleossomos são organelas especializadas que além de estocar lipídios sob a forma de triacilgliceróis e esteróis (DERUYFFELAERE et al., 2018; HUANG, 2018). Células parenquimáticas dos cotilédones de *D. regia* apresentaram citoplasma repletos de corpos lipídicos e proteicos na fase inicial da germinação, que reduziram significativamente em quantidade e ao final do desenvolvimento da plântula, e enquanto ainda presentes, passaram a ocupar a periferia da célula. Esse padrão de arranjo foi similar ao observado nos cotilédones de *Prosopis juliflora* (GALLÃO et al., 2007). É evidente que nas células cotiledonares, além da mobilização das reservas durante a germinação e desenvolvimento das plântulas, ocorre

também a diferenciação celular. Em *D. regia*, a mudança do arranjo dos corpos lipídicos e proteicos e dos grãos de amido, para a posição periférica no citoplasma, deve-se a fusão de pequenos vacúolos em um único vacúolo grande centralizado, à medida que o cotilédone se desenvolve, conforme também descrito por Zienkiewicz et al. (2011). Espécies com sementes aleuro-oleaginosas, como *D. regia*, tendem a apresentar uma maior quantidade de glioxissomos nas células dos tecidos de reserva. Essa organela apresenta duas enzimas exclusivas, a malato sintase e isocitrato liase, envolvidas no ciclo do glioxilato (GRAHAM, 2008). Além disso, os proplastídeos se diferenciam em plastídeos para que o cotilédone possa realizar a fotossíntese (ZIENKIEWICZ et al., 2011).

Os cotilédones de *D. regia* apresentaram as reservas de proteínas e lipídios bastante exauridas no 11° DAS. Além disso, o teor de clorofila total decresceu neste estágio, e nos faz supor que os eófilos assumiram a fotossíntese, apesar do cotilédone ainda desempenhar esta função em menor proporção. O maior incremento de matéria fresca e alongamento dos cotilédones e eixo embrionário, a produção de clorofila e o aumento no número de estômatos na face adaxial da epiderme dos cotilédones e face abaxial dos eófilos das plântulas de *D. regia* podem reforçar esta hipótese, assim como foram observados por Corte et al. (2006) e Wiedlich et al. (2006). Além disso, Ghaffaripour et al. (2017) também verificaram existir correlação positiva entre o teor de clorofila e o ganho de biomassa nas plântulas de *Tamarindus indica*. Em *D. regia*, o alongamento do eixo hipocótilo-radícula e incremento de biomassa foi relativamente maior após o início do desenvolvimento dos eófilos nas plântulas, e permite indicar a função de fotossíntese desempenhada por estes órgãos. Em suma, os eventos da mobilização das reservas com o alongamento do eixo embrionário se encontram sintetizados na Figura 11.

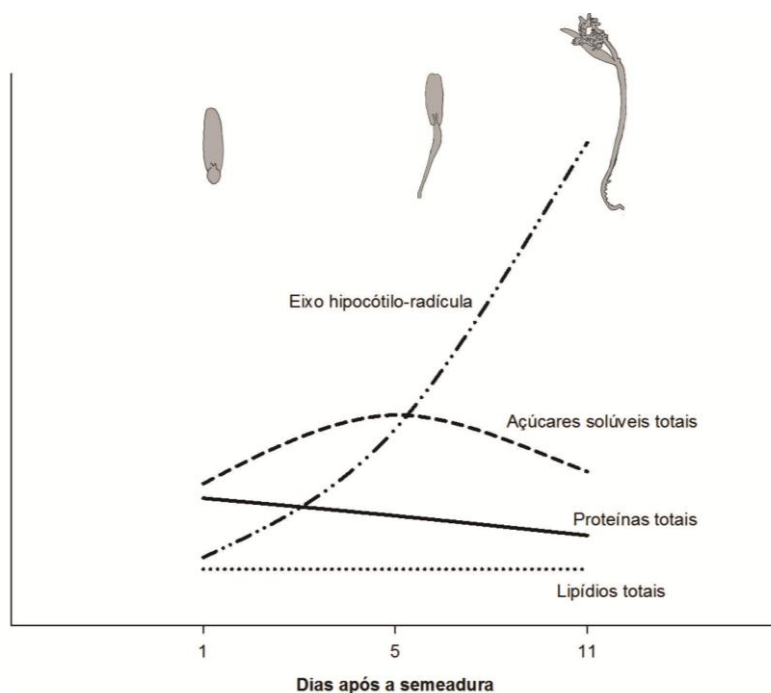


Figura 11. Síntese dos eventos morfológicos e da mobilização de reserva durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal de *D. regia*.

As análises do consumo de amido durante a germinação até o estabelecimento das plantas jovens de *D. regia* permitiram verificar que os grãos de amido foram decrescendo até a senescência dos cotilédones aos 30° DAS. Similarmente, em *Schilozobium parahyba*, a senescência dos cotilédones ocorreu aos 35° DAS (WIEDLICH et al., 2010). Os resultados obtidos no estudo do consumo de amido permitem inferir que possivelmente, a planta jovem de *D. regia* se torna autotrófica bem antes dos cotilédones senescerem. Essas inferências se dão a partir de dados *ainda não publicados*, e foi observado que os cotilédones de *D. regia* perderam a coloração verde e apresentaram necroses à medida que ocorre o estabelecimento da planta jovem. Assim, os cotilédones gradativamente diminuíram a função fotossintética até não desempenharem mais alguma função na planta. Isso pode ser corroborado com o registro de escassos grãos de amido nas células do parênquima do mesofilo do cotilédone, principalmente a partir do 21° DAS. Concomitantemente, ainda foi observado que o consumo de amido nos cotilédones de *D. regia* seguiu um padrão centrípeto, em que foram exauridos a partir das camadas subepidérmicas, em maior proporção nas células do parênquima lacunoso do mesofilo cotiledonar. Esta característica pode reafirmar a perda gradativa da função fotossintética dos cotilédones.

A análise obtida para consumo de amido e o padrão centrípeto nesta pesquisa são inéditas para espécie florestal.

O alto potencial das espécies exóticas de Fabaceae, quando em comparação com as espécies nativas, para o uso de recuperação de áreas naturais degradadas foi evidenciado por Silva et al. (2018). Esses autores verificaram que *Bauhinia forficata* demonstrou alto crescimento inicial e maior incremento de biomassa do que as demais nativas estudadas. Assim, estes estudos demonstraram o uso de espécies de rápido desenvolvimento e crescimento, como *D. regia*, apesar de ser exótica, pode ser interessante em programas de tecnologia de produção de mudas para recuperação de áreas naturais degradadas.

Conclusão

As análises obtidas permitiram verificar que *D. regia* possuiu desenvolvimento e crescimento rápido. Conjuntamente, os estudos morfoanatômicos e da mobilização de reserva, demonstram que esta espécie está adaptada às regiões tropicais. Esta pesquisa possibilitou ampliar o conhecimento dos processos da biologia da germinação desta espécie em ecossistemas naturais e na tecnologia de produção de mudas, para fins de regeneração e econômicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Msc. Henrique Camargo e à Dr.^a Tatiane Oliveira, do Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), Instituto de Física, da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil, pelo suporte técnico nas análises em Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão.

Referências Bibliográficas

ABOZEID, A.; TURKI, Z.; EL-SHAYEB, F.; TANG, Z. Embryo and seedling morphology of some *Trigonella* L. species (Fabaceae) and their taxonomic importance. *Flora*. 230: 57–65. 2017. Doi: 10.1016/j.flora.2017.02.026.

ALMEIDA, D.S. Alguns princípios de sucessão natural aplicados ao processo de recuperação. In: *Recuperação ambiental da Mata Atlântica* [online]. 3rd ed. rev. and ampl. Ilhéus, BA: Editus, UESC. 2016, pp. 48-75.

- ATAÍDE, G.M.; BICALHO, E.M.; DIAS, D.C.F.S.; CASTRO, R.V.O.; ALVARENGA, E.M. Overcoming seed dormancy of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. Revista Árvore. 37(6): 1145-1152. 2013. Doi: 10.1590/S0100-67622013000600016.
- ATAÍDE, G.M.; BORGES, E.E.L.; PICOLI, E.A.T.; LEITE FILHO, A.T.; FLORES, A.V. Changes in seed reserves of *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae Caesalpinioideae) during germination at different temperatures. Revista Brasileira de Ciências Agrárias. 12(3): 372-379. 2017. Doi: 10.5039/agraria.v12i3a5454.
- BARALOTO, C.; FORGET, P.M. Seed size, seedling morphology and response to deep shade and damage in neotropical rain forest trees. American Journal of Botany. 94(6): 901-911. 2007. Doi: 10.3732/ajb.94.6.901.
- BARNABY, A. G.; REID, R.; RATTRAY, V.; WILLIAMS, R.; DENNY, M. Characterization of Jamaican *Delonix regia* and *Cassia fistula* Seed Extracts. Biochemistry Research International. 1-8. 2016. Doi: 10.1155/2016/3850102.
- BATTILANI, J.L.; SANTIAGO, E.F.; DIAS, E.S. Morphology of fruits, seeds, seedling and sapling of *Guibourtia hymenifolia* (Morici.) J. Leonard (Fabaceae). Revista Árvore. 35(5): 1089-1098. 2011. Doi: 10.1590/S0100-67622011000600015.
- BETANCUR-ANCONA, D.; PACHECO-AGUIRRE, J.; CASTELLHANOS-RUELAS, A.; CHEL-GUERREIRO, L. Microencapsulation of papain using carboxymethylated flamboyant (*Delonix regia*) seed gum. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 12: 67-72. 2011. Doi: 10.1016/j.ifset.2010.11.002.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seed Physiology of development and germination. 2nd edition. New York: Plenum Press. 1994.
- BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. The Plant Cell. 9: 1055-1066. 1997. Doi: 10.1105/tpc.9.7.1055.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254. 1976. Doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- CHAI, W.M.; SHI, Y.; FENG, H.L.; QIU, L.; ZHOU, H.C.; DENG, Z.W.; YAN, C.L.; CHEN, Q.X. NMR, HPLC-ESI-MS, and MALDI-TOF MS analysed of condensed

tannins from *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. and their bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 5013-5022. 2012. Doi: 10.1021/jf300740d.

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.A.; VENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A.A. Mobilization of the reserves during germination of seeds and growth of seedlings of *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista Árvore*. 30(6): 941-949. 2006. Doi: 10.1590/S0100-67622006000600009

COSMO, N.L.; GOGOSZ, A.M.; NOGUEIRA, A.C.; BONA, C.; KUNIYOSHI, Y.S. Fruit and seed morphology and morpho-anatomy of seedlings of *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (Lamiaceae). *Acta Botanica Brasílica*. 23(2): 389-397. 2009. Doi: 10.1590/S0102-33062009000200010.

CROSS, J.M.; VON KORFF, M.; ALTMANN, T.; BARTZETKO, L.; SULPICE, R.; GIBON, Y.; PALACIOS, N.; STITT, M. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology*. 142: 1574–1588. 2006. Doi: 10.1104/pp.106.086629.

DANTAS, B.F.; CORREIA, J.S.; MARINHO, L.B.; ARAGÃO, C.A. Biochemical changes during imbibition of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. seeds. *Revista Brasileira de Sementes*. 30(1): 221-227, 2008. Doi: 10.1590/S0101-31222008000100028.

DERUYFFELAEREA, C; PURKRTOVAA, Z.; BOUCHEZA, I.; COLLETA, B.; CACASA, J.L.; CHARDOTA, T.; GALLOISB, J.L.; D'ANDREAA, S. PUX10 is a CDC48A Adaptor Protein that Regulates the Extraction of Ubiquitinated Oleosins from Seed Lipid Droplets in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 30(9): 2116-2136. 2018. Doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00275>.

DOMAN, D.C.; WALKER, J.C.; TRELEASE, R.N.; MOORE, B.D. Metabolism of carbohydrate and lipid reserves. *Planta*. 155:502-510. 1982. Doi: 10.1007/BF01607574.

DU PUY, D.J.; PHILLIPSON, P.P.; RABEVOHITRA, R. The genus *Delonix* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Caesalpinieae) in Madagascar. *Kew Bulletin*. 50: 445-475. 1995. Doi: 10.2307/4110322.

DUARTE, M.M.; PAULA, S.R.P.; FERREIRA, F.R.L.; NOGUEIRA, A.C. Morphological characterization of fruit, seed and seedling and germination of *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae) ('Jatobá'). *Journal of Seed Science*. 38(3): 204-211. 2016. Doi: 10.1590/2317-1545v38n3159734.

- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3): 350-356. 1956. Doi: 10.1021/ac60111a017.
- DUKE, J.A.; POLHILL, R.M. Seedlings of Leguminosae. In: Polhill, R.M.; Raven, P.H. (eds.). *Advances in legume systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, Part 2: 941-949. 1981.
- FERREIRA, R.A.; BOTELHO, S.A.; DAVIDE, A.C.; MALAVASI, M.M. Morphology of fruits, seeds, seedlings and saplings of *Dimorphandra mollis* Benth. - faveira (Leguminosae Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica*. 24(3): 303-309. 2001. Doi: 10.1590/S0100-84042001000300009.
- FINKELSTEIN S.; GRUBB, P.J. Lipid concentration in the embryo–endosperm fraction of seeds of Australian tropical lowland rainforest trees: relevance to defence and dispersal. *Seed Science Research*, 12(3): 173–180. 2002. Doi:10.1079/ssr2002109.
- GALLÃO, M.I.; VIEIRA, I.G.P.; MENDES, F.N.P.; SOUZA, A.S.N.; BRITO, E.S. Reserve mobilisation in mesquite (*Prosopis juliflora*) seed (Leguminosae). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87:2012–2018. 2007. Doi: 10.1002/jsfa.2936.
- GARWOOD, N.C. Functional morphology of tropical tree seedlings. In: Swaine, M.D. (et al.) *The Ecology of Tropical Forest Tree Seedlings*. Pp. 59-129. Paris, Unesco. 1996.
- GATES, R.R. Epigeal germination in the Leguminosae. *Botanical Gazette*. 113: 151-157. 1951.
- GHAFFARIPOUR, S.; VAN DEN BILCKE, N.; SAMSON, R. The importance of seed reserve on performance and breeding of tamarind seedlings. *Scientia Horticulturae*. 222: 145-152. 2017. Doi:10.1016/j.scienta.2017.04.032.
- GOGOSZ, A.M.; COSMO, N.L.; BONA, C.; SOUZA, L.A. Morphology and anatomy of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. seedlings (Myrtaceae). *Acta Botanica Brasílica*. 24(3): 613-623. 2010. Doi: 10.1590/S0102-33062010000300003.
- GRAHAM, I.A. Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 115-142. 2008. Doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092938.

- GRIS, D.; TEMPONI, L.G.; MARCON, T.R. Native species indicated for degraded area recovery in western Paraná, Brazil. *Revista Árvore*. 36(1): 113-125. 2012. Doi: [10.1590/S0100-67622012000100013](https://doi.org/10.1590/S0100-67622012000100013).
- GUERRA, M.E.C.; MEDEIROS FILHO, S.; GALLÃO, M.I. Seed, seedlings and germination morphology of *Copaifera langsdorfii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Cerne*. 12(4): 322-328. 2006.
- GURGEL, E.S.C.; SANTOS, J.U.M.; LUCAS, F.C.A.; BASTOS, M.N.C. Leguminosae seedlings morphology and the systematic potential. *Rodriguésia* 63(1): 065-073. 2012. Doi: [10.1590/S2175-78602012000100006](https://doi.org/10.1590/S2175-78602012000100006).
- HUANG, A.H.C. Structure of plant seed oil bodies. *Current Opinion of Structural Biology*. 4: 493-498. 1994. Doi: [10.1016/S0959-440X\(94\)90210-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(94)90210-0).
- HUANG, A.H.C. Plant Lipid Droplets and Their Associated Proteins: Potential for Rapid Advances. *Plant Physiology*. 176: 1894-1918. 2018. Doi: [10.1104/pp.17.01677](https://doi.org/10.1104/pp.17.01677).
- IBARRA-MANRÍQUEZ, G.; RAMOS, M.M.; OYAMA, K. Seedling functional types in a lowland rain forest in Mexico. *American Journal of Botany*. 88(10): 1801–1812. 2001. Doi: [10.2307/3558356](https://doi.org/10.2307/3558356).
- JAGANATHAN, G.K.; WU, G.R.; HAN, Y.Y.; LIU, B.L. Role of the lens in controlling physical dormancy break and germination of *Delonix regia* (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Plant Biology*. 19(1): 53-60. 2016; Doi: [10.1111/plb.12451](https://doi.org/10.1111/plb.12451).
- JOHANSEN, D. A. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill. 1940.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138. 1965.
- KITAJIMA K. Do shade-tolerant tropical tree seedlings depend longer on seed reserves? Functional growth analysis of three Bignoniaceae species. *Functional Ecology*. 16: 433–444. 2002. Doi: [10.1046/j.1365-2435.2002.00641.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2002.00641.x).
- KLERK, G.J.; WILLEKENS, P.; KOK, H.; JACOBSEN, J.V. AMYLOLYTIC activity in germinated *Agrostemma githago* L. seeds. *Planta*. 168: 77- 83. 1986. Doi: [10.1007/BF00407012](https://doi.org/10.1007/BF00407012).
- LI, C.; GILBERT, R.G. Progress in controlling starch structure by modifying starch-branching enzymes. *Planta*. 243(1):13-22. 2015. Doi: [10.1007/s00425-015-2421-2](https://doi.org/10.1007/s00425-015-2421-2).

- LOBO, G.A.; SANTANA, D.G.; SALOMÃO, A.N.; REHBEIN, L.S.; WIELEWICKI, A.P. A technological approach to the morphofunctional classification of seedlings of 50 Brazilian forest species. *Journal of Seed Science*. 36(1): 87-93. 2014. Doi: 10.1590/S2317-15372014000100011.
- LOPES, J.C.; MATHEUS, M.T. Morphological characterization of seeds, seedlings and germination of *Dimorphandra wilsonii* Rizz. – faveiro-de-wilson (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Sementes*. 30(1): 96-101. 2008.
- LOPES, R.M.F.; FREITAS, V.L.O.; BARBOSA, P.M.M. Structure of the tree component in areas of cerrado in São Tomé das Letras, MG. *Revista Árvore*. 37(5): 801-813. 2013. Doi: 10.1590/S0100-67622013000500003.
- MA, Z; MARSOLAIS, F; BERNARDS, M.A.; SUMARAH, M.W.; BYKOVA, N.V.; IGAMBERDIEV, A.U. Glyoxylate cycle and metabolism of organic acids in the scutellum of barley seeds during germination. *Plant Science*. 248: 37-44. 2016. Doi: 10.1016/j.plantsci.2016.04.007.
- MAGALHÃES, S. R.; BORGES, E. E. L.; BERGER, A. P. A. Seed reserve mobilization in the embryonic axis and cotyledons of *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake during the germination. *Ciência Florestal*. 20(4): 589-595. 2010. Doi: 10.5902/198050982417 .
- MCMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*. 23: 99-108. 1948.
- MELO, Z.L.O.; GONÇALVES, J.F.C.; MAZZAFERA, P.; SANTOS, D.Y.A.C. Mobilization of seed reserves during germination of four tropical species of the Amazon Rainforest. *Seed Science and Technology*, 37(3): 597–607.2009. Doi:10.15258/sst.2009.37.3.09.
- MENA-ALÍ, J. I.; ROCHA, O.J. Selective seed abortion affects the performance of the offspring in *Bauhinia unguolata*. *Annals of Botany*. 95: 1017–1023, 2005. doi:10.1093/aob/mci109.
- MIQUEL, S. Morphologie fonctionnelle de plantules d'espèces forestières du Gabon. *Bulletin Muséum National d'Histoire Naturelle. Serie 4, Section B, Adansônia Botanique Phytochimie*. 9: 101-121. 1987.

- MOHAMED, E.; KASEM, A.M.M.; FARGHALI, K.A. Seed germination of Egyptian *Pancreatium maritimum* under salinity with regard to cytology, antioxidant and reserve mobilization enzymes, and seed anatomy. *Flora*. 242: 120-127. 2018. Doi: 10.1016/j.flora.2018.03.011.
- NG, F.S.P. Strategies of establishment in Malayan forest trees. *In* Tropical trees as living systems (Tomlinson, P.B.P.; Zimmermann, M.H. eds.). Cambridge University Press, London, p.129-162. 1978.
- NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J.D. Germination – still a mystery. *Plant Science*, 179(6): 574-581. 2010. Doi: 10.1016/j.plantsci.2010.02.010.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*. 59(2): 368-373. 1965. Doi: 10.1007/BF01248568.
- OLIVEIRA, D.M.T. Morfologia de plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de Leguminosae. *Acta Botanica Brasilica*. 13(3): 263-269. 1999. Doi: 10.1590/S0102-33061999000300006.
- OLIVEIRA, D.M.T. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Tephrosieae. *Revista Brasileira de Botânica*. 24(1): 85-97. 2001. Doi: 10.1590/S0100-84042001000100010.
- PAULA, S.O.; SOUSA, J.A.; BRITO, E.S.; GALLÃO, M.I. The morphological characterization of the dry seeds and reserve mobilization during germination in *Morinda citrifolia* L. *Revista Ciência Agronômica*. 47(3): 556-563. 2016. Doi: 10.5935/1806-6690.20160067.
- PENFIELD, S.; PINFIELD-WELLS, H.; GRAHAM, I.A. Lipid metabolism in seed dormancy. In: Bradford, K.J.; Nonogaki, H. *Seed Development, Dormancy and Germination*. Oxford, Blackwell Publishing Ltd. Pp. 133-152. 2007. Doi: 10.1002/9780470988848.
- PONTES, C.A.; BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G.; SOARES, C.P.B. Seed reserve mobilization of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) during imbibition. *Ciência Florestal*. 20(4): 589-595. 2010. Doi: 10.1590/S0100-67622002000500010

- PRITCHARD, S.L.; CHARLTON, W.L.; BAKER, A.; GRAHAM, I.A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 31: 639–647. 2002. Doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01376.x.
- RAIJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed germination and vigour. *Annual Review of Plant Biology*. 63:507–33. 2012. Doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105550.
- REID, J. S. G. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae). *Planta*.100: 131-142. 1971. Doi: 10.1007/BF00385214.
- REIS, A.R.S.; FREITAS, A.D.D.; LEÃO, N.V.M.; SANTOS-FILHO, B.G. Morphological aspects of fruits, seeds, and seedlings, and anatomy of seedlings of *Apuleia molaris* Spruce ex Benth. *Journal of Seed Science*, v.38, n.2, p.118-128, 2016. Doi: [10.1590/2317-1545v38n2158472](https://doi.org/10.1590/2317-1545v38n2158472).
- REN, C.; BILYEU, D.; ROBERTS, C.A.; BEUSELINCK, P.R. Factors regulating the mobilization of storage reserves in soybean cotyledons during post-germinative growth. *Seed Science and Technology*; 35(2): 303–317. 2007. Doi:10.15258/sst.2007.35.2.06.
- RESSEL, K.; GUILHERME, F.A.; SCHIAVINI, I.; OLIVEIRA, P.E. Ecologia morfofuncional de plântulas de espécies arbóreas da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Botânica*. 27(2): 311-323. 2004. 10.1590/S0100-84042004000200010.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 17: 208-212. 1963.
- Rivers, M. *Delonix regia*. The IUCN red list of threatened species. 2014. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T32947A2828337.en>. Acesso em 23/09/2018.
- ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histological and histochemical evidences. *Protoplasma*. 249(3): 747-758. 2012. Doi: 10.1007/s00709-011-0318-x.

- ROSENTAL, L.; NONOGAKI, H.; FAIT, A. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research* . 24(1): 1-15. 2014. Doi: 10.17/S0960258513000391.
- SANTOS, H.P.; BUCKERIDGE, M.S.S. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Annals of Botany*. 94: 819–830. 2004. Doi:10.1093/aob/mch209.
- SHEWALE, V.D.; DESHMUKH, T.A.; PATIL, L.S.; PATIL, V.P. Anti-inflammatory activity of *Delonix regia* (Boj. Ex. Hook.). *Advances in Pharmacological Sciences*. 5(Suppl 3):1–4. 2012. Doi: 10.1155/2012/789713.
- SILVA, B.M.S.; SILVA, C.O.; MÔRO, F.V.; VIEIRA, R.D. Morphoanatomy of fruit, seed and seedling of *Ormosia paraensis* Ducke. *Journal of Seed Science*. 37(4): 192-198.2015. Doi: 10.1590/2317-1545v37n4151436.
- SILVA, B.M.S.; MÔRO, F.V. Aspectos morfológicos do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal de faveira (*Clitoria fairchildiana* R. A. Howard. - Fabaceae). *Revista Brasileira de Sementes*. 30(3): 195-201. 2008. Doi: 10.1590/S0101-31222008000300026.
- SILVA, J.R.; GASTEUR, M.; RAMOS, S.J.; MITRE, S.K.; FURTINI NETO, A.E.; SIQUEIRA, J.O.; CALDEIRA, C.F. Initial growth of Fabaceae species: combined effects of topsoil and fertilizer application for mineland revegetation. *Flora*. 246-247: 109-117. 2018. Doi: 10.1016/j.flora.2018.08.001.
- SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. *Polytechnisches Journal, Erlangen*. 232(5): 461-465. 1879.
- SORIANO, D.; OROZCO-SEGOVIA, A.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J.; KITAJIMA, K.; GAMBOA-DE-BUEN, A.; HUANTE, P. Seed reserve composition in 19 tree species of a tropical deciduous forest in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. *Annals of Botany* 107: 939–951. 2011. Doi:10.1093/aob/mcr041.
- STEBBINS, M. K. Flowering trees of Florida. Pineapple Press, Sarasota, Florida. 1999. 144 p.

- TAMAKI, Y.; TERUYA, T.; TAKO, M. The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 74(5): 1110-1112. 2010. Doi: 10.1271/bbb.90935.
- TAN-WILSON, A.L.; WILSON, K.A. Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*. 145(1): 140-153. 2012. Doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01535.x.
- TERRAZAS, T.; AGUILAR-RPDRÍGUEZ, S.; OJANGUREN, C.T. Development of successive cambia, cambial activity, and their relationship to physiological traits in *Ipomoea arborescens* (Convolvulaceae) seedlings. *American Journal of Botany*. 98(5): 765–774. 2011. Doi: 10.3732/ajb.1000182.
- VAN DONGEN, J.T.; GUPTA, K.J.; RAMÍREZ-AGUILAR, S.J.; ARAÚJO, W.L.; NUNES-NESI, A.; FERNIE, A.R. Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. *Journal of Plant Physiology*. 168: 1434–1443. 2011. Doi: /10.1016/j.jplph.2010.11.004.
- VERMA, G.; MISHRA, S.; SANGWAN, N.; SHARMA, S. Reactive oxygen species mediate axis-cotyledon signaling to induce reserve mobilization during germination and seedling establishment in *Vigna radiata*. *Journal of Plant Physiology*, 184, 79–88. 2015. Doi:10.1016/j.jplph.2015.07.001.
- VIDAL, B.C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2 R. *Annales d’Histochemie*. 15: 289-296. 1970.
- WANG, L.S.; LEE, C.T.; SU, W.L.; HUANG, S.C.; WANG, S.C. *Delonix regia* leaf extract (DRLE): a potential therapeutic agent for cardioprotection. *PLOS One*. 9: 1-17. 2016. Doi: 10.1371/journal.pone.0167768.
- WEIDLICH, E.W.A.; PESCADOR, R.; UHLMANN, A. Resource allocation (carbohydrates) in the inicial development of seedlings of *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Blacke (Fabaceae - Caesalpinioideae). *Revista Árvore*, 34(4): 627-635. 2010. Doi: 10.1590/S0100-67622010000400007.
- ZANNE, A.E.; CHAPMAN, C.A.; KITAJIMA, K. Evolutionary and ecological correlates of early seedling morphology in East African trees and shrubs. *American Journal of Botany*. 92(6): 972–978. 2005. Doi: 10.3732/ajb.92.6.972.

ZHAO, M.; ZHANG, H.; YAN, H.; QIU, L.; BASKIN, C.C. Mobilization and role of starch, protein, and fat reserves during seed germination of six wild grassland species. *Frontiers in Plant Science*. 9: 234. 2018. Doi: 10.3389/fpls.2018.00234.

ZIENKIEWICZ, A.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J.; ZIENKIEWICZ, K.; ALCHÉ, J.D.; RODRIGUÉZ-GARCÍA, M.I. Development of the cotyledons cells during olive (*Olea europaea* L.) in vitro seed germination and seedling growth. *Protoplasma*. 248: 751-765. 2011. Doi: 10.1007/s00709-010-0242-5.

CAPÍTULO 3

Respostas anti-oxidativas durante a germinação de sementes de *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. (Fabaceae, Caesalpinoideae)

Resumo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) atuam na sinalização celular que alteram a expressão de genes dos diferentes processos metabólicos durante a germinação de sementes. Este trabalho teve por objetivo, analisar a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-), a atividade da catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD), além da análise da peroxidação de lipídios pela produção de malondialdeído (MDA) e a análise de atividade α - e β -amilase durante a germinação de sementes de *Delonix regia*. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, com amostras de cotilédones+eixo embrionário do 0 ao 5º dia após a semeadura (DAS), com quatro repetições. As sementes escarificadas com lixa apresentaram 78% das sementes germinaram ao final do 5º DAS e exibiram um padrão trifásico durante 102 horas após o início da embebição. O H_2O_2 é extremamente importante na germinação de sementes de *D. regia*, com altos níveis durante toda a embebição. A CAT atuou na atividade anti-oxidativa nos estágios iniciais da germinação e a partir do 2º DAS, a APX e POX se tornaram ativas na remoção do H_2O_2 . A SOD atuou na remoção de O_2^- durante toda a germinação e possivelmente contribuiu na manutenção dos níveis de H_2O_2 . A concentração de MDA decresceu durante a germinação, indicando a eficiência da atividade das enzimas anti-oxidativas. As EROs estimularam a síntese de α -amilase e β -amilase, sendo que no 1º DAS, observou-se maior atividade da β -amilase na mobilização das reservas. Estes dados elucidam aspectos bioquímicos envolvidos na germinação das sementes de *D. regia*, uma vez, que evidenciou que esta espécie apresenta eficientes enzimas anti-oxidativas e que as EROs atuam na sinalização em diferentes eventos fisiológicos da germinação destas sementes.

Palavras-chave: ascorbato peroxidase, catalase, espécies reativas de oxigênio, peróxido de hidrogênio.

Anti-oxidative responses during germination of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. (Fabaceae, Caesalpinoideae)

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) act on cell signaling that alter the gene expression from different metabolic processes during seed germination. This research aimed to analyze the production of hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide ($O_2^{\cdot-}$), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POX) and superoxide dismutase (SOD) activity. Besides of the lipid peroxidation analysis by the production of malondialdehyde (MDA) production and analysis of α - and β -amylase activity during the *Delonix regia* seeds germination. The experiment was performed in a completely randomized design with cotyledon + embryonic axis samples from 0 to 5th days after sowing (DAS), with four replications. Scarified seeds with sandpaper had 78% of the seeds germinated at the end of the 5th DAS and exhibited a three-phase pattern for 102 hours after the imbibition began. H_2O_2 is extremely important in the *D. regia* seeds germination, with high levels throughout the soaking. CAT was effective anti-oxidative activity in the initial germination stages and from the 2nd DAS, the APX and POX became active in the removal of H_2O_2 . SOD participated in the removal of $O_2^{\cdot-}$ during all germination and possibly contributed to the H_2O_2 levels maintenance. MDA concentration decreased during the germination, which indicated the efficiency activity of the anti-oxidative enzymes. The EROs stimulated the α -amylase and β -amylase synthesis, and at 1st DAS, higher β -amylase activity was observed in the reserve mobilization. These data elucidate the biochemical aspects involved in the *D. regia* seeds germination, which showed this species presents efficient anti-oxidative enzymes and the EROs act in the signaling in different physiological events of these seeds germination.

Keywords: ascorbate peroxidase, catalase, hydrogen peroxide, reactive oxygen species.

Introdução

A germinação de sementes é um evento que envolve vários processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos (BARBA-ESPÍN et al., 2012; LI et al., 2018a), que se inicia com a embebição das sementes em água, culmina com a ruptura do

tegumento e a protrusão da radícula (BEWLEY, 1997; NONOGAKI et al., 2010). De maneira geral, para que as sementes germinem, é imprescindível a ativação de sistemas complexos que compreendem fatores intrínsecos, como a dormência e extrínsecos, como disponibilidade de água, oxigênio e temperatura (SU et al., 2016).

Após a embebição, as sementes quiescentes reassumem a atividade metabólica e ocorrem a transcrição e tradução de novos mRNAs, reparo e síntese de DNA, reparo de membranas e organelas, síntese de proteínas, mobilização das reservas e expansão celular, por exemplo (BEWLEY, 1997; NONOGAKI et al., 2010). Com o reparo das mitocôndrias e entrada de água durante a embebição, há aumento da respiração celular e da concentração de oxigênio no transporte de elétrons na cadeia transportadora e conseqüentemente, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) (EL-MAAROUF-BOUTEAU E BAILLY, 2008; PERGO e ISHII-IWAMOTO, 2011; BARBA-ESPÍN et al., 2012; ROSENTAL et al., 2014).

As EROs são produtos do metabolismo aeróbico que participam nos diversos processos antioxidativos (XIA et al., 2015; ZHANG et al., 2014), que compreendem principalmente, o oxigênio singlet (O_2), radical hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Lee et al., 2010; Ye et al., 2012). Entretanto, apesar das EROs serem comumente relacionadas ao estresse oxidativo, pesquisas têm demonstrado que estas moléculas desempenham papéis importantes na sinalização celular durante a superação e germinação de sementes (KUMAR et al., 2015; SU et al., 2016). Durante a germinação de sementes, as EROs atuam na sinalização de vias metabólicas que alteram as expressões gênicas ou o estado redox das células. Estas alterações possibilitam com que as sementes tenham percepção das mudanças ambientais (NOCTOR e FOYER, 1998), como a disponibilidade de água, luz e oxigênio.

A análise da atividade de EROs e as respostas antioxidativas pode auxiliar na compreensão da biologia da germinação de sementes de espécies florestais. *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. é uma espécie exótica, amplamente difundida nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (WANG et al., 2016). *D. regia* apresenta valor industrial (TAMAKI et al., 2010; BETANCUR-ANCONA et al., 2011) e medicinal (CHAI et al., 2012; SHEWALE et al., 2012; SALEM et al., 2014). Além disso, suas densas folhagens e flores de beleza exuberante agregam valor ornamental à espécie (WANG et al., 2016). Neste sentido, este trabalho teve como objetivo analisar as

respostas antioxidativas durante a germinação de sementes de *D. regia*. A produção de EROs foi analisada em amostras que compreendiam os cotilédones e o eixo embrionário de *D. regia*. Como a manutenção da homeostase e do estado redox celular requer um equilíbrio entre a produção de EROs e os sistemas de defesa (MILLER et al., 2008; ZHANG et al., 2019), foram mensuradas tanto a produção de H₂O₂ e O²⁻ e a síntese de catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD). Na ineficiência dos sistemas de defesa enzimáticos ou não -enzimáticos, a concentração de EROs podem resultar na peroxidação dos lipídios e danos nas membranas celulares (LI et al., 2018b). Dessa forma, foi analisado a produção de malondialdeído (MDA) durante a germinação das sementes de *D. regia*. A mobilização das reservas de amido das sementes durante a germinação foi verificada pela análise da atividade das enzimas α - e β -amilase.

Material e Métodos

Coleta das sementes - Sementes maduras foram coletadas no banco de sementes de solo de indivíduos de *Delonix regia*, localizados em Rio Verde, Goiás, Brasil [17°80'31"S e 50°90'7"W]. Em seguida, as sementes foram conduzidas para o Laboratório de Sementes, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Campus Rio Verde, (IF Goiano/Campus Rio Verde), Rio Verde-Goiás, Brasil, para a condução dos ensaios.

Teste de germinação - Para o teste de germinação, foram utilizadas 100 sementes dormentes e 100 sementes foram escarificadas com lixa n° 80 no lado oposto do eixo embrionário, consistindo em cinco repetições de vinte sementes. Posteriormente, essas sementes foram dispostas em papel germitest umedecido com água destilada em 2,5 vezes o volume o peso do papel, conforme Brasil (2009) e germinadas em câmara B.O.D. [*Biochemical Oxygen Demand*], a 20°C/30°C, por 12/12 horas, sob luz constante. Paralelamente ao teste de germinação, foi determinado o índice de velocidade de germinação (IVG), de acordo com Maguire (1962).

Determinação do padrão de embebição - O padrão de embebição foi determinado a partir da pesagem sistemática de quatro repetições de 25 sementes, em intervalos de seis horas por cinco dias. As sementes dormentes e escarificadas no lado oposto do eixo embrionário com lixa n° 80 foram embebidas em rolo de papel com três

folhas umedecidas com água destilada, no volume 2,5 vezes do peso seco e mantidas em câmara B.O.D. nas mesmas condições de temperatura e luz pré-estabelecidas no teste de germinação já descrito anteriormente. Baseando-se no teor de água inicial das sementes e o peso úmido destas nos diferentes intervalos, foi calculado o ganho de peso (GP) = $\frac{Pf-Pi}{Pi} \times 100$, em que Pf corresponde à massa final das sementes obtida a cada intervalo de pesagem e Pi, à massa inicial das sementes antes da embebição.

Determinação do teor de água - Foram utilizadas vinte sementes dormentes e vinte sementes escarificadas no lado oposto com a lixa. Essas sementes foram dispostas em quatro cadinhos, com cinco sementes cada. As amostras foram postas em estufa aquecida a $103 \pm 5^\circ\text{C}$ e devido à dormência física imposta pelo tegumento duro das sementes, foram realizadas pesagens sistemáticas diárias por cinco dias consecutivos para determinar o teor de água. O cálculo do teor de água foi determinado conforme Brasil (2009).

Determinação da concentração de íon superóxido durante a germinação - A concentração de O_2^- foi realizada em amostras de 0,2 g de amostras, as quais foram maceradas em N_2 líquido e o pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), contendo dietilditiocarbamato de sódio 1 mM (DDC). O homogeneizado foi centrifugado a $22.000 \times g$ durante 20 min, a 4°C . Após centrifugação, 0,1 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,9 mL da solução constituída de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), DDC 1 mM e azul de *p*-nitro-tetrazólio 0,25 mM. A concentração de O_2^- foi determinada pela absorbância do produto final subtraída da absorbância inicial, as quais foram mensuradas a 540 nm (CHAITANYA e NAITHANI, 1994). A unidade do eixo Y irá ficar = (ABS 540 min⁻¹ g⁻¹ de MF), MF=Massa fresca.

Determinação de peróxido de hidrogênio durante a germinação - Amostras de 0,2 mg de amostras foram maceradas em N_2 e homogeneizadas em 2 mL constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) e hidroxilamina 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a $10000 \times g$, durante 15 min, a 4°C (KUO e KAO, 2003). Adicionou-se 100 μL do sobrenadante ao meio de reação constituído de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ 100 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100

mM, em volume de 2 mL (GAY e GERBICKI, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorbância determinada a 560 nm. Os controles do reagente e dos extratos foliares foram preparados paralelamente e subtraídos da amostra. A concentração de H₂O₂, estimada com base em curva padrão de H₂O₂, foi expressa em $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de massa fresca.

Preparo das amostras e extração para a análise das enzimas durante a germinação de sementes - Para os ensaios enzimáticos, 500 sementes foram escarificadas e germinadas como descrito anteriormente, sendo que destas, foram coletadas ao acaso 48 amostras com quatro subamostras de doze sementes cada. As coletas foram realizadas nos 0 ao 5º dias após a semeadura (DAS), de acordo com as análises obtidas previamente nos testes de germinação e padrão de embebição das sementes. Em seguida, estas amostras foram congeladas em nitrogênio (N₂) líquido e o tegumento foi quebrado com auxílio de um martelo. Extraíu-se o cotilédone e o eixo embrionário, que foram pesados em balança analítica de precisão, postos individualmente em papel alumínio identificados e armazenados em ultrafreezer a -80°C, até serem macerados. Para a maceração das amostras (cotilédone+eixo embrionário), utilizou-se N₂ líquido em almofariz até obtenção de um pó.

Para análise das enzimas antioxidativas e das enzimas α e β -amilase foi utilizada quatro repetições de 100 mg e 400 mg de amostra pulverizada, respectivamente. Essas amostras pulverizadas foram homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,8 contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 2% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 *xg*, por 15 min, à temperatura de 4°C e o sobrenadante foi usado como extrato para as determinações das atividades das enzimas catalase (CAT), peroxidase inespecífica (POX), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), α e β -amilase. Com exceção da SOD, a atividade das demais enzimas foi expressa em base de proteína, em que a concentração foi determinada por Bradford (1976).

Análise das enzimas antioxidativas

- **CAT (EC 1.11.1.6):** foi utilizada 20 μL do extrato obtido das amostras adicionado a um meio de reação contendo 400 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,8, 100 μL de H₂O₂ 20 mM e 280 μL de água destilada em um volume de 780

μL (CAKMAK e MARSCHNER, 1992). Após, a atividade da CAT foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 240 nm [Espectrofotômetro Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts – EUA], durante 1 minuto, a 25°C e calculou-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que foi expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (Anderson et al., 1995).

- **POX (EC 1.11.1.7)**: foi utilizada de 15 μL do extrato obtido das amostras adicionado a um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM em volume final de 2 mL (KAR e MISHRA, 1976). A atividade da enzima POX foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 420 nm, durante 1 minuto, a 25 °C e calculou-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que foi expresso em μmol de purpurogalina produzida $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (CHANCE e MAEHLEY, 1955).

- **APX (EC 1.11.1.11)**: foi adicionado 25 μL do extrato obtido das amostras em meio de reação contendo 800 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 + EDTA + ácido ascórbico 0,8 mM e 200 μL de H_2O_2 1 mM (NAKANO e ASADA, 1981 modificado por KOSHIBA, 1993). A atividade da APX foi analisada a 290 nm, a 25°C, durante 1 minuto e calculou-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que foi expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (NAKANO e ASADA, 1981).

- **SOD (EC 1.15.1.1)**: foi adicionado 25 μL do extrato obtido das amostras em 1,94 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de *p*-nitro-tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM (DEL LONGO et al., 1993). A reação ocorreu a 25 °C, sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após quatro minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotoredução do NBT, foi medida a 560 nm (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971).

Análise da atividade da α - e β -amilase - A atividade da α -amilase foi determinada com a adição de 250 μL do extrato obtido adicionado a um meio de reação contendo 150 μL de CaCl_2 3 mM, incubado a 70°C por 5 minutos, para inativação da β -amilase. À alíquota de 250 μL de extrato de inativação da β -amilase, foram adicionados a 500 μL de tampão citrato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 250 μL de solução de amido a 1

%, incubados a 30°C. Após 5 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 2 ml do reagente de leitura [ácido 3,5-dinitrosalicílico 1% (DNS), NaOH 2M, tartarato de sódio e potássio] e aquecida a 50°C por 5 minutos e em seguida, diluído em 4 mL de água destilada (TÁRRAGO e NICOLÁS, 1976; BERNFELD, 1955; KISHOREKUMAR et al., 2007).

A determinação da atividade da enzima β -amilase foi iniciada pela adição de 180 μ L de extrato enzimático a um meio de reação contendo 110 μ L de EDTA 0,1 M, para inativação de α -amilase. À alíquota de 250 μ L de extrato de inativação da α -amilase, foram adicionados 500 μ L de tampão citrato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 250 μ L de solução de amido a 1%, incubados a 30°C por 5 minutos. Após, adicionou-se 2 mL de reação de leitura [ácido 3,5-dinitrosalicílico 1% (DNS), NaOH 2M, tartarato de sódio e potássio] e aquecido a 50°C por 5 minutos e em seguida, diluído em 4 mL de água destilada.

Os açúcares redutores formados pela ação da α - e β -amilase foram quantificados pela leitura da absorbância em 540 nm e os cálculos foram realizados utilizando a curva padrão de maltose 0,5 mg/mL (TÁRRAGO e NICOLÁS, 1976; BERNFELD, 1955; KISHOREKUMAR et al., 2007).

Determinação da peroxidação dos lipídios - A análise da peroxidação dos lipídios foi realizada pela concentração estimada de malondialdeído (MDA), conforme CAKMAK e HORST (1991). Aproximadamente 0,150 mg das amostras pulverizadas, que foram posteriormente maceradas em nitrogênio líquido e 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1%. (p/v). Em seguida, foram centrifugadas em 12000 rpm *xg*, por 15 minutos, à temperatura de 4°C. Alíquota de 0,5 μ L do sobrenadante foi adicionado a 1,5 μ L ao meio de reação constituído de TCA 15%.(p/v) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) e incubados em estufa a 97°C, por 30 minutos. A reação foi cessada em banho de gelo e centrifugada 9000 rpm *xg*, por 5 minutos, à temperatura de 4°C. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro UV-visível, em que a absorbância específica do sobrenadante foi determinada no comprimento de onda de 532 nm e a absorbância inespecífica a 600 nm. A concentração de TCA foi calculada pelo coeficiente de absorvidade molar de 155 $Mm^{-1} cm^{-1}$ (HODGES et al., 1989) e os resultados foram expressos em $nmol g^{-1}$ de massa fresca.

Delineamento experimental - Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente ao acaso, com seis dias após a semeadura e quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão. Quando não houve ajuste dos modelos de regressão, realizou-se o teste de Tukey para análise das médias, em software Statistica [Palo Alto, Califórnia, EUA] e os gráficos foram construídos em software SigmaPlot 14.0 [São Jose, Califórnia, EUA].

Resultados

Germinação, padrão de embebição e teor de água de sementes de *D. regia*

As sementes de *D. regia* apresentam dormência física e portanto, não germinaram (Figura 1). Entretanto, a germinação foi observada em sementes submetidas à escarificação mecânica com a lixa nº 80 no lado oposto do eixo embrionário e a taxa de germinação atingiu 76% no 5º DAS (Figura 1) e o IVG foi 28,15.

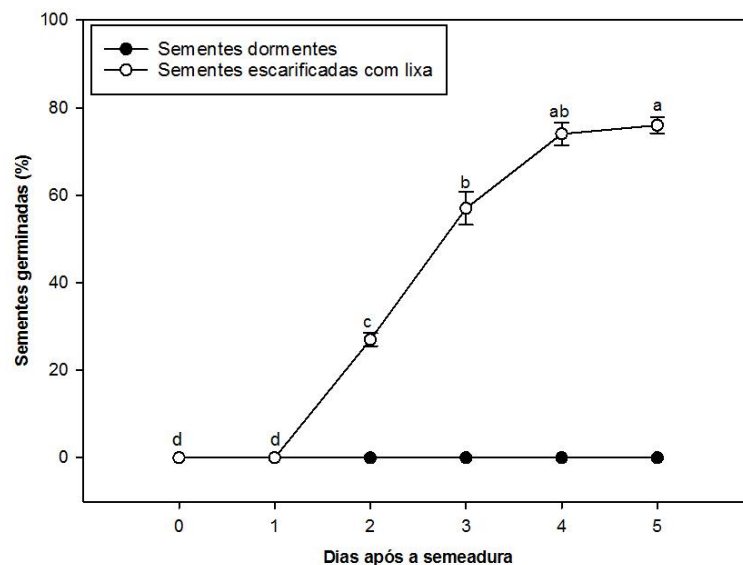


Figura 1. Porcentagem de germinação de sementes de *D. regia*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A Figura 2 demonstra os resultados obtidos nas análises do padrão de embebição das sementes de *D. regia*. Sementes dormentes não embeberam água durante os 5 dias de experimentação. As sementes que foram escarificadas com a lixa no lado oposto do eixo embrionário obtiveram ganho de massa durante a embebição no período de germinação. Nestas sementes, provavelmente a fase I ocorreu entre as 0 e 54 horas, período em que se observou ganho de massa mais acentuado. A fase II se estendeu entre

as 54 até 102 horas, em que mais de 50% das sementes germinaram. A fase III se iniciou a partir das 102 horas, quando se observou que o ganho de massa foi mais acentuado que a etapa anterior.

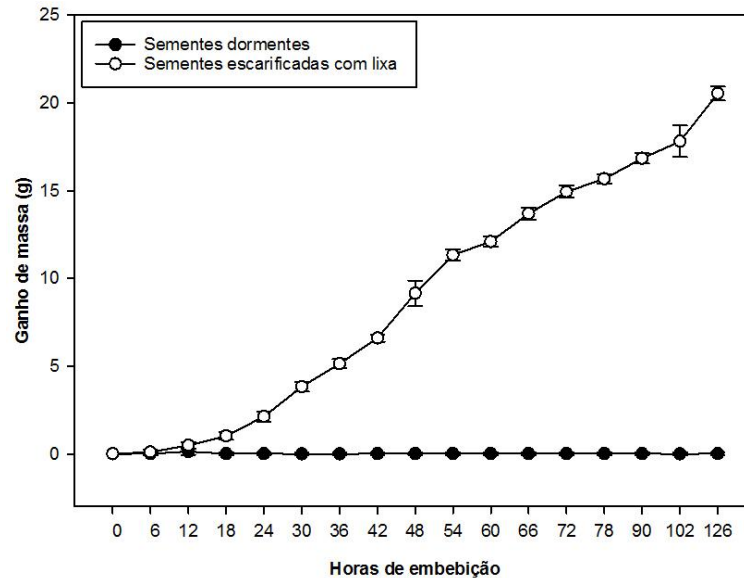


Figura 2. Análise do padrão de embebição durante a germinação das sementes de *D. regia*.

A Figura 3 ilustra as análises do teor de água das sementes de *D. regia*. O teor de água inicial das sementes de *D. regia* foi de aproximadamente 2,606%. Sementes dormentes perderam água livre de forma mais gradativa do que as escarificadas. Entretanto, o teor de água final no 5º dia de pesagem foi de 9,423 e 8,586% para as sementes dormentes e escarificadas, respectivamente.

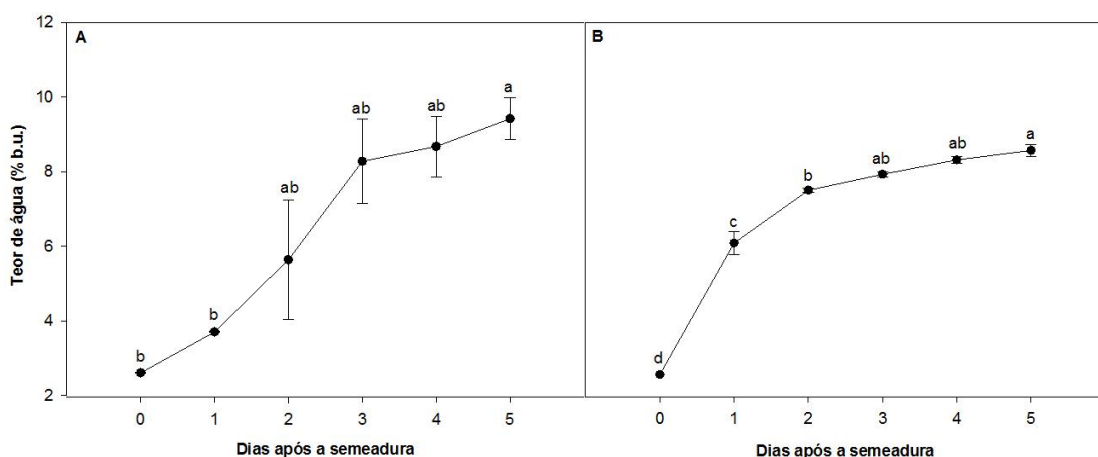


Figura 3. Determinação da porcentagem de teor de água por base úmida (% b.u.) em sementes de *D. regia*. A – sementes dormentes; B – sementes escarificadas por lixa nº 80 no lado oposto do eixo embrionário. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Concentração de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ durante a germinação de sementes de *D. regia*

O H_2O_2 foi observado entre os 0 ao 5° DAS entretanto, no 1° DAS verificou-se maior concentração, de $68,67 \mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca de amostra (Figura 4). Por outro lado, o íon $\text{O}_2^{\cdot-}$ esteve presente em concentração menor que o H_2O_2 com maior concentração nos dias 1° e 4° DAS, de $1,036$ e $0,9011 \mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca de amostra, respectivamente (Figura 4).

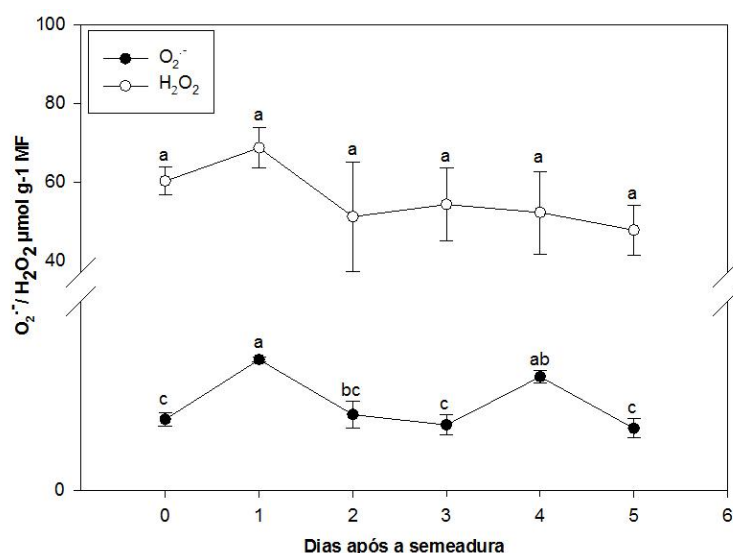


Figura 4. Concentração de superóxido e peróxido de hidrogênio durante a germinação de sementes de *D. regia*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Atividade das enzimas antioxidativas durante a germinação das sementes

A atividade da catalase (CAT) foi acentuada no 1° DAS, com concentração de $39,46 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de matéria fresca (Figura 5A). A concentração inicial da ascorbato peroxidase (APX) foi baixa nos estágios iniciais da germinação, entretanto elevou-se rapidamente a partir do 3° DAS e apresentou concentração de $1,103$ e $1,199 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de matéria fresca, nos 4° e 5° DAS respectivamente (Figura 5B). A concentração inicial de peroxidase (POX) foi baixa e a partir do 2° DAS subiu acentuadamente, e atingiu $154304,78 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de matéria fresca (Figura 5C). A concentração da superóxido dismutase (SOD) foi de aproximadamente $9,37$ e $14,8 \text{ U SOD min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de matéria fresca, nos 3° e 5° DAS, respectivamente, com menor atividade no 2° DAS (Figura 5D).

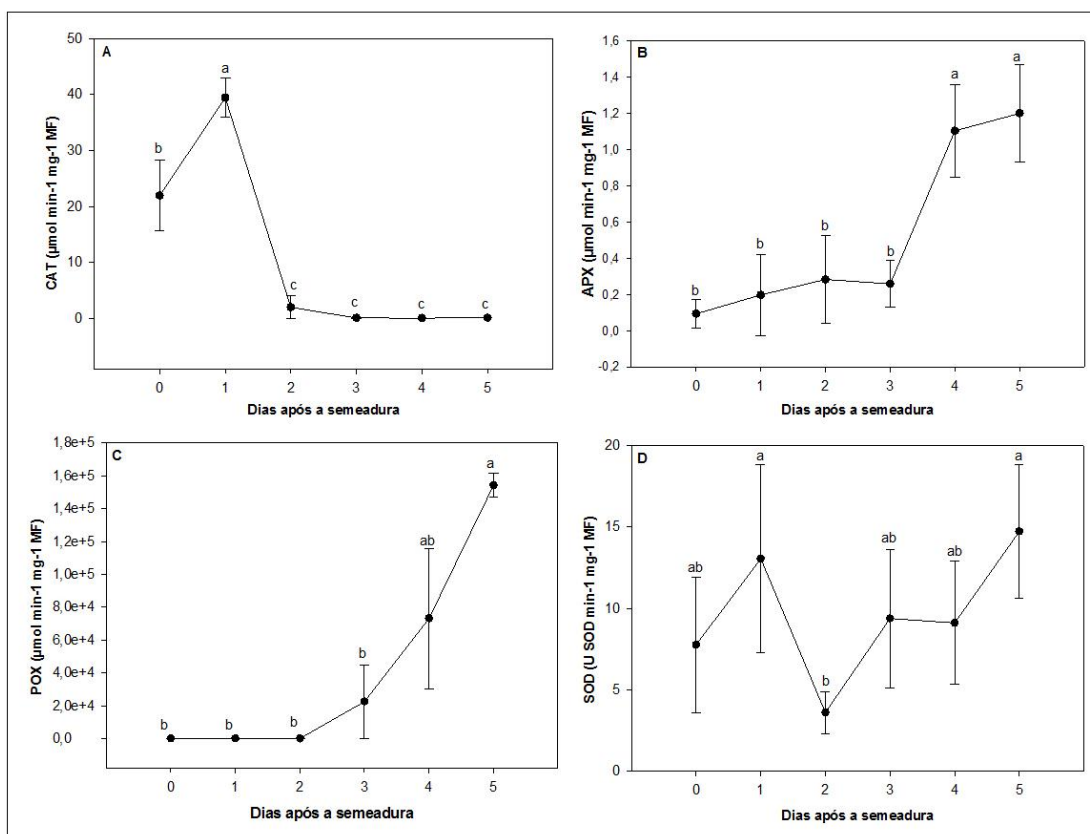


Figura 5. Atividade das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD) durante a germinação de sementes de *D. regia*. A – CAT; B – APX; C – POX; D – SOD. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Análise da integridade das membranas celulares

As análises permitiram observar que a concentração inicial de malondialdeído (MDA) foi de 48,35 µmol. A concentração de MDA no 2º DAS foi de 23,23 µmol e um pouco maior do que no 1º DAS. A partir do 3º DAS, a concentração decresceu durante a embebição das sementes de *D. regia* e atingiu 16,56 µmol ao final da germinação (Figura 6).

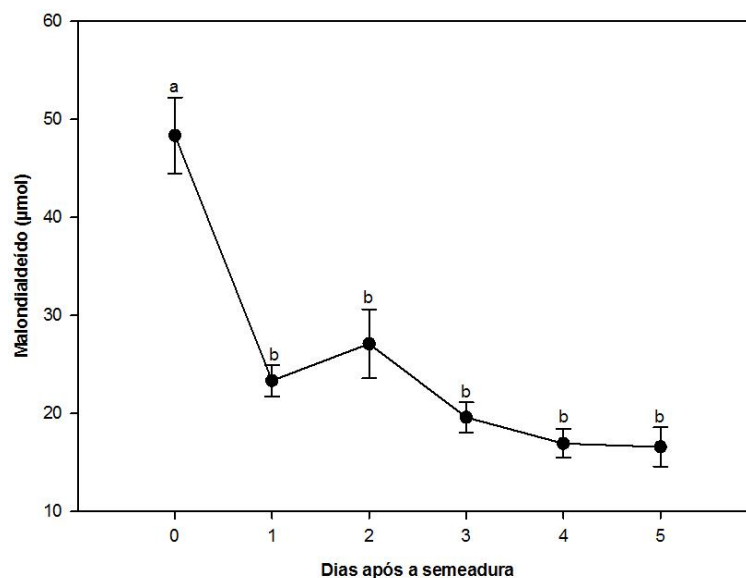


Figura 6. Análise da concentração de malondialdeído durante a germinação de sementes de *D. regia*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Atividade da α - e β -amilase durante a germinação de sementes

As análises evidenciaram que, em comparação à enzima β -amilase, a α -amilase esteve presente em pequenas concentrações nas sementes de *D. regia*, porém constante durante a germinação, com 4,03 mg/proteína no dia inicial e de 4,42 mg/proteína no 5° DAS (Figura 7A). Por outro lado, a concentração inicial de β -amilase foi de 6,68 mg/proteína, com maior atividade no 1° DAS de 8,57 mg/proteína e a atividade decresceu ao longo dos demais dias de germinação (Figura 7B).

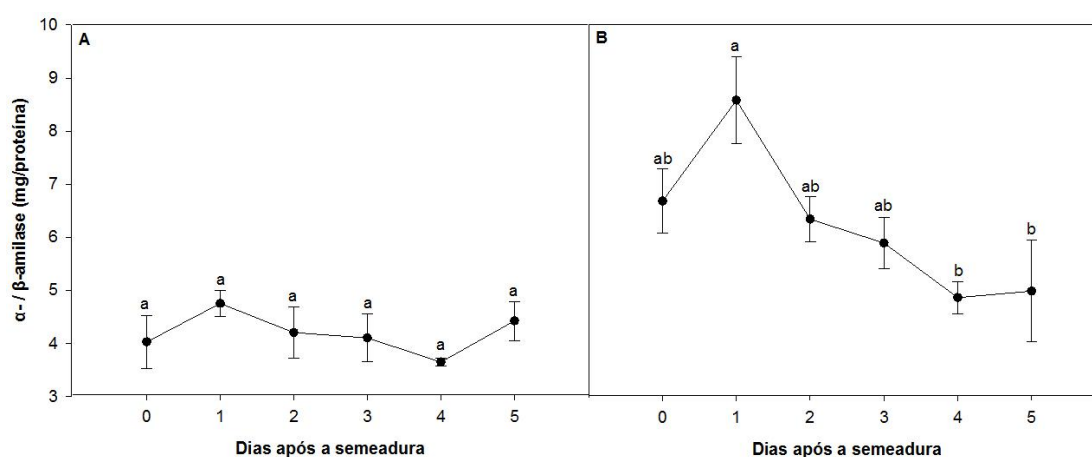


Figura 7. Atividade das enzimas α - e β -amilase durante a germinação de sementes de *D. regia*. A - α -amilase; B - β -amilase. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Discussão

Estes dados apontam que o H_2O_2 exerce importante atividade na germinação de sementes de *D. regia*. Nas sementes dormentes de *D. regia* apresentaram baixo teor de água e além disso, foi detectado alta concentração de H_2O_2 e atividade da catalase quando ainda dormentes. Essa característica pode estar correlacionada com a formação das sementes desta espécie, pois no processo de desenvolvimento das sementes, a alta atividade metabólica durante a embriogênese, além dos danos nas membranas, como a diminuição da permeabilidade, por exemplo, ocasionados durante o processo de dessecação promovem a formação de EROs (BAILLY, 2004; JOB et al., 2005; LEE et al., 2010). Estas EROs formadas nas sementes em desenvolvimento, estimulam a expressão gênica que leva à síntese de sistemas antioxidativos (MYLONA et al., 2007). Assim, quando as sementes estão maduras apresentam concentração de EROs e enzimas antioxidativas armazenadas (BAILLY, 2004).

As sementes de *D. regia* embeberam água constantemente durante a germinação, que foi concluída aos 5° DAS. A embebição das sementes provavelmente promoveu o acúmulo de oxigênio durante a retomada do metabolismo, que favoreceu a formação de H_2O_2 e O_2^- . A fim de eliminar estas EROs, foi observada a atividade da CAT até o 1° DAS e a ação da APX e POX, a partir do 3° DAS. A ação da SOD na remoção do O_2^- foi verificado durante toda a germinação da semente de *D. regia*. A atividade da CAT consta na remoção do H_2O_2 , que é formado no interior dos peroxissomos durante seu próprio metabolismo ou acumulado através do metabolismo celular (AIRAKI et al., 2015). A SOD atua na presença de metais (Mn, Fe ou Zn) e promove a dismutação do O_2^- que leva à formação de H_2O_2 (SANDALIO e ROMERO-PUERTAS, 2015). A POX oxida substrato orgânico com o H_2O_2 e produz um substrato oxidado e água (LEE et al., 2010). Por sua vez, a APX compreende uma família de isoenzimas com diferentes características (SHIGEOKA et al., 2002), que catalisa a reação ao transferir um elétron do ascorbato para o H_2O_2 e dessa forma, atua na regulação do nível de H_2O_2 intracelular (BEGARA-MORALES et al., 2014). A atividade das peroxidases ainda pode inferir sobre a produção e acúmulo de $\cdot OH$, uma vez que catalisam o O_2^- e H_2O_2 apoplástico e formam $\cdot OH$ (MÜLLER et al., 2009). As EROs, NADPH oxidases e peroxidases contribuem no enfraquecimento do tegumento para a ruptura da radícula e o alongamento da radícula durante a germinação (BODGANOVIC et al., 2008; Zhang et al., 2014). Em *D. regia* foram observados alta concentração de H_2O_2 e aumento da

atividade das peroxidases a partir do 3° DAS. Estes dados corroboram com análises desenvolvidas por Bodganovic et al. (2008) que as peroxidases atuam nos estágios finais da germinação das sementes e estágios iniciais do desenvolvimento da plântula.

A concentração de H₂O₂ não diferiu durante a embebição de sementes de *D. regia* e sementes germinadas foram observadas a partir do 2° DAS. Estas análises corroboram com estudos que indicam que o H₂O₂ está envolvido na interação cruzada entre ABA-GA. A embebição das sementes leva ao acúmulo de oxigênio, que por atividade da NADPH oxidase forma-se o H₂O₂ (ISHIBASHI et al., 2015). Então, o H₂O₂ altera a homeostase celular, induz a transdução de sinais que estimula a biossíntese de GA, o catabolismo de ácido abscísico (ABA) e a mobilização das reservas na germinação das sementes (BODGANOVIC et al., 2008; BARBA-ESPÍN et al., 2012; YE et al., 2012; XIA et al., 2015; LI et al., 2018b). Por sua vez, o GA induz a expressão de genes que codificam a síntese de NADPH oxidases na aleurona, que estão envolvidas na formação de H₂O₂ e ativa a transdução para a síntese de amilases para a degradação de amido das reservas (LI et al., 2018b). A atividade de NADPH oxidases na membrana plasmática catalisa a formação apoplástica de O₂⁻, que é catalisado pela SOD (BARBA-ESPÍN et al., 2012). Consequentemente, essa reação pode levar ao acúmulo de H₂O₂ que subsidia a síntese de GA. Além disso, a oxidação de proteínas presentes nas reservas das sementes pode levar a produção de H₂O₂ que leva a carbonilação das proteínas e estimula a germinação (EL-MAAROUF-BOUTEAU e BAILLY, 2008; ORACZ et al., 2009; SU et al., 2016). Além da interação ABA-GA, o etileno também pode atuar na germinação, ao sinalizar a expressão de genes responsáveis pela produção de H₂O₂ em sementes (ISHIBASHI et al., 2013).

As EROs estimulam a biossíntese de GA no embrião durante a germinação é transportado para a aleurona e induz a expressão de genes para a síntese de amilases, que hidrolisam o amido em mono e dissacarídeos (LIU et al., 2018; WANG et al., 2018), para gerar energia a fim de completar o desenvolvimento da plântula. O amido é constituído de dois polímeros de glucano, a amilose e amilopectina, que consiste em cadeias de glicose ligadas a α-(1,4) que são periodicamente ramificadas através de ligações β-(1,6) (SPARLA et al., 2006; MACNEILL et al., 2017). As enzimas α-amilase atuam nas ligações glicosídicas β-(1,6) e a β-amilase, nas ligações α-(1,4) (KAPLAN e GUY, 2004). Em sementes de *D. regia*, a atividade constante do H₂O₂ e O₂⁻ permitiram a síntese de α-amilase durante toda a germinação e a maior concentração

de H_2O_2 gerou pico na atividade de β -amilase. Suportando nossos dados, YE et al. (2012) observaram que as EROs estimularam a expressão de mRNAs que induzem a síntese de amilase, enquanto na presença de ABA, esses genes eram suprimidos.

O ânion O_2^- está envolvido no enfraquecimento das paredes do endosperma, que favorece a ruptura e o alongamento do eixo embrionário das sementes na germinação (ZHANG et al., 2014). O gravitropismo nas radículas é mediado pela interação espacial assimétrica entre as auxinas e O_2^- que por inibição e ativação da NADH oxidase, respectivamente, afrouxam a parede celular, e resulta no crescimento de alongamento do eixo na região apical (JOO et al., 2005; SATO et al., 2015; SINGH et al., 2017). A expansão celular nas regiões apicais do caule e raízes ocorre quanto altos níveis de íons cálcio no citoplasma estimula a produção apoplástica de O_2^- e H_2O_2 pela NADPH oxidase (MANGANO et al., 2016). Por sua vez, já foi demonstrado que quando a NADPH oxidase tem atividade inibida, ocorre o atraso na germinação de sementes (ISHIBASHI et al., 2015). Essas funções desempenhadas pelo O_2^- podem corroborar com nossas análises. Apesar de ter sido verificado que o O_2^- esteve presente durante toda a embebição da semente, a sua maior concentração ocorreu nos 1° e 4° DAS, período em que antecederam a observação da taxa inicial e final de sementes germinadas, respectivamente.

A fim de analisar se há atividade do GA ou ABA na germinação das sementes, YE et al. (2012) verificou que a concentração de MDA, como resultado da peroxidação dos lipídios sob estresse oxidativo, pode ser indicativo indireto da ação destes hormônios. Estes autores verificaram que sementes com alta concentração de ABA apresentaram menor concentração de MDA, devida a inibição da formação de EROs promovida por este hormônio. Entretanto, estes estudos demonstraram que a concentração de MDA decresceu durante a germinação de sementes de *D. regia*. Estes dados sugerem que as enzimas CAT e principalmente a APX, POX e SOD atuaram efetivamente no estresse antioxidativo promovido pelo H_2O_2 e O_2^- durante a germinação, a ponto de manter níveis destas EROs para permitir a indução da biossíntese de GA, inibir o ABA e manter a integridade das membranas celulares.

As alterações no estado redox das células promovidas pelas EROs, faz com que a tiorredoxina (Trx) oxide proteínas presentes no endosperma/cotilédones ao atuar nas pontes dissulfeto (ZHANG et al., 2018). Com isso, a Trx sinaliza a mobilização das reservas no início da germinação, ao aumentar a solubilidade das proteínas e a

susceptibilidade desta à ação das proteólises, além de promover a redução e inativação das pontes dissulfeto (S-S) de proteínas que inibem amilases e proteases específicas, o que permite a quebra do amido e proteínas presentes nas reservas (ALKHAFIOUI et al., 2007; REN et al., 2012). Além disso, estudos demonstram que a alta concentração de H_2O_2 e maior atividade de GA leva à expressão de genes que atuam na transcrição de amilases (KANEKO et al., 2002) e promove a transcrição de sinais para a síntese de isocitrato liase, que ativa a mobilização das reservas e o aumento do teor de açúcares solúveis durante a germinação (LI et al., 2018). Essas informações demonstram que a constante atividade de H_2O_2 possibilitou a síntese e atividade da α - e β -amilase durante toda a germinação de sementes de *D. regia*.

Conclusão

A atividade de H_2O_2 e O_2^- foi importante durante toda a germinação de sementes de *D. regia*. A CAT, POX, APX e SOD foram eficientes nas respostas antioxidativas pela análise da peroxidação dos lipídios pela formação do MDA. A CAT atuou na remoção das EROs no estágio inicial, enquanto a POX e APX nos estágios, evidenciando o papel destas últimas nos eventos fisiológicos que culminam com a ruptura do tegumento e a protrusão da radícula. Além disso, pôde-se perceber a ação das EROs na mobilização das reservas pela síntese de β -amilase, principalmente.

Referências Bibliográficas

- AIRAKI, M.; LETERRIER, M.; VALDERRAMA, R.; CHAKI, M.; BEGARA-MORALES, J.C.; BARROSO, J.B.; DEL RIO, L.A.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J. Spatial and temporal regulation of the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species during the early development of pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. *Annals of Botany*. 116: 679–693. 2015. Doi: 10.1093/aob/mcv023.
- ALKHAFIOUI, F.; RENARD, M.; VENGEL, W.H.; WONG, J.; TANAKA, C.K.; HURKMAN, W.J.; BUCHANAN, B.B.; MONTRICHARD, F. Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiology*. 144: 1559–1579. 2007. Doi: 10.1104/pp.107.098103.

- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiology*. 109: 1247-1257. 1995.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*. 14: 93–107. 2004. Doi: 10.1079/SSR2004159.
- BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*. 331: 806-814. 2008. Doi: 10.1016/j.crvi.2008.07.022.
- BARBA-ESPÍN, G.; NICOLAS, E.; ALMANSA, M.S.; CANTERO-NAVARRO, E.; ALBACETE, A.; HERNÁNDEZ, J.A.; DÍAZ-VIVANCOS, P. Role of thioproline on seed germination: Interaction ROS-ABA and effects on antioxidative metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*. 59: 30-36. 2012. Doi: 10.1016/j.plaphy.2011.12.002.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44: 276-287. 1971.
- BEGARA-MORALES, J.C.; SÁNCHEZ-CALVO, B.; CHAKI, M.; VALDERRAMA, R.; MATA-PÉREZ, C.; LÓPEZ-JAMARILLO, J.; PADILLA, M.N.; CARRERAS, A.; CORPAS, F.J.; BARROSO, J.B. Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany*. 65(2): 527–538. 2014. Doi: 10.1093/jxb/ert396.
- BERNFELD, P. Amylase α and β . *Methods in Enzymology*, 1: 149-151, 1955.
- BETANCUR-ANCONA, D.; PACHECO-AGUIRRE, J.; CASTELLHANOS-RUELAS, A.; CHEL-GUERREIRO, L. Microencapsulation of papain using carboxymethylated flamboyant (*Delonix regia*) seed gum. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 12: 67-72. 2011. Doi: 10.1016/j.ifset.2010.11.002.
- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9: 1055-1 066. 1997. Doi: 10.1105/tpc.9.7.1055.
- BOGDANOVIĆ, J.; RADOTIĆ, K.; MITROVIĆ, A. Changes in activities of antioxidant enzymes during *Chenopodium murale* seed germination. *Biologia Plantarum*. 52 (2): 396-400. 2008. Doi: 10.1007/s10535-008-0083-7.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254. 1976. Doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Brasília-Distrito Federal. 399 p. 2009.

Cakmak, I.; Horst, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83: 463-468. 1991. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x.

CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology* 98: 1222-1227, 1992. Doi: 0032-0889/92/98/1 222/06/\$01 .00/0.

CHAI, W.M.; SHI, Y.; FENG, H.L.; QIU, L.; ZHOU, H.C.; DENG, Z.W.; YAN, C.L.; CHEN, Q.X. NMR, HPLC-ESI-MS, and MALDI-TOF MS analysed of condensed tannins from *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. and their bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 5013-5022. 2012. Doi: 10.1021/jf300740d.

CHAITANYA, K.S.K.; NAITHANI, S.C. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn.f. *New Physiologist*. 126:623-627. 1994. Doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb02957.x

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymology*. 2: 764-775, 1995.

DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiology*. 34: 1023-1028, 1993. Doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078515.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling and Behaviour*. 3: 175-182. 2008. Doi: 10.4161/psb.3.3.5539.

GAY, C.; GEBICKI, J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferricytlenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry* 284: 217-220. 2000. Doi: 10.1006/abio.2000.4696.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 59: 309-314, 1977.

HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*. 207: 604-611. 1999. Doi: 10.1007/s004250050524.

ISHIBASHI, Y.; KODA, Y.; ZHENG, S.H.; YUASA, T.; IWAYA-INOUE, M. Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species. *Annals of Botany*. 111(1): 95-102. 2013. Doi: 10.1093/aob/mcs240.

ISHIBASHI, Y.; KASA, S.; SAKAMOTO, M.; AOKI, N.; KAI, K.; YUASA, T.; HANADA, A.; YAMAGUCHI, S.; IWAYA-INOUE, M. A role for reactive oxygen species produced by NADPH oxidases in the embryo and aleurone cells in barley seed germination. *PLoS One*. 10(11): 143-173. 2015. Doi: 10.1371/journal.pone.0143173. eCollection 2015.

JOB, C.; RAJIOU, L.; LOVIGNY, Y.; BELGHAZI, M.; JOB, D. Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiology*. 138: 790–802. 2005. Doi: 10.1104/pp.105.062778.

JOO, J.H.; BAE, Y.S.; LEE, J.S. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology*: 126: 1055–1060. 2001. Doi: 10.1104/pp.126.3.1055

KANEKO, M.; ITOH, H.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M.; MATSUOKA, M. The α -amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. *Plant Physiology*. 128: 1264–1270. 2002. Doi: 10.1104/pp.010785.

KAPLAN, F.; GUY, C.L. β -amilase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology*. 135: 1674–1684. 2004. Doi: 10.1104/pp.104.040808.

- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*. 57: 315-319, 1976. Doi: 10.1104/pp.57.2.315.
- KISHOREKUMAR, A.; JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B. SRIDHARAN, R.; PANNEERSELVAM, R. Comparative effects of different triazole compounds on growth, photosynthetic pigments and carbohydrate metabolism of *Solenostemon rotundifolius*. *Colloids and Surfaces*. 60: 207-212, 2007. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.06.008.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedling and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiology*. 34: 713-721. 1993. Doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078474.
- KUMAR, S.P.J.; PRASAD, S.R.; BANERJEE, R.; THAMMINEM, C. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany*. 116: 663-668. 2015. Doi: 10.1093/aob/mcv098.
- KUO, M.C.; KAO, C.H.. Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum*. 46: 149-152. 2003. Doi: 10.1023/A:1022356322373.
- LEE, Y. P.; BAEK, K. H.; LEE, H. S.; KWAK, S. S.; BANG, J. W.; KWON, S. Y. Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions *Journal of Experimental Botany*. 61(9): 2499–2506. 2010. Doi: 10.1093/jxb/erq085.
- LI, M.; ZHANG, K.; SUN, Y.; CUI, H.; CAO, S.; YAN, L.; XU, M. Growth, physiology, and transcriptional analysis of two contrasting *Carex rigescens* genotypes under salt stress reveals salt-tolerance mechanisms. *Journal of Plant Physiology*. 229: 77–88. 2018a. Doi:10.1016/j.jplph.2018.07.00.
- LI, Z.; GAO, Y.; ZHANG, Y.; LIN, C.; GONG, D.; GUAN, Y.; HU, J. Reactive oxygen species and gibberellin acid mutual induction to regulate tobacco seed germination. *Frontiers in Plant Science*. 9: 1279. 2018b.
- LIU, L.; XIA, W.; LI, H.; ZENG, H.; WEI, B.; HAN, S.; YIN, C. Salinity inhibits rice seed germination by reducing α -amilase activity via decreased bioactive gibberellin content. *Frontiers in Plant Science*. 9: 275. 2018 Doi: 10.3389/fpls.2018.00275.

MACNEILL, G.J.; MEHRPOUYAN, S.; MINOW, M.A.A.; PATTERSON, I.A.; TETLOW, I.J.; EMES, M.J. Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. *Journal of Experimental Botany*. 68(16): 4433–4453. 2017. Doi:10.1093/jxb/erx291.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*. 2(2): 76-77. 1962.

MANGANO, S.; JUÁREZ, S.P.D.; ESTEVEZ, J.M. ROS Regulation of Polar Growth in Plant Cells. *Plant Physiology*. 171: 1593–1605. 2016. Doi: 10.1104/pp.16.00191.

MILLER G; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 133: 481–489. 2008. Doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x.

MÜLLER, K.; LINKIES, A.; VREEBURG, R.A.M.; FRY, S.C.; KRIEGER-LISZKAY, A.; LEUBNER-METZGER, G. *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*. 150: 1855–1865. 2009. Doi: 10.1104/pp.109.139204.

MYLONA, P.V.; POLIDOROS, A.N.; SCANDALLOS, J.G. Antioxidant gene responses to ROS-generating xenobiotics in developing and germinated scutella of maize. *Journal of Experimental Botany*. 58(6): 1301-1312. 2007. Doi: 10.1093/jxb/erl292.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*. 22: 867-880. 1981. Doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.

NOCTOR, J.G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279. 1998. Doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.249.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D. Germination – Still a mystery. *Plant Science*. 179: 574-581. 2010. Doi: 10.1016/j.plantsci.2010.02.010.

ORACZ, K.; EL-MAAROUF, H.B.; KRANNER, I.; BOGATEK, R.; CORBINEAU, F.; BAILLY, C. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling

during germination. *Plant Physiology*. 150 (1): 494-505. 2009. Doi: 10.1104/pp.109.138107.

PERGO, E.M.; ISHII-IWAMOTO, E.L. Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology*. 37: 500–513. 2011. Doi: 10.1007/s10886-011-9945-0.

REN, J.P.; LI, Y.; WONG, J.H.; MENG, L.; CHO, M.J.; BUCHANAN, B.B.; YIN, J.; LEMAUX, P.G. Modifying thioredoxin expression in cereals leads to improved pre-harvest sprouting resistance and changes in other grain properties. *Seed Science Research*. 22: 30-35. 2012. Doi: 10.1017/S0960258511000353.

ROSENTAL, L.; NONOGAKI, H.; FAIT, A. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*. 24: 1-15. 2014.

SALEM, M.Z.M.; ABDEL-MEGEED, A.; ALI, H.M. Stem wood and bark extracts of *Delonix regia* (Boj. Ex. Hook): chemical analysis and antibacterial, antifungal and antioxidant properties. *BioResources*. 9(2): 2382-2395. 2014.

SANDALIO, L.M.; ROMERO-PUERTAS, M.C. Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Annals of Botany*. 116: 475–485. 2015. Doi:10.1093/aob/mcv074.

SATO, E.M.; HIJAZI, H.; BENNETT, M.J.; VISSENBERG, K.; SWARUP, R. New insights into root gravitropic signaling. *New insights into root gravitropic signaling. Journal of Experimental Botany*. 66(8): 2155–2165, 2015. Doi: 10.1093/jxb/eru515.

SHEWALE, V.D.; DESHMUKH, T.A.; PATIL, L.S.; PATIL, V.P. Anti-inflammatory activity of *Delonix regia* (Boj. Ex. Hook.). *Advances in Pharmacological Sciences*. 5(Suppl 3):1–4. 2012. Doi: 10.1155/2012/789713.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; MIYAGAWA, T.Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*. 53(372): 1305–1319. 2002. Doi: 10.1093/jexbot/53.372.1305.

- SINGH, K.L.; MUKHERJEE, A.; KAR, R.K. Early axis growth during seed germination is gravitropic and mediated by ROS and calcium. *Journal of Plant Physiology*. 216: 181–187. 2017. Doi: 10.1016/j.jplph.2017.07.001.
- SPARLA, F.; COSTA, A.; SCHIAVO, F.L.; PUPILLO, P.; TROST, P. Redox regulation of a novel plastid-targeted β -amylase of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 141: 840–850. 2006. Doi: 10.1104/pp.106.079186.
- SU, L.; LAN, Q.; PRITCHARD, H. W.; XUE, H.; WANG, X. Reactive oxygen species induced by cold stratification promote germination of *Hedysarum scoparium* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*. 109: 406–415. 2016. Doi: 10.1016/j.plaphy.2016.10.025.
- TAMAKI, Y.; TERUYA, T.; TAKO, M. The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 74(5): 1110-1112. 2010. Doi: 10.1271/bbb.90935.
- TÁRRAGO, J.F.; NICOLÁS, G. Starch degradation in the cotyledons of germinating lentils. *Plant Physiology*. 58: 618-621, 1976. Doi: 10.1104/pp.58.5.618.
- WANG, L.S.; LEE, C.T.; SU, W.L.; HUANG, S.C.; WANG, S.C. *Delonix regia* leaf extract (DRLE): a potential therapeutic agent for cardioprotection. *PLOS One*. 9: 1-17. 2016. Doi: 10.1371/journal.pone.0167768.
- WANG, Y.; CUI, Y.; HU, G.; WANG, X.; CHEN H.; SHI, Q.; XIANG, J.; ZHANG, Y.; ZHU, D.; ZHANG, Y. Reduced bioactive gibberellin content in rice seeds under low temperature leads to decreased sugar consumption and low seed germination rates. *Plant Physiology and Biochemistry*. 133: 1-10. 2018. Doi: 10.1016/j.plaphy.2018.
- XIA, X.J.; ZHOU, Y.H.; SHI, K.; ZHOU, J., FOYER, C. H.; YU, J.Q. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 66(10): 2839–2856. 2015. Doi: 10.1093/jxb/erv089.
- ZHANG, Y.; CHEN, B.; XU, Z.; SHI, Z.; CHEN, S.; HUANG, X.; CHEN, J.; WANG, X. Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. *Journal of Experimental Botany*. 65(12): 3189–3200. 2014. Doi: 10.1093/jxb/eru167.

ZHANG, H.; ZHANG, T.T.; LIU, H.; SHI, D. Y.; WANG, M.; BIE, X.M.; LI, X.G.; ZHANG, X.S. Thioredoxin-mediated ROS homeostasis explains natural variation in plant regeneration. *Plant Physiology*. 176: 2231–2250. 2018. Doi: 10.1104/pp.17.00633.

ZHANG, C.; SHI, S.; LIU, Z.; YANG, F.; YIN, G. Drought tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties is associated with enhanced antioxidative protection and declined lipid peroxidation. *Journal of Plant Physiology*. 232: 226-240. 2019. Doi:10.1016/j.jplph.2018.10.023.

WANG, X.; CHEN, H.; SHI, Q.; XIANGA, J.; ZHANGA, Y.; ZHUA, D.; ZHANG, Y. Reduced bioactive gibberellin content in rice seeds under low temperature leads to decreased sugar consumption and low seed germination rates. *Plant Physiology and Biochemistry*. 133: 1-10. 2018. Doi: 10.1016/j.plaphy.2018.10.020.

YE, N.; ZHU, G.; LIU, Y.; ZHANG, A.; LI, Y.; LIU, R.; SHI, L.; JIA, L.; ZHANG, J. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. *Journal of Experimental Botany*. 63(5): 1809–1822. 2012. Doi: 10.1093/jxb/err336.

CONCLUSÃO GERAL

Este estudo demonstrou que as sementes de *Delonix regia* apresentam diferentes respostas germinativas frente às escarificações térmica, mecânica e química. Dentre esses métodos, as escarificações térmica a 90°C por 1 e 3 minutos e a escarificação mecânica com a lixa no lado oposto do embrionário obteve taxa de germinação satisfatória. A escarificação química com ácido sulfúrico possivelmente promove danos nas membranas internas das sementes. As plântulas de *D. regia* concluem seu desenvolvimento aos 11° DAS e são do tipo fanéreo-epígeo-cotiledonar. As proteínas e lipídios constituem as reservas iniciais nos cotilédones. As reservas de proteínas são mobilizadas para formar novas proteínas enquanto os lipídios são convertidos em amido pelo ciclo do glioxilato e gliconeogênese. Os cotilédones entram em senescência quando a reserva de amido é completamente exaurida. O peróxido de hidrogênio constitui a principal espécie reativa de oxigênio que atua na germinação de sementes, na sinalização da biossíntese de ácido giberélico. As enzimas catalase, ascorbato peroxidase, peroxidase e superóxido dismutase atuam nas respostas anti-oxidativas, removendo o peróxido de hidrogênio e o superóxido. As enzimas α - e β -amilase apresentam atividade durante a germinação de sementes de *D. regia*, na mobilização das reservas de amido.