



MARIANA ALINE SILVA ARTUR

**PROCESSOS FISIOLÓGICOS E ANATÔMICOS
ASSOCIADOS À EMBEBIÇÃO E PERDA DE
TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Erythrina falcata* Benth.**

LAVRAS – MG

2014

MARIANA ALINE SILVA ARTUR

**PROCESSOS FISIOLÓGICOS E ANATÔMICOS ASSOCIADOS À
EMBEBIÇÃO E PERDA DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Erythrina falcata* Benth.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Artur, Mariana Aline Silva.

Processos fisiológicos e anatômicos associados à embebição e perda da tolerância à dessecação em sementes de *Erythrina falcata* Benth. / Mariana Aline Silva Artur. – Lavras : UFLA, 2014.

65 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.

Bibliografia.

1. Eritrina. 2. Sementes - Fisiologia. 3. Hidratação. 4. Tolerância à dessecação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.322

MARIANA ALINE SILVA ARTUR

**PROCESSOS FISIOLÓGICOS E ANATÔMICOS ASSOCIADOS À
EMBEBIÇÃO E PERDA DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Erythrina falcata* Benth.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga	UFLA
Prof. José Márcio Rocha Faria, PhD	UFLA
Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery	UFSJ

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga
Orientador

LAVRAS – MG

2014

“Porém Deus, de fato, me ouviu e respondeu à minha oração. Eu louvo a Deus porque Ele não deixou de ouvir a minha oração e nunca me negou o seu amor.”

Sl. 66:19-20

Aos meus pais, minha irmã e meu irmão, por estarem sempre ao meu lado

OFEREÇO

À minha avózinha Sebastiana (*in memoriam*) pelo amor e carinho, e ao meu
sobrinho ‘pequeno guerreiro’ que trouxe luz para as nossas vidas

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por permitir alcançar meus objetivos, por colocar as pessoas certas nos momentos certos em meu caminho, por me dar força, suporte, e coragem, e por ser o guia e a luz sempre presente em minha vida.

Agradeço aos meus pais, por sonharem comigo, por me apoiarem e incentivarem sempre, pelo amor e educação que me deram e por serem meu ponto de equilíbrio e meus exemplos de seres humanos; à minha irmã e ao irmão, pelo amor e amizade, e por torcerem por mim - vocês são tudo em minha vida!

Ao Professor Amauri Alves de Alvarenga, por me aceitar em sua equipe, pelo apoio, orientação e amizade, e pelo suporte durante o mestrado.

Ao Professor José Márcio Rocha Faria, pela confiança, incentivo, orientação e amizade desenvolvidas durante esses poucos anos, e também pela paciência e tranquilidade que sempre me passou.

A todos os meus professores, por ensinarem e incentivarem meu crescimento profissional, em especial à Professora Fernanda Carlota Nery pelo apoio e coorientação, ao Professor Anderson Cleiton José pela contribuição com o projeto e aos Professores do Setor de Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, em especial Amanda, Fernanda, Jean e Túlio, pelo suporte e, principalmente, pela paciência e amizade, pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal pela amizade e companheirismo e aos amigos do Laboratório de Sementes Florestais, pela paciência e ensinamentos.

À Universidade Federal de Lavras, por permitir que eu completasse mais uma etapa da minha vida profissional e por todo o apoio e incentivo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e incentivo profissional.

Aos meus amigos que foram imprescindíveis em todas as etapas do mestrado, em especial à Michele, Tina, Joana, Ane Marcela, Ana Luisa e Luciano pelo apoio tanto acadêmico quanto emocional e aos meus amigos “do gueto”, meus irmãos de espírito Leandro, Jéssica, Alex, Bárbara, Leonardo, Caio e Thiago.

Aos professores, técnicos e alunos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas e Laboratório de Microscopia Eletrônica pela contribuição, ajuda e ensinamentos.

Aos familiares que torceram sempre por mim e me apoiaram.

A todos os técnicos e funcionários do setor de Fisiologia Vegetal, pela amizade e pela torcida.

É impossível agradecer sem me emocionar, cada um de vocês foi extremamente importante para mim durante esses dois anos, tanto pessoal como profissionalmente, desejo que Deus retribua em dobro em suas vidas, a luz e paz que vocês trouxeram para a minha!

MUITO OBRIGADA

RESUMO

O estudo da embebição e da tolerância à dessecação em sementes podem contribuir para o estabelecimento de protocolos para o manejo de sementes de espécies arbóreas nativas com potencial para arborização urbana, produção econômica e reflorestamentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os processos fisiológicos e anatômicos associados à embebição e perda de tolerância à dessecação, e reinduzir a tolerância à dessecação em sementes de *Erythrina falcata* Benth. Inicialmente as sementes foram submetidas a tratamentos para a superação de dormência e foi avaliado o padrão de absorção de água. Posteriormente avaliou-se a perda de tolerância à dessecação das sementes em sílica gel e, finalmente, utilizou-se PEG 6.000 com o intuito de reinduzir a tolerância à dessecação em sementes com radícula protruída. Durante a embebição, avaliou-se a atividade das enzimas do sistema antioxidante, SOD, CAT e APX, peroxidação lipídica, conteúdo de peróxido de hidrogênio e de proteínas totais. Foram realizadas análises anatômicas e ultraestruturais a fim de se caracterizar os danos da embebição e dessecação. Além disso, realizou-se a análise do crescimento de plântulas provenientes de sementes submetidas à dessecação após 35 dias. Os experimentos foram realizados em DIC e as análises estatísticas utilizadas foram teste de média Scott-Knott a 5% de probabilidade. A escarificação mecânica consiste em um método eficiente para a superação de dormência em sementes de *E. falcata* e a emergência da radícula ocorre após 36 horas de embebição. A dessecação das sementes a partir de 27 horas de embebição prejudica o crescimento e desenvolvimento de plântulas. Tais sementes toleram a dessecação até às 18 horas de embebição e com raiz primária de 3 mm de comprimento apresentam formação de novas raízes. Durante a embebição há aumento na atividade antioxidante e redução na peroxidação de lipídios e na produção de H₂O₂, o que sugere um eficiente mecanismo de regulação dos danos da embebição. O conteúdo de proteínas totais diminui ao longo da embebição. Não foi possível restabelecer a tolerância à dessecação em sementes germinadas de *E. falcata* com raízes primárias de 1 mm e 3 mm de comprimento utilizando PEG 6.000.

Palavras-chave: Eritrina. Fisiologia de sementes. Hidratação. Tolerância à dessecação.

ABSTRACT

The study of the imbibition and desiccation tolerance in seeds may contribute to the establishment of seed management protocols from native tree species with urban forestry, economic production and reforestation potentials. The aim of this research was to evaluate physiological and anatomical process associated to imbibition and desiccation tolerance loss, and to reinduce desiccation tolerance in *Erythrina falcata* Benth. seeds. Firstly, seeds were submitted to dormancy overcoming treatments, and the water uptake pattern was evaluated. Later, the desiccation tolerance loss of the seeds in silica gel was evaluated, and finally, PEG 6000 was used in order to reinduce the desiccation tolerance in the seeds with protruded radicle. During imbibition the enzymes from the antioxidant system SOD, CAT, and APX, lipid peroxidation, hydrogen peroxide content and total protein content were evaluated. Anatomical and ultrastructural analyses were performed in order to characterize the imbibition and desiccation damage. Furthermore, the growth of the seedlings from seeds subjected to desiccation was evaluated after 35 days. The experiments were completely randomized and the statistical analysis used was Scott-Knott test at 5% probability. Mechanical scarification consists in an efficient method to overcome dormancy in *E. falcata* seeds, and the radicle emergence occurs after 36 hours of imbibition. Seed desiccation from 27 hours imbibition affects seedling growth and development. These seeds tolerate desiccation until 18 hours of imbibition, and with 3 mm primary root they exhibit new root development. During imbibition there was an increase of antioxidant activity, and a decrease in lipid peroxidation and H₂O₂ production, suggesting an efficient mechanism for regulating imbibition damage. The protein content decreases during imbibition. It was not possible to re-establish desiccation tolerance in germinated seeds of *E. falcata* with 1 mm and 3 mm primary roots using PEG 6000.

Keywords: Eritrina. Seed physiology. Hydration. Desiccation tolerance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1	<i>Erythrina falcata</i> Benth.....	2
2.2	Sementes tolerantes (ortodoxas) e intolerantes (recalcitrantes) à dessecação.....	4
2.3	Danos causados pela embebição.....	6
2.4	Mecanismos envolvidos na tolerância à dessecação.....	7
2.5	Estresse oxidativo e dessecação.....	8
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1	Material Vegetal.....	10
3.2	Determinação do grau de umidade e peso de mil sementes.....	10
3.3	Superação de dormência em sementes de <i>E. falcata</i>.....	10
3.4	Curva de embebição.....	12
3.5	Caracterização da perda da tolerância à dessecação.....	12
3.6	Análise de crescimento de plântulas provenientes de sementes tolerantes à dessecação.....	14
3.7	Análises anatômicas e ultraestruturais em raízes primárias e embriões.....	14
3.7.1	Microscopia de luz.....	14
3.7.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	15
3.8	Quantificação de peróxido de hidrogênio.....	15
3.9	Avaliação da peroxidação lipídica.....	16
3.10	Atividade do sistema antioxidante.....	17
3.10.1	Atividade da dismutase do superóxido (SOD)	17
3.10.2	Atividade da catalase (CAT)	18
3.10.3	Atividade da peroxidase do ascorbato (APX).....	18
3.11	Quantificação de proteínas totais.....	18

3.12	Reindução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de <i>E. falcata</i>	19
3.12.1	Experimento 1.....	19
3.12.2	Experimento 2.....	20
3.13	Delineamento experimental e análise estatística.....	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1	Superação de dormência em sementes de <i>E. falcata</i>	22
4.2	Curva de embebição.....	24
4.3	Caracterização da perda de tolerância à dessecação.....	27
4.4	Análise de crescimento de plântulas provenientes de sementes tolerantes à dessecação.....	32
4.5	Análises anatômicas e ultraestruturais em raízes primárias.....	34
4.5.1	Microscopia de luz.....	34
4.5.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	36
4.6	Quantificação de peróxido de hidrogênio.....	38
4.7	Avaliação da peroxidação lipídica.....	40
4.8	Atividade do sistema antioxidante.....	42
4.8.1	Atividade da dismutase do superóxido (SOD)	42
4.8.2	Atividade da catalase (CAT).....	44
4.8.3	Atividade da peroxidase do ascorbato (APX).....	45
4.9	Quantificação de proteínas totais.....	46
4.10	Reindução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de <i>E. falcata</i>	49
4.10.1	Experimento 1.....	49
4.10.2	Experimento 2.....	52
5	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A remoção de água das células é um processo severo e geralmente letal. Células tolerantes à dessecação possuem mecanismos estruturais, fisiológicos e moleculares de sobrevivência em condições de *déficit* hídrico severo. A ação destes mecanismos ainda é pobremente compreendida (POTTS, 2001).

Em sementes ortodoxas, a aquisição de tolerância à dessecação está relacionada ao acúmulo de reservas insolúveis, redução no volume de água vacuolar, desdiferenciação de algumas organelas como as mitocôndrias, desligamento de parte do metabolismo, vitrificação, deposição de proteínas LEA (*Late Embryogenic Abundant*) e proteínas HSPs (*Heat Shock Proteins*) (HOEKSTRA; GOLOVIAN; BUITINK, 2001; PAMMENTER e BERJAK, 2000; BERJAK e PAMMENTER, 2003), acúmulo de dissacarídeos e oligossacarídeos (BAILLY et al., 2001) e ativação do sistema antioxidante (BAILLY et al., 2004). Portanto, a aquisição de tolerância à dessecação é a fase final, pré-programada, do desenvolvimento da semente (BUITINK et al., 2003).

Nas sementes ortodoxas, a tolerância à dessecação é perdida durante a germinação. Diante disto, os mecanismos que conferem tolerância aos embriões quiescentes vêm sendo estudados (REISDORPH e KOSTER, 1999).

O estudo da embebição e da tolerância à dessecação em sementes, tanto da perda quanto da reindução, contribuirão no estabelecimento de protocolos para o manejo de sementes em espécies arbóreas nativas com potencial para arborização urbana, produção econômica e reflorestamentos, através da melhor conservação e, conseqüentemente, armazenamento das sementes.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar os processos fisiológicos e anatômicos associados à embebição e perda de tolerância à dessecação, e reinduzir a tolerância à dessecação em sementes de *Erythrina falcata* Benth.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Erythrina falcata* Benth.

A família *Fabaceae* inclui cerca de 650 gêneros e 18.000 espécies, representando uma das maiores famílias de angiospermas e uma das principais do ponto de vista econômico (JOLY, 1998; SOUZA e LORENZI, 2008). A subfamília *Papilionoideae* (*Faboideae*) compreende cerca de 400 gêneros e possui espécies cultivadas, forrageiras, produtoras de substâncias utilizadas na indústria, madeireiras e ornamentais, incluindo-se, neste último caso, as do gênero *Erythrina* (JOLY, 1998).

A espécie *Erythrina falcata*, também conhecida como corticeira-da-serra, mulungu, bico-de-papagaio, suinã e corticeira, é nativa e não endêmica do Brasil, presente nos estados do Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, nos domínios da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, e ocorre tanto em florestas primárias densas como em formações abertas e secundárias (LORENZI, 2002; LIMA, 2013).

A árvore é espinhenta com 20 a 30 metros de altura, tronco com 50 a 90 centímetros de diâmetro e folhas trifolioladas com folíolos glabros e coriáceos (Figura 1). É uma árvore decídua, heliófita ou esciófita, seletiva higrófito, característica de várzeas aluviais muito úmidas e início de encostas, com distribuição irregular e descontínua em altitudes de 500 a 900 metros (LORENZI, 2002). Como planta adaptada a áreas abertas em solos muito úmidos e brejosos, é recomendada para o plantio em áreas ciliares degradadas (LORENZI, 2002).

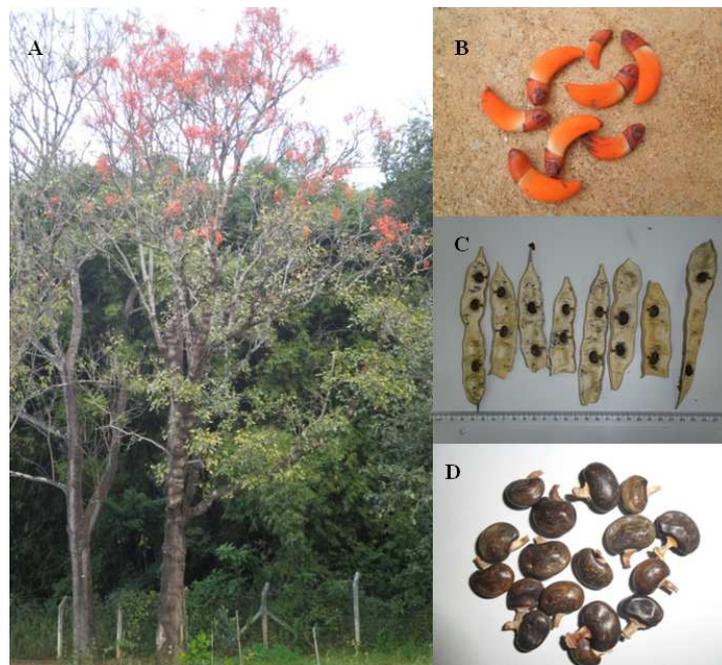


Figura 1 *Erythrina falcata* Benth. A – Árvore. B – Flor. C – Frutos maduros. D – Sementes.

E. falcata possui várias classes de princípios ativos, tais como alcaloides, flavonoides, taninos, glicosídeos antraquinônicos e pequena quantidade de óleo essencial e saponinas (ALMEIDA, 2010) e algumas propriedades medicinais, sendo o caule e folhas usados como sedativos, no combate à insônia, convulsões e na menopausa (RODRIGUES e CARVALHO, 2001). Além disso, o trabalho realizado por Dias et al. (2013) sugere uma ação antidepressiva do extrato etanólico de folhas de *E. falcata* sobre o sistema nervoso central.

Anualmente a árvore produz moderada quantidade de sementes; entretanto, muito atacadas por insetos (LORENZI, 2002). As sementes de *E. falcata* apresentam dormência tegumentar, sendo necessários métodos específicos de superação da dormência tegumentar e germinação (CARVALHO; SILVA; DAVIDE 2006).

2.2 Sementes tolerantes (ortodoxas) e intolerantes (recalcitrantes) à dessecação

A água é um componente essencial e indispensável às células, tanto animais quanto vegetais, constituindo cerca de 80% a 95% da massa fresca de tecidos metabolicamente ativos vegetais em crescimento e cerca de 35% a 75% em plantas lenhosas (VIEIRA et al., 2010b). Durante a formação e maturação das sementes, a água assume um papel crucial, atuando na expansão e divisão celular e também como veículo de biomoléculas para o embrião em desenvolvimento (BARBEDO e MARCUS FILHO, 1998).

A habilidade de sobreviver após a remoção de quase toda a água celular sem que ocorram danos irreversíveis é definida como tolerância à dessecação e confere algumas vantagens biológicas como, por exemplo, superar períodos de estresse ambiental, estabilizar a unidade biológica por longos períodos pela suspensão da atividade metabólica e tolerar as condições extremas do ambiente (LEPRINCE e BUITINK, 2010). Segundo Colville e Kranner (2010), as formas de vida tolerantes à dessecação são capazes de perder mais de 90% de seu conteúdo de água e reassumir o metabolismo quando a água estiver disponível.

A dessecação corresponde à fase final no processo de maturação das sementes, antecedendo a protrusão da radícula, sendo o fator determinante na classificação de sementes em ortodoxas, consideradas tolerantes à dessecação; sementes recalcitrantes, as quais são sensíveis à dessecação, e também aquelas com comportamento intermediário (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990; ANGELOVICI; GALILI; FERNIE, 2010).

As sementes tolerantes à dessecação secam até um baixo conteúdo de água durante a maturação na planta mãe, cerca de 5% a 15% (WANG; MØLLER; SONG, 2012), e, após a dispersão, podem permanecer viáveis por longos períodos, podendo ser armazenadas em um estado relativamente hidratado (GARNCZARSKA e WOJTYLA, 2008; CHEN et al., 2011). O desenvolvimento das sementes ortodoxas é dividido, em geral, em três fases:

divisão celular ou fase de pré-armazenamento de reservas, maturação ou fase de armazenamento de reservas e fase de dessecação (WEBER; BORISJUK; WOBUS, 2005). A fase de dessecação tem recebido atenção especial recentemente, parecendo ser mais do que apenas a secagem da semente, mas também um estágio ativo em termos de expressão gênica e metabolismo, o que é refletido durante o desenvolvimento, dormência, pós-maturação e germinação (ANGELOVICI; GALILI; FERNIE, 2010).

De modo contrário às sementes ortodoxas, as sementes recalcitrantes são sensíveis à dessecação, não havendo o período de secagem durante a maturação, e permanecem metabolicamente ativas durante o desenvolvimento e após a dispersão da planta mãe (COLVILLE e KRANNER, 2010).

A comparação entre os diferentes comportamentos de sementes ortodoxas e recalcitrantes durante a dessecação é uma maneira interessante de se compreender o mecanismo de tolerância à dessecação. As sementes ortodoxas embebidas são, em alguns casos, estudadas ao invés de sementes recalcitrantes, pois se assemelham a essas por serem sensíveis à dessecação (FARIA, et al., 2005; WANG; MOLLER; SONG, 2012).

No caso de sementes ortodoxas, a germinação é acompanhada pela perda gradual da tolerância à dessecação a qual é adquirida durante o processo de maturação. Na natureza, as sementes passam por diversos ciclos de embebição-dessecação devido às flutuações de umidade do solo e, segundo Wang, Møller e Song (2012), quando ocorrem antes da perda completa da tolerância à dessecação, estes ciclos podem promover um efeito estimulador da germinação, do estabelecimento de plântulas e do desenvolvimento inicial.

2.3 Danos causados pela embebição

A germinação se inicia com a absorção de água pela semente e se completa quando parte do embrião, geralmente a radícula, penetra as estruturas que o circundam (BEWLEY, 1997). Desta forma, a presença de água é necessária para a reativação da atividade metabólica e estímulo do crescimento do eixo embrionário (WOJTYLA et al., 2006).

O influxo rápido de água para o interior das células da semente seca, durante o início da embebição, resulta em perturbações estruturais temporárias, particularmente durante a transição das membranas de uma fase gel rígido para uma líquido cristalino, o que leva a uma rápida e imediata liberação de solutos e metabólitos para a solução circundante (BEWLEY, 1997; KRANNER et al., 2010; WEITBRECHT; MULLER; LEUBNER-METZGER, 2011). Embora proteínas e membranas estejam protegidas na semente madura e seca, é possível que ocorram danos durante a embebição (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

Os danos aos ácidos nucleicos incluem quebras em DNA de fita única, causada pelo ataque direto de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou por modificações covalentes das bases, mudanças no conteúdo e fragmentação do DNA (KRANNER et al., 2010).

As espécies reativas de oxigênio são geradas durante a absorção de água, podendo ser prejudiciais aos componentes celulares, e são uma das possíveis causas que afetam o sucesso da germinação (WOJTYLA et al., 2006; NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

Compostos e enzimas antioxidantes têm sido propostos como agentes de fundamental importância para que o processo germinativo seja completado (BAILLY, 2004). Com o intuito de lidar com os danos impostos durante a reidratação, as sementes ativam vários mecanismos de reparo durante a embebição, incluindo o reparo de membranas, de proteínas e do DNA genômico (WEITBRECHT; MULLER; LEUBNER-METZGER, 2011; RAJJOU et al., 2012).

Segundo Bewley (1997), a forma com que os danos induzidos pela dessecação e reidratação, em membranas e organelas, são reparados ainda não é conhecida. Entretanto, segundo Hoekstra, Golovian e Buitink (2001) os danos da embebição podem ser prevenidos através de embebição com água aquecida ou pela pré-hidratação de sementes secas em vapor de água.

Quando as sementes são embebidas na presença de um agente osmótico, a hidratação é desacelerada, reduzindo o nível de danos celulares normalmente causados pela rápida entrada de água nas sementes secas (RAJJOU et al., 2012). A reidratação sob condições controladas, alcançada através da incubação com soluções contendo agentes osmóticos, tal como o polietilenoglicol (PEG), causa a ativação transiente de respostas antioxidantes e reparo do DNA, preservando tanto a integridade do genoma como a qualidade da semente (BALESTRAZZI et al., 2011) e possibilitando a reindução de tolerância à dessecação em alguns casos (BUITINK et al., 2003).

2.4 Mecanismos envolvidos na tolerância à dessecação

Alguns eventos celulares e bioquímicos estão associados à tolerância à dessecação em sementes, como a diminuição do volume, redução no número e/ou acúmulo de material de reserva insolúvel dos vacúolos. Estes eventos possibilitam às células suportarem o estresse mecânico durante a dessecação por criarem uma quantidade suficiente de pressão negativa contra a parede, evitando o seu colapso e extravasamento da plasmalema (PAMMENTER e BERJAK, 1999; FARRANT, 2000).

O acúmulo de açúcares não redutores ajuda a preservar funcionalmente e estruturalmente as membranas devido à sua capacidade de substituir a água, mantendo o espaçamento entre os fosfolipídios, impedindo transições da fase líquido cristalino para a fase gel da bicamada, evitando a cristalização da fase aquosa (PAMMENTER e BERJAK, 1999; HOEKSTRA; GOLOVIAN; BUITINK, 2001; FARRANT et al., 2009).

O acúmulo de proteínas LEA coincide com a aquisição de tolerância à dessecação; essas proteínas atuam revestindo as macromoléculas com uma camada de moléculas de água, devido ao elevado número de resíduos polares no interior de sua estrutura, podendo substituir a água através da ligação direta de seus resíduos com os da superfície de outras proteínas durante a dessecação (HOEKSTRA; GOLOVIAN; BUITINK, 2001).

As desidrinas consistem num grupo de proteínas LEA de natureza anfipática, sendo capazes de associarem-se a várias macromoléculas impedindo sua desnaturação (PAMMENTER e BERJAK, 1999). As proteínas termossensíveis (HSPs) também são induzidas pelos mesmos estresses que induzem a síntese de LEA, agindo como chaperonas moleculares durante a dessecação das sementes, impedindo a agregação e desnaturação de outras proteínas (HOEKSTRA; GOLOVIAN; BUITINK, 2001; FARRANT et al., 2009; GECHEV et al., 2012).

A manutenção da integridade do material genético durante a desidratação, e seu reparo na reidratação, é um requisito primordial na tolerância à dessecação (PAMMENTER e BERJAK, 1999). Em nível da expressão gênica, algumas mudanças entre transcriptomas, associadas com a aquisição de tolerância à dessecação em sementes em desenvolvimento e o restabelecimento da tolerância em radículas, são reguladas positivamente por genes relacionados à defesa contra estresse (LEA, antioxidantes, metabólitos secundários) e ao armazenamento de reservas nas sementes; e reguladas negativamente por genes envolvidos com o ciclo celular, processamento de DNA e metabolismo primário e de energia (LEPRINCE e BUITINK, 2010).

2.5 Estresse oxidativo e dessecação

Durante o seu curso evolutivo, as plantas desenvolveram uma série de engenhosos sistemas antioxidantes a fim de reduzir o dano causado pelas EROs (CHEN et al., 2011, VARGHESE et al., 2011). Todavia, segundo

Pukacka, Malec e Ratajczak (2011), após a dispersão, a produção de EROs é controlada, sobretudo, pelo sistema antioxidante enzimático.

O componente enzimático do sistema antioxidante de defesa compreende várias enzimas que operam em diferentes compartimentos subcelulares e respondem conjuntamente quando as células se encontram em situações de estresse, o que sugere o seu papel na aquisição de tolerância das plantas (SHARMA et al., 2012).

Em sementes recalcitrantes submetidas à dessecação, a perda da viabilidade e sensibilidade pode ser consequência da falha dos mecanismos de proteção contra EROs (VARGHESE et al., 2011). Segundo Chen et al. (2011), a dessecação causa acúmulo de EROs que não são eficientemente eliminadas pelo aumento nos níveis de enzimas antioxidantes.

A tolerância à dessecação está relacionada à capacidade celular de excluir as EROs, uma vez que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes está envolvido no processo (PAMMENTER e BERJAK, 1999; GARNCZARSKA; BEDNARSKI; JANCELEWICZ, 2009).

Alguns efeitos prejudiciais da dessecação estão relacionados à formação de espécies reativas como resultado do metabolismo desbalanceado e diminuição do transporte de elétrons (COLVILLE e KRANNER, 2010). As EROs causam peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA, contribuindo para a morte celular (LEPRINCE et al., 1990, SHARMA et al., 2012).

Quando os níveis de EROs ultrapassam o limiar celular, inicia-se a peroxidação lipídica nas membranas da célula e das organelas. A peroxidação lipídica é considerada um dos processos celulares mais prejudiciais conhecidos, uma vez que agrava o estresse oxidativo através da produção de radicais derivados de lipídios capazes de reagir entre si e danificar proteínas e o DNA (GILL e TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012). Os danos à membrana são, em alguns casos, utilizados como parâmetro para se determinar o nível de destruição lipídica sob condição de estresse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Frutos maduros de *Erythrina falcata* Benth. foram coletados no período de novembro a dezembro de 2012, provenientes de seis árvores adultas no município de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 21°14'43"S, 44°59'59"W e altitude de 919 metros. O beneficiamento foi realizado manualmente, sendo os frutos quebrados para a extração das sementes e descartadas aquelas danificadas e atacadas por patógenos ou insetos. Posteriormente os lotes foram misturados e armazenados em câmara fria a 10 °C até a realização dos experimentos.

3.2 Determinação do grau de umidade e peso de mil sementes

O grau de umidade antes do armazenamento foi determinado pelo método da estufa a 103 ± 3 °C por 17 horas, com três repetições de 10 sementes, e o cálculo foi realizado na base úmida e expresso em porcentagem. O peso de mil sementes foi determinado utilizando-se oito amostras com 100 sementes cada (BRASIL, 2009).

3.3 Superação de dormência em sementes de *E. falcata*

Os tratamentos para a superação da dormência física consistiram de: escarificação mecânica com lixa d'água nº 120 do lado oposto ao embrião (MATHEUS et al., 2010); imersão das sementes em água à temperatura ambiente por 24 horas (DAVIDE e CHAVES, 1996); imersão das sementes em água à temperatura de 80 °C, seguida de repouso na mesma água por 24 horas (DAVIDE; FARIA; BOTELHO, 1995) e imersão das sementes em água à temperatura de 100 °C por 30 segundos, seguida de repouso na mesma água por 10 minutos. O tratamento controle consistiu das sementes

sem tratamento para superação de dormência. Todas as sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo por 10 minutos e lavadas em água destilada por três vezes.

Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes dispostas em rolos de papel para germinação trocados a cada 7 dias. Os dados obtidos foram utilizados para os cálculos da porcentagem de germinação através da fórmula:

$\%G = (\Sigma ni \cdot N-1) \cdot 100$, em que:

Σni é o número total de sementes germinadas em relação ao número de sementes colocadas para germinar (N-1). O índice de velocidade de germinação foi calculado através da fórmula proposta por Maguire (1962):

$IVG = \Sigma (Gn/Nn)$, na qual:

IVG = índice de velocidade de germinação;

Gn = número de sementes germinadas computadas na enésima contagem;

Nn = número de dias da enésima contagem a partir da semeadura.

Os testes foram realizados em câmaras de germinação do tipo BOD sob luz branca constante e temperatura de 25 °C. As avaliações de germinação foram realizadas diariamente até os 35 dias de instalação do experimento, sendo adotada como parâmetro de germinação a protrusão radicular com aproximadamente 1,0 mm e posterior formação de plântulas normais. Foram consideradas dormentes as sementes que não germinaram e permaneceram intactas ao final do teste e, mortas, aquelas que não germinaram e deterioraram ou aquelas infectadas por micro-organismos.

3.4 Curva de embebição

As sementes foram desinfestadas e escarificadas com lixa d'água n° 120. Posteriormente foram dispostas em rolos de papel para germinação umedecidos com 2,5 vezes de água destilada em relação ao peso do papel e colocadas em câmaras de germinação do tipo BOD sob luz branca constante e temperatura de 25 °C. Foram utilizadas três repetições de 10 sementes, e o processo de embebição foi avaliado através da pesagem das sementes em balança analítica com precisão de 0,001 g, em intervalos regulares de uma em uma hora durante as primeiras 12 horas, a cada 6 horas até às 96 horas, e, posteriormente, realizadas pesagens diárias. O incremento da massa fresca foi calculado através da fórmula:

$$\% \text{ de incremento sobre a massa fresca inicial (MFI)} = (\text{MFU} - \text{MFI} / \text{MFU}) * 100;$$

em que MFU = massa da semente embebida e MFI = massa da semente seca (NERY, 2008).

3.5 Caracterização da perda da tolerância à dessecação

As sementes foram escarificadas com lixa d'água n° 120, desinfestadas e, posteriormente, lavadas em água destilada por três vezes, e colocadas para germinar em câmaras de germinação do tipo BOD 347 sob luz branca constante e temperatura de 25 °C. Após 0, 6, 12, 18, 27 e 36 horas de embebição, e em sementes com raiz primária de 1 mm e 3 mm de comprimento, foi determinado o grau de umidade utilizando-se três repetições de 5 sementes para cada tratamento.

Na dessecação, as sementes foram colocadas em caixas acrílicas tipo gerbox, sobre um suporte de papel, contendo uma camada de 70 g de sílica gel (2% UR), mantidas em BOD a 25 °C sob luz constante até que o grau de umidade de 10% fosse atingido. Em seguida, as sementes foram mantidas por 3 dias nessa mesma condição (BUITINK et al., 2003, VIEIRA et al.,

2011a). Posteriormente, as sementes foram pré-umedecidas em câmara úmida (100% UR) a 20 °C por 24 h, e então colocadas para germinar em rolos de papel. Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes para cada tratamento. Para a curva de secagem foram utilizadas três repetições de 10 sementes pesadas em tempos regulares até que o conteúdo de água permanecesse constante.

Os cálculos da estimativa do conteúdo de água inicial foram realizados através da fórmula proposta por Cromarty, Ellis e Roberts (1985):

$$Mf = Mi(100 - Ui) \times (100 - Uf)^{-1}, \text{ na qual:}$$

Mf = massa da amostra (g) após a secagem;

Mi = massa da amostra (g) antes da secagem;

Ui = grau de umidade (%) antes da secagem;

Uf = grau de umidade (%) desejado após a secagem.

A porcentagem de germinação das sementes foi determinada pela protrusão visível da radícula com no mínimo 1 mm de comprimento (BUTINK et al., 2003). Após 5 dias, foi avaliada a porcentagem de sementes germinadas (protrusão da radícula) e que retomaram o crescimento. Tais sementes, juntamente com aquelas que não apresentavam degradação visível, foram transferidas para bandejas de polipropileno contendo como substrato terra de subsolo, areia e esterco bovino (2:1:1). As bandejas foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado, sendo uma bandeja para cada tratamento dividida em 4 partes representando 4 repetições, sendo mantidas em casa de vegetação sob 50% de sombreamento e, após 35 dias, avaliou-se a porcentagem de formação de plântulas normais.

3.6 Análise de crescimento de plântulas provenientes de sementes tolerantes à dessecação

Após 35 dias em casa de vegetação, foram avaliados os seguintes parâmetros: índice de velocidade de emergência usando a fórmula proposta por Maguire (1962), porcentagem de formação de plântulas normais, número de folhas completamente expandidas, comprimento do caule, comprimento da raiz principal, diâmetro do colo e pesagem da matéria seca das partes aérea e radicular. Para a análise de matéria seca, o material vegetal fresco foi colocado em sacos de papel em estufa de ventilação forçada por 72 horas a 65 °C.

3.7 Análises anatômicas e ultraestruturais em raízes primárias

3.7.1 Microscopia de luz

As sementes foram fixadas em solução de FAA (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70%, na proporção de 0,5: 0,5: 9,0) por 72 horas e, posteriormente, conservadas em etanol 70%. As seções transversais das raízes primárias foram obtidas a mão livre, clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada por 3 vezes, coradas com safrablau (safranina 1% e azul de astra 0,1%, na proporção de 7:3) e dispostas entre lâmina e lamínula contendo glicerina 50%. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico de luz acoplado a uma câmera digital.

Foram utilizados como tratamentos: sementes embebidas com raiz primária de 3 mm, sementes com raiz primária de 3 mm dessecadas em sílica gel até 10% do grau de umidade, sementes com raiz primária de 3 mm reidratadas após 5 dias e sementes com raiz primária de 3 mm reidratadas após 12 dias. Foram utilizadas quatro repetições de 5 sementes para cada tratamento e as sementes foram dessecadas em caixas do tipo gerbox contendo 70 g de sílica gel até 10% de grau de umidade. Após 3 dias

mantidas nesse grau de umidade, as sementes foram pré-umedecidas em câmara úmida (100% UR) a 20 °C por 24 h, e então colocadas para germinar em rolos de papel.

3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura

Foram excisados 5 pontas de raiz primária e 5 embriões de sementes embebidas por 18 horas e sementes germinadas com raiz primária de 1 mm e 3 mm; e após a dessecação destes mesmos tratamentos em sílica gel, pré-umidificação e reidratação por 24 horas. As análises e metodologia utilizada foram realizadas de acordo com protocolo de rotina do Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

As amostras foram imersas em solução fixadora Karnovisk's modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001 M), por 48 horas. Posteriormente foram lavadas por três vezes de 10 minutos em tampão cacodilato para retirar os resíduos do fixador. Em seguida foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em água, por 1 hora em câmara de fluxo laminar a temperatura ambiente. Após este período as amostras foram lavadas por três vezes em água destilada e em seguida desidratadas em gradiente de acetona 25, 50, 75, 90 e 100% por três vezes. O material foi seco em aparelho de ponto crítico de CO₂ para completar a secagem e então montados em *stubs* e cobertos com ouro. Para a visualização das imagens foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura LEO EVO 40 (ALVES, 2004).

3.8 Quantificação de peróxido de hidrogênio

Foram utilizadas três repetições de 5 sementes sem o tegumento submetidas à embebição (0, 6, 12, 18, 27 e 36 horas e sementes com raiz

primária de 1 mm e 3 mm) maceradas em nitrogênio líquido e, posteriormente, 0,2 g do material macerado de cada tratamento foi homogeneizado em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 14 minutos a 4 °C.

Alíquotas do sobrenadante (45 µL) foram pipetadas em placas de ELISA, juntamente com o meio de reação (45 µL tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0 e 90 µL de iodeto de potássio a 1 M). O H₂O₂ foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em espectrofotômetro ELISA (VELIKOVA, YORDANOV e EDREVA, 2000).

3.9 Avaliação da peroxidação lipídica

Para a avaliação da peroxidação lipídica foram utilizados os mesmos tratamentos e o mesmo extrato utilizados para a quantificação de peróxido de hidrogênio (item 3.8), de acordo com o protocolo proposto por Buege e Aust (1978).

Alíquotas de 250 µL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação [0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA], incubando-se, em seguida, a 95 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em água gelada e as leituras foram determinadas utilizando-se 200 µL do meio reacional pipetados nos poços das placas de ELISA.

O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular como, por exemplo, o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela equação: $[MDA] = (A535 - A600) / (\xi \cdot b)$, em que ξ = coeficiente de extinção molar = $1,56 \times 10^5$, e b = comprimento óptico = 1.

3.10 Atividade do sistema antioxidante

Sementes sem o tegumento foram amostradas após diferentes tempos de embebição e comprimentos da raiz primária (0 h, 6 h, 12 h, 18 h, 27 h, 36 h, 1 mm e 3 mm) e então maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, sendo utilizadas três repetições de 5 sementes para cada tratamento. Foram retirados 0,1 g de material macerado ao qual se adicionou 1,5 mL de tampão de extração (tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM, ácido ascórbico 200 mM e água). Em seguida, o material foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado a -20 °C durante o período de análises. A partir deste mesmo extrato, quantificou-se as proteínas totais pelo método de Bradford (1976) para a determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes.

3.10.1 Atividade da dismutase do superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela sua capacidade de inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), conforme proposto por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 10 µL do extrato enzimático a 190 µL do meio de incubação (tampão de fosfato de potássio a 100 mM pH 7,8, metionina a 70 mM, EDTA a 10 µM, NBT a 1 mM e riboflavina a 0,2 mM). A placa de acrílico UV, contendo o meio de incubação e a amostra, foi iluminada com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos. As leituras foram realizadas a 560 nm em espectrofotômetro de ELISA e o cálculo da atividade da enzima foi feito com base na seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

3.10.2 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), na qual uma alíquota de 2,5 μL do extrato enzimático foi adicionada a 197,5 μL do meio de incubação contendo 100 μL de fosfato de potássio a 200 mM (pH 7,0) e 10 μL de peróxido de hidrogênio a 250 mM e 80 μL de água destilada. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio através do espectrofotômetro de ELISA. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corrigido para $18 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

3.10.3 Atividade da peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos por 3 minutos monitorados com o espectrofotômetro de ELISA. Uma alíquota de 2,5 μL do extrato enzimático foi adicionada a 197,5 μL de tampão de incubação composto por 100 μL de fosfato de potássio a 200 mM (pH 7,0), 10 μL de ácido ascórbico 10 mM, 10 μL de peróxido de hidrogênio a 2 mM e 70 μL de água destilada (NAKANO e ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corrigido para $1,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

3.11 Quantificação de proteínas totais

Utilizou-se três repetições de 5 sementes sem o tegumento submetidas a diferentes tempos de embebição e comprimentos de raiz primária (0 h, 6 h, 12 h, 18 h, 27 h, 36 h, 1 mm e 3 mm) maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a homogeneização,

adicionou-se 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0) a 0,2 g do material macerado de cada tratamento seguido de banho-maria por 30 minutos a 40 °C. Em seguida os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 20 minutos, sendo o sobrenadante armazenado e o processo repetido com a resuspensão do precipitado. Os sobrenadantes combinados foram então armazenados a -20 °C. A quantificação de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), no qual se utiliza um mix de 5 mL de Comassie Blue G-250, água destilada e a alíquota. As leituras foram feitas no espectrofotômetro UV no comprimento de onda 595 nm.

3.12 Reindução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *E. falcata*.

3.12.1 Experimento 1

Sementes de *E. falcata* foram germinadas até que as raízes primárias atingissem 1 mm e 3 mm de comprimento, então foram incubadas em PEG 6.000 em três potenciais osmóticos (-1,4, -1,8 e -2,2 MPa). Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes para cada tratamento, as quais foram incubadas em BOD a 5 °C por 3 dias na ausência de luz. Posteriormente as sementes foram lavadas rapidamente em água destilada, para retirar o excesso de PEG. Em seguida foram dessecadas em sílica gel até que atingissem 10% de umidade. A partir de então, as sementes permaneceram por 3 dias em BOD, sendo pré-umidificadas em câmara úmida (100% UR) por 24 horas a 25 °C, reidratadas em rolos de papel em BOD a 25 °C sob luz branca constante e analisadas quanto à continuidade do crescimento conforme descrito no item 3.5. O grau de umidade foi determinado a partir de três repetições de 5 sementes para cada tratamento após a incubação em PEG.

3.12.2 Experimento 2

Sementes de *E. falcata* com raiz primária de 1 mm de comprimento foram incubadas em PEG 6.000 nos potenciais osmóticos de -1,4 e -2,2 MPa por 3 dias no escuro a 10 °C. Posteriormente as sementes foram lavadas rapidamente em água destilada e dessecadas em sílica gel até 10% de grau de umidade. Após 3 dias em BOD, as sementes foram pré-umidificadas, reidratadas e analisadas quanto à continuidade do crescimento conforme descrito no item 3.5. Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes para cada tratamento e o grau de umidade foi determinado a partir de três repetições de 5 sementes para cada tratamento, após a incubação em PEG. As variáveis analisadas foram: retomada do crescimento aos 5 dias após reidratação e sobrevivência após 35 dias de transferência para bandejas contendo substrato terra de subsolo, areia e esterco bovino (2:1:1) em casa de vegetação a 50% de sombreamento, tanto para o experimento 1 quanto para o experimento 2.

3.13 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) para todos os experimentos. Os tratamentos foram aplicados de acordo com o fluxograma da Figura 2.

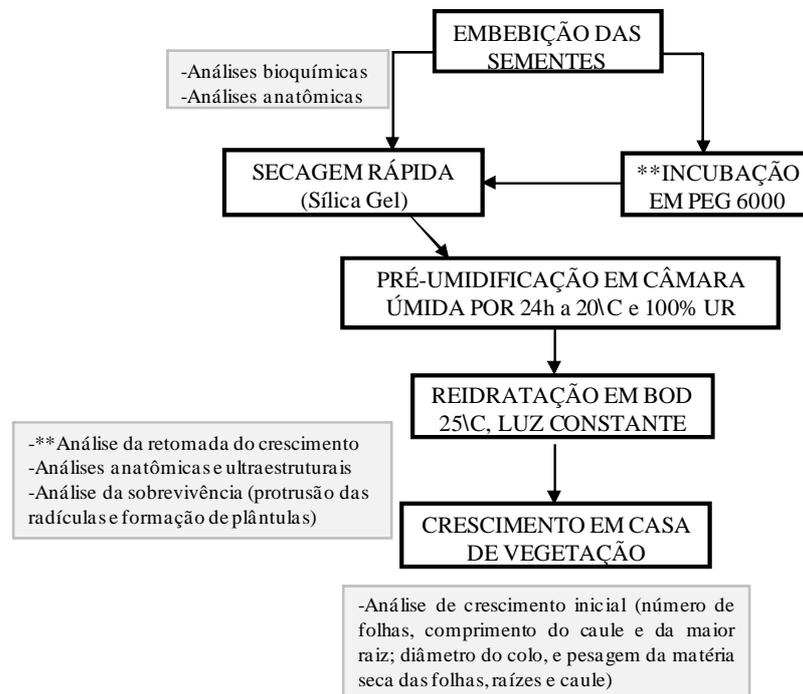


Figura 2 Fluxograma dos tratamentos aplicados em sementes de *E. falcata*.

As variáveis foram analisadas através do teste de normalidade de Shapiro Wilker, análise de variância e teste de Scott-Knott com $p < 0,05$. As variáveis que não seguiram distribuição normal (porcentagem de dormência e mortalidade, massa seca da parte aérea e radicular e peroxidação lipídica) foram transformadas (raiz quadrada). Todas as análises foram feitas utilizando-se o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - SISVAR[®] (FERREIRA, 2000) e a confecção dos gráficos através do programa Microsoft Excel[®].

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Superação de dormência em sementes de *E. falcata*

Sementes de *E. falcata* apresentaram grau de umidade inicial de 9,89% e peso de mil sementes de 275,80 g.

A escarificação com lixa d'água levou a um maior IVG quando comparada aos demais tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 Valores médios do índice de velocidade de germinação em sementes de *E. falcata* submetidas a diferentes tratamentos para a superação de dormência após 35 dias.

Tratamento	IVG
Controle	1,12 c
Escarificação com lixa d'água	8,65 a
Imersão em água a 25 °C por 24 h	1,13 c
Imersão em água a 80 °C e repouso por 24 h	2,54 b
Imersão em água a 100 °C por 30 s e repouso por 10 min	0,26 c

Segundo Moïse et al. (2005), a camada mais externa do tegumento de sementes de *Fabaceae* é uma cutícula composta de cera, a qual representa a primeira barreira para a embebição e varia em espessura; abaixo se encontra a epiderme composta de células paliçádicas de paredes espessas, a hipoderme com uma camada simples de células; e o parênquima interior. No entanto, a composição e dureza do tegumento é um fator controlado tanto pelo genoma da espécie quanto pelo ambiente (SOUZA e MARCOS FILHO, 2001).

De acordo com Baskin e Baskin (2005), a dormência física é causada por uma ou mais camadas paliçádicas no tegumento da semente, e a superação da dormência envolve a ruptura de uma área especializada na semente, por exemplo, as lentes em *Fabaceae*, criando assim uma abertura através da qual ocorre a entrada de água.

O maior percentual de germinação foi observado para sementes escarificadas com lixa d'água, as quais apresentaram 93,75% (Figura 3).

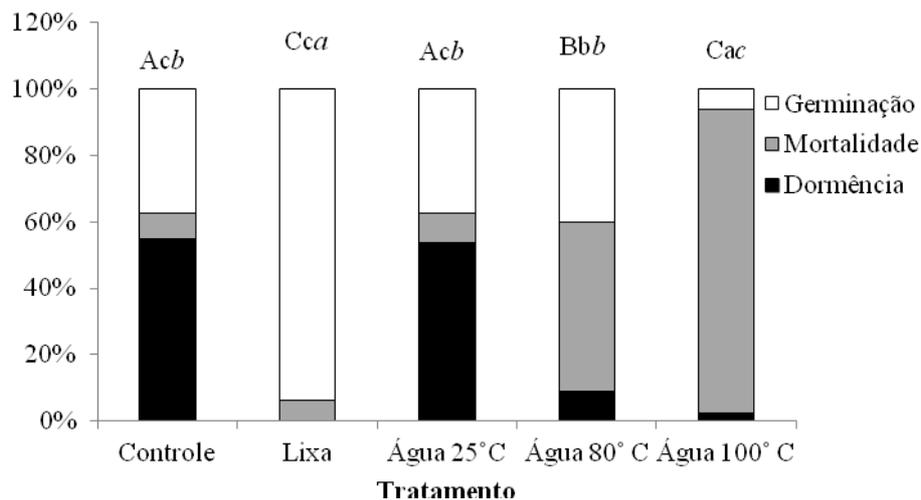


Figura 3 Percentual de germinação (barras brancas), mortalidade (barras cinzas) e dormentes (barras pretas) de sementes de *E. falcata* após tratamentos para a superação de dormência. As barras representam a média de quatro repetições de 20 sementes. Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para dormência, minúsculas para mortalidade e minúsculas em itálico para germinação) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Apesar de apresentar baixa porcentagem de sementes dormentes ao final do experimento, a imersão das sementes em água a 100 °C levou à morte de 91,25% das sementes. A imersão de sementes em água à temperatura ambiente equiparou-se ao tratamento controle (55%), apresentando 53,75% de sementes dormentes, demonstrando que tal tratamento não foi eficiente para a superação de dormência (Figura 3).

A escarificação de sementes de *Erythrina velutina* com lixa proporcionou porcentagem de emergência de cerca de 98%, mesmo após 25 meses de armazenamento (SANTOS et al., 2013). Silva Júnior et al. (2012) observaram alta porcentagem de germinação em sementes de *E. velutina* escarificadas com lixa de ferro, as quais apresentaram cerca de 95 - 100% de

germinação no intervalo de 6 dias, demonstrando a eficiência deste método para espécies do gênero.

Sementes de *E. crista-galli* imersas em água com temperatura elevada (96 °C) também apresentaram baixa porcentagem de germinação (máximo de 43%) e, segundo Silva, Carpanezzi e Lavoranti (2006), o tratamento foi pouco satisfatório e deletério quando comparado ao tratamento com ácido sulfúrico. De acordo com Santos et al. (2013), a imersão de sementes de *E. velutina* em água quente (80 °C e 100 °C) provocou danos aos embriões, comprometendo a viabilidade das mesmas.

Silva Júnior et al. (2012) observaram que sementes de *E. velutina* sem tratamento para a superação de dormência permaneceram intactas após 15 dias de embebição nas mesmas condições deste experimento (25 °C e luz constante). Silva, Carpanezzi e Lavoranti (2006) observaram que os tratamentos controle de sementes de *E. crista-galli* (sem superação de dormência) apresentaram cerca de 12,5% de germinação após 19 dias, o que pode ser o resultado de dormência tegumentar, comum no gênero *Erythrina*.

Carvalho, Silva e Davide (2006) observaram que as sementes de *E. falcata* apresentam tegumento duro, sendo necessários métodos específicos de superação da dormência tegumentar (DAVIDE; FARIA; BOTELHO, 1995; DAVIDE e CHAVES, 1996; MEDEIROS e ABREU, 2005; MATHEUS et al., 2010).

Sementes de várias espécies do mesmo gênero apresentam dormência tegumentar e são classificadas como ortodoxas, como é o caso de *E. velutina* (SILVA et al., 2011), *E. speciosa* (MELLO et al., 2010), *E. fusca*, *E. poeppigiana*, *E. indica* e *E. caffra* (ORWA et al., 2009).

4.2 Curva de embebição

Após 78 horas de avaliação, sementes escarificadas com lixa d'água apresentaram rápido padrão de absorção de água quando comparadas ao

tratamento controle (não escarificadas), evidenciado pela alta taxa de incremento sobre a massa fresca (Figura 4).

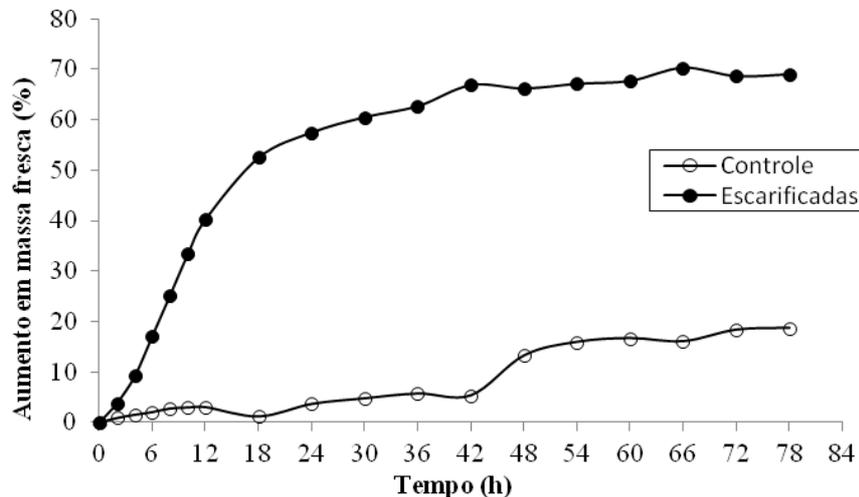


Figura 4 Curva de embebição de sementes de *E. falcata* sem escarificação e escarificadas mecanicamente. As sementes foram embebidas a 25 °C sob luz constante. Cada ponto é a média de três repetições de 10 sementes.

As sementes que não sofreram escarificação mecânica apresentaram lenta absorção de água, não possibilitando diferenciar as fases I e II, sendo que a fase III foi registrada após 60 horas de embebição. Este retardamento na protrusão da radícula em sementes não escarificadas também foi observado por Loureiro et al. (2013) em sementes de *Amburana cearensis*, também pertencente à subfamília *Papilionoideae*, evidenciando igualmente a impermeabilidade do tegumento das sementes dessa espécie.

Apesar de a escarificação mecânica favorecer a entrada de água em sementes com dormência tegumentar, não foi possível observar nitidamente um padrão de absorção de água trifásico como o descrito por Bewley (1997) para a espécie em estudo. Dessa forma, observando o aumento em massa fresca ao longo do tempo e o início da protrusão radicular, foram estabelecidos os pontos de mudança de fases da embebição (Figura 5).

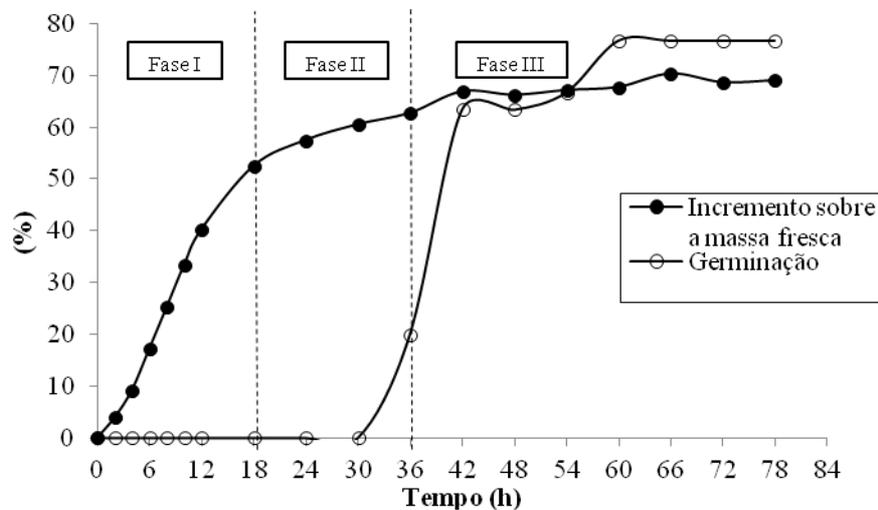


Figura 5 Curva de embebição de sementes de *E. falcata* escarificadas mecanicamente e porcentagem de germinação a 25 °C sob luz constante. As sementes que apresentaram protrusão da radícula foram consideradas germinadas. Cada ponto é a média de três repetições de 10 sementes.

Durante as primeiras 18 horas foi determinada a fase I da embebição. Esta fase é caracterizada pelo aumento relativamente rápido na absorção de água (BEWLEY, 1997, WEITBRECHT; MULLER; LEUBNER-METZGER, 2011). Nas sementes em estudo, observou-se um incremento de 52,48% sobre a massa fresca durante as primeiras 18 horas de embebição. A presença de água é crucial e necessária para a retomada da atividade metabólica e crescimento do embrião (WOJTYLA et al., 2006).

A fase II foi determinada considerando-se os tempos após as 18 horas de embebição até o início da protrusão das radículas, neste período há uma limitação na absorção de água (WOJTYLA et al., 2006; NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010). Durante a fase II, as sementes permaneceram, em média, sem significativo incremento sobre a massa fresca, até que a protrusão da radícula foi observada após 36 horas de embebição, caracterizando a fase III, com 20% de germinação.

Às 36 horas de embebição, o incremento sobre massa fresca foi 62,68% e, ao final do experimento, obteve-se 76,67% de germinação e um incremento de 68,99% sobre a massa fresca.

Apesar de o uso dessas fases ser conveniente para ilustrar os eventos que ocorrem nas sementes durante a germinação, em algumas espécies elas não são tão bem definidas (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

4.3 Caracterização da perda de tolerância à dessecação

Com a embebição foi observado um aumento no grau de umidade de 8,15%, em sementes não embebidas, para 69,66%, em sementes com raiz primária de 3 mm de comprimento (Figura 6).

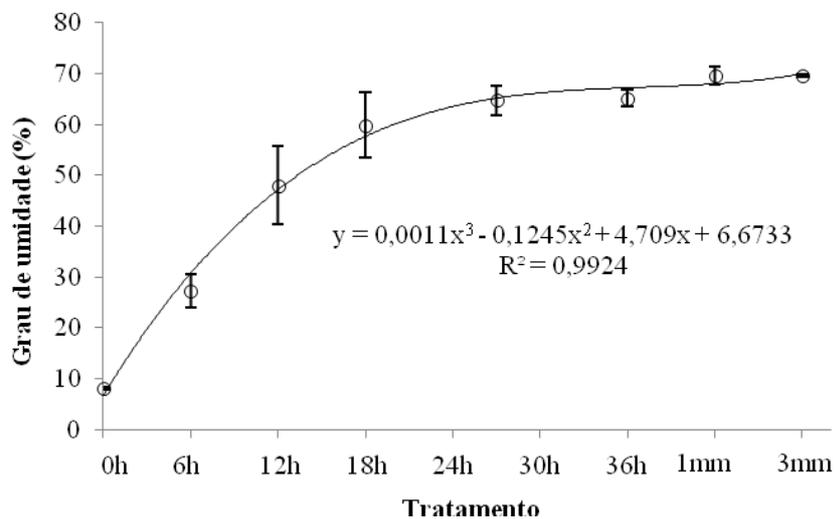


Figura 6 Grau de umidade em sementes de *E. falcata* após 0, 6, 12, 18, 27 e 36 horas de embebição e em sementes com raízes primárias de 1 mm e 3 mm de comprimento. Cada ponto é a média de três repetições de 5 sementes, e as barras representam o erro padrão da média.

A curva de secagem para sementes de *E. falcata* embebidas e germinadas até 3mm de comprimento de radícula pode ser observada na figura 7.

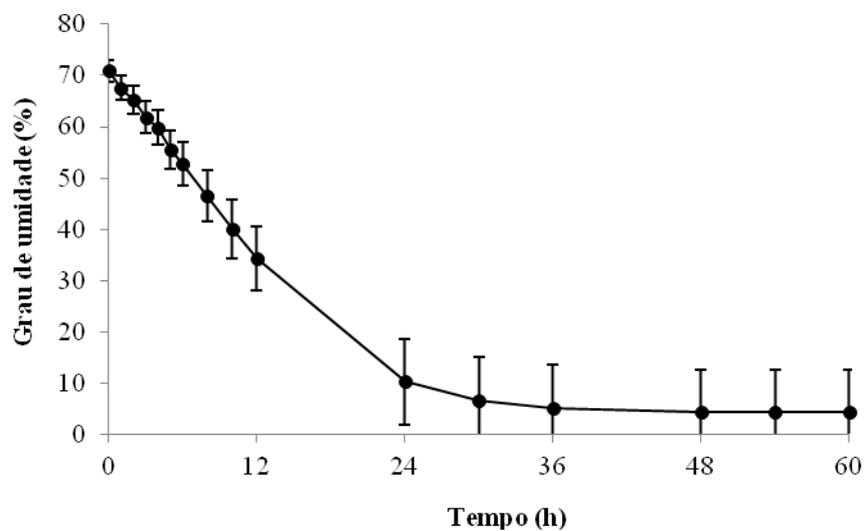


Figura 7 Curva de secagem de sementes de *E. falcata* germinadas com 3mm de radícula desidratadas em caixas gerbox contendo sílica gel. Cada ponto no gráfico representa a média de três repetições de 10 sementes e as barras representam o erro padrão.

Observou-se uma rápida diminuição do grau de umidade até às 24 horas de secagem e, a partir de então, houve estabilização dos valores de grau de umidade.

A análise de germinação foi realizada após 5 dias da dessecação das sementes, e de sobrevivência de plântulas normais após 35 dias da transferência para substrato em casa de vegetação (Figura 8).

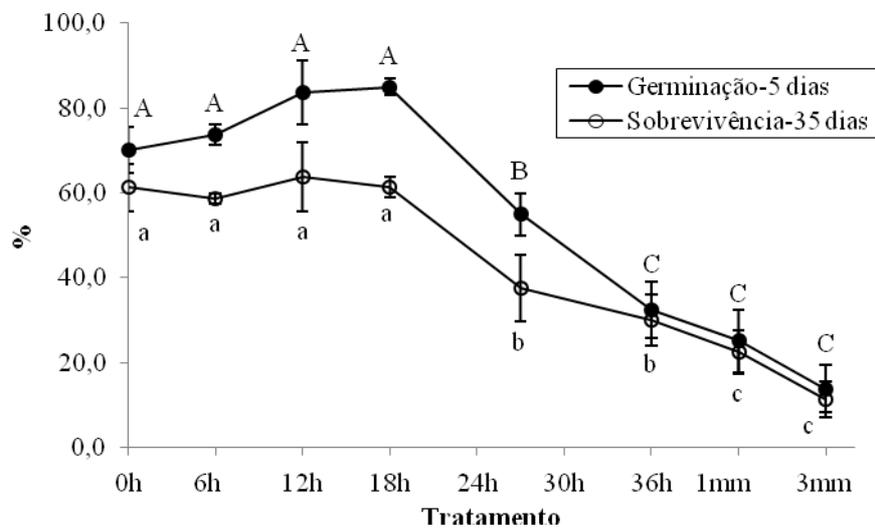


Figura 8 Caracterização da perda de tolerância à dessecação em sementes de *E. falcata* após 0, 6, 12, 18, 27 e 36 horas de embebição e em sementes com raiz primária de 1 mm e 3 mm de comprimento com base na germinação e formação de plântulas normais. Cada ponto representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para germinação após 5 dias e minúsculas para sobrevivência após 35 dias) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observou-se que até às 18 horas de embebição, as sementes de *E. falcata* não apresentaram perda da tolerância à dessecação, uma vez que a porcentagem de germinação e sobrevivência não diferiu do tratamento controle (sem dessecação). É interessante ressaltar que até às 18 h foi determinada a fase I da embebição, na qual há o início da atividade metabólica, com a reativação de estruturas e enzimas necessárias para o metabolismo (Bewley, 1997). Segundo Rajjou et al. (2012), a fase inicial da germinação é um processo reversível, no qual o programa genético da maturação pode ser recuperado.

Quando dessecadas a 10% de umidade, sementes de *E. falcata* com a radícula protruída (1 mm e 3 mm) apresentaram baixas taxas de retomada do crescimento da raiz primária após 5 dias e de sobrevivência de plântulas normais após 35 dias, apresentando valores de 25% e 22,5% para sementes

com raiz primária de 1 mm, e 13,75% e 11, 25% para sementes com 3 mm, respectivamente.

Todavia, em sementes de *E. falcata* com raiz primária de 3 mm de comprimento que retomaram o crescimento, foi observada a formação de novas raízes a partir do quinto dia após reidratação (Figura 9).



Figura 9 Detalhe da formação de novas raízes a partir de raiz primária com 3 mm de comprimento (setas) após dessecação, pré-humidificação e reidratação. A – Semente após 5 dias de reidratação. B – Plântula após 12 dias de reidratação. Barra = 5 mm.

Segundo Buitink et al. (2003), a radícula protruída é a primeira parte a perder a tolerância à dessecação, seguida pelo hipocótilo e cotilédones. Além disto, esses autores observaram que sementes germinadas com raiz primária com 3 mm de *Medicago truncatula* submetidas à desidratação perderam quase totalmente a tolerância à dessecação. No caso de sementes de *Peltophorum dubium*, quando dessecadas com raiz primária de 1 mm e 3 mm de comprimento, não houve sobrevivência e formação de plântulas (GUIMARÃES et al., 2011).

Entretanto, como a tolerância à dessecação é um traço multifatorial, é possível que nem todos os mecanismos necessários para suportar a sobrevivência no estado dessecado tenham sido perdidos em sementes com raiz primária de 3 mm de comprimento de *E. falcata*, contribuindo para o desenvolvimento de novas raízes e retomada do crescimento.

De modo geral pôde-se observar a perda da tolerância à dessecação ao longo do tempo de embebição em sementes de *E. falcata* evidenciado pelo aumento na porcentagem de mortalidade das sementes 5 dias a reidratação (Figura 10).

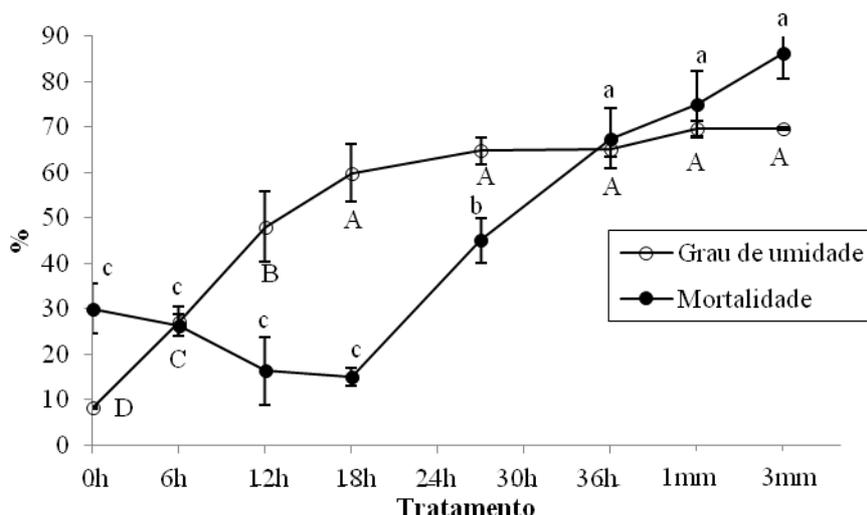


Figura 10 Porcentagem de mortalidade após 5 dias da reidratação de sementes de *E. falcata* após 0, 6, 12, 18, 27 e 36 horas de embebição e em sementes com raiz primária de 1 mm e 3 mm de comprimento. Cada ponto representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras representam o erro padrão. Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para o grau de umidade ao longo da embebição e minúsculas para mortalidade após 5 dias) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Este comportamento é comum principalmente em sementes consideradas ortodoxas, as quais se tornam menos tolerantes à dessecação com o progresso do processo germinativo (HONG e ELLIS, 1996). Este mesmo resultado também foi encontrado para sementes de *Peltophorum dubium* ao longo da embebição (GUIMARÃES et al., 2011).

Em sementes maduras de milho, Huang e Song (2013) também observaram que a tolerância à dessecação é gradualmente perdida, o que vai de acordo com a hipótese de que este é um traço quantitativo nas sementes de diferentes espécies (VERTUCCI e FARRANT, 1995). Em sementes de *Medicago truncatula* a tolerância à dessecação declinou com a protrusão da

radícula e, com 2 mm de comprimento, não foi observada a sobrevivência das sementes dessecadas e reidratadas (FARIA et al., 2005). Segundo Faria et al. (2005), o comprimento da raiz primária a partir do qual plântulas de sementes ortodoxas perdem a tolerância à dessecação varia entre as espécies e, além disso, os diferentes procedimentos experimentais adotados influenciam nos resultados encontrados.

Com a protrusão radicular (a partir de 36 horas) a porcentagem de mortalidade das sementes atinge valor máximo (Figura 10), não diferindo estatisticamente dos diferentes comprimentos da raiz primária (1 mm e 3 mm). Sementes de *E. falcata*, assim como outras espécies ortodoxas perdem sua capacidade de tolerar a secagem ao final da germinação quando o eixo embrionário inicia a alongação, usualmente pela radícula (LEPRINCE et al., 1990, BUITINK et al., 2003).

4.4 Análise de crescimento de plântulas provenientes de sementes tolerantes à dessecação

Com relação ao IVE, apenas o tratamento controle diferiu dos demais (Tabela 2).

Tabela 2 Valores médios do índice de velocidade de emergência de plântulas de *E. falcata* após 35 dias a partir de sementes submetidas à dessecação.

Tratamento	IVE
Controle (semente seca)	7,01 a
6 h de embebição + dessecação	1,66 b
12 h de embebição + dessecação	2,28 b
18 h de embebição + dessecação	1,42 b
27 h de embebição + dessecação	0,90 b
36 h de embebição + dessecação	0,63 b
Raiz primária com 1 mm + dessecação	0,40 b
Raiz primária com 3 mm + dessecação	0,66 b

De acordo com os valores de IVE, observou-se que as sementes que passaram pelos tratamentos de dessecação apresentaram velocidade de emergência prejudicada.

Para o número de folhas, comprimento do caule e da maior raiz, diâmetro do colo e massa seca da parte aérea foi observada redução a partir das 27 horas (Figura 11A, 11B, 11C e 11D). Já para a massa seca da raiz, foi observado que apenas os tratamentos de dessecação das sementes com radículas protruídas (1 mm e 3 mm) apresentaram redução (Figura 11D).

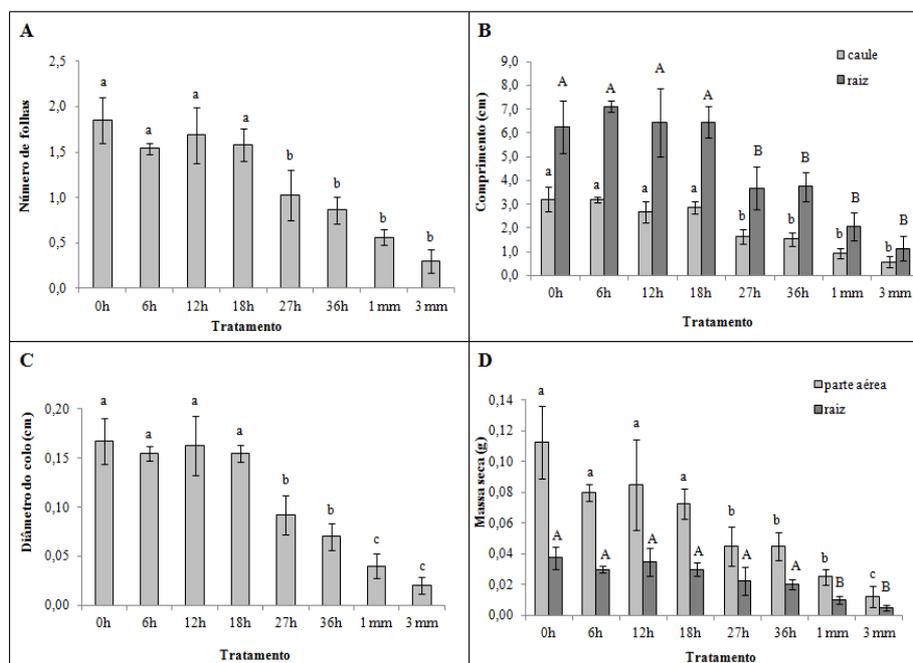


Figura 11 Número médio de folhas completamente expandidas (A), comprimento médio do caule (barras cinza claro) e da raiz (barras cinza escuro) (B), diâmetro do colo (C) e massa seca da parte aérea (barras cinza claro) e da raiz (barras cinza escuro) (D) de plântulas de *E. falcata* provenientes de sementes submetidas à embebição e posterior dessecação em sílica gel. Cada barra representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas por letras iguais em cada gráfico não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A partir das 27 horas de embebição, inicia-se a perda de tolerância à dessecação nas sementes de *E. falcata* (Figura 8). A partir desse mesmo

tempo de embebição, também foi observada a diminuição dos parâmetros analisados, indicando que a dessecação das sementes no decorrer da embebição prejudica o crescimento e desenvolvimento inicial de plântulas. A diminuição da massa seca da raiz em sementes dessecadas cuja raiz primária apresentava 1 mm e 3 mm de comprimento pode ter ocorrido devido ao fato de as radículas protruídas estarem diretamente expostas ao estresse causado pela dessecação.

Os eventos posteriores à fase III da germinação, incluindo a mobilização das principais reservas, estão associados com o crescimento e desenvolvimento da plântula (BEWLEY, 1997; BARBEDO e MARCUS FILHO, 1998). Segundo Kranner et al. (2010), o equilíbrio entre tolerância e sensibilidade pode determinar se o fator de estresse terá um efeito positivo ou negativo e, no caso, o *déficit* hídrico causa danos aos tecidos vegetativos, podendo levar à morte celular e morte do vegetal.

Desta forma, os danos causados pela dessecação e/ou reidratação das sementes de *E. falcata* podem não ter sido eficientemente reparados a partir das 27 horas de embebição, levando à morte celular, prejudicando o processo germinativo e o estabelecimento de plântulas.

4.5 Análises anatômicas e ultraestruturais em raízes primárias e embriões

4.5.1 Microscopia de luz

Raízes primárias com 3 mm de comprimento que não sofreram dessecação apresentaram estrutura normal, com a epiderme intacta e tecidos internos, como os vasculares, em desenvolvimento (Figura 12A). Tais sementes, quando secas, não apresentaram danos significativos em sua estrutura (Figura 12B). Entretanto, cinco dias após a reidratação, observou-se a desestruturação do tecido epidérmico das raízes primárias (Figura 12C).

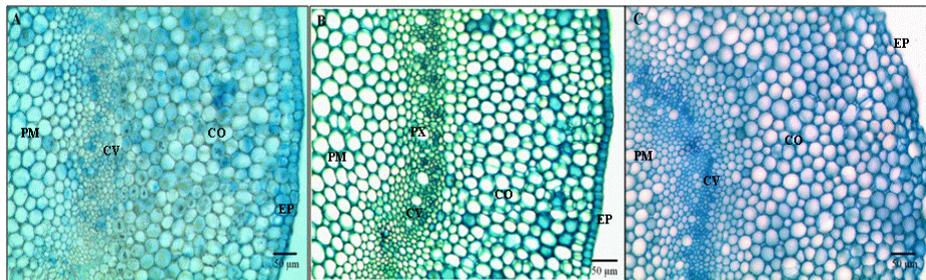


Figura 12 Corte transversal de raízes primárias de sementes de *E. falcata* embebidas até 3 mm de comprimento (A), raízes primárias embebidas até 3 mm de comprimento e dessecadas até 10% de umidade (B), e raízes primárias de 3 mm de comprimento, seguido de dessecação até 10% de umidade, pré-umidificação e reidratação após 5 dias. CV = Cilindro Vascular, PM = Parênquima Medular, CO = Córtex, EP = Epiderme, PX = Protoxilema.

Após 12 dias da reidratação, observou-se o desenvolvimento de novas raízes a partir dos tecidos do embrião, como mostrado na Figura 13. Nessa figura, foi possível observar também o início da diferenciação de feixes xilemáticos.

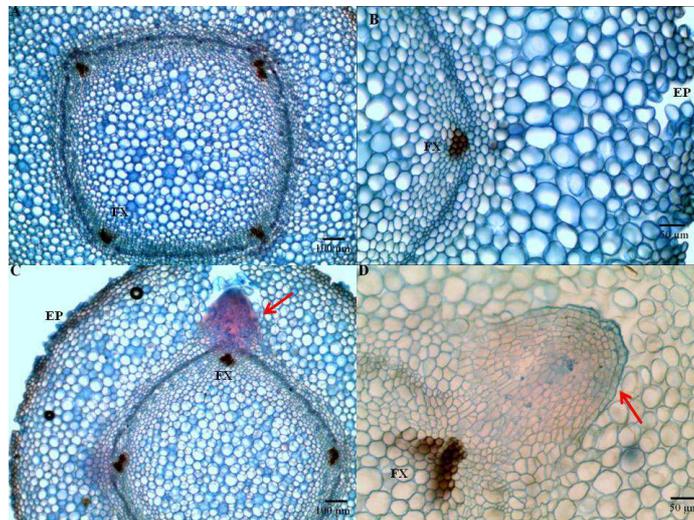


Figura 13 Corte transversal de raízes primárias de sementes de *E. falcata* com raiz primária de 3 mm de comprimento, seguido de dessecação até 10% de grau de umidade, pré-umidificação e reidratação após 12 dias. A - Tecidos em desenvolvimento. B – Detalhes dos tecidos. D – Formação de nova raiz (seta). D – Detalhe do desenvolvimento de nova raiz (seta). EP = Epiderme, FX = Fibras xilemáticas.

Como a estrutura ainda se encontrava em desenvolvimento não foi possível identificar se as novas raízes em formação eram raízes laterais (provenientes da raiz primária) ou raízes adventícias (provenientes de outros órgãos como, por exemplo, o caule ou hipocótilo) (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Com a morte das raízes primárias da semente, as novas raízes podem ser provenientes da região de transição entre raiz primária e hipocótilo, o colo, onde os cortes transversais foram realizados.

Vieira et al. (2010a), trabalhando com o restabelecimento de tolerância à dessecação em sementes de *Tabebuia impetiginosa* utilizando polietilenoglicol, observaram que mesmo após a radícula protruída apresentar necrose e consequente morte, houve a formação de novas raízes a partir do hipocótilo, as quais denominaram adventícias, que permitiram o crescimento e desenvolvimento de plântulas normais.

No caso de plântulas de *Sesbania virgata* secas até 10% de grau de umidade, houve a necrose e morte do ápice da raiz primária, sugerindo que a dessecação não tenha afetado as células meristemáticas do periciclo, o que permitiu a formação de raízes laterais e a retomada do crescimento dessas plântulas (COSTA, 2011).

Estudos pioneiros relatam que a tolerância à dessecação da radícula é rapidamente perdida assim que ocorre sua protrusão dos tecidos adjacentes, no entanto, isso não significa que a semente como um todo seja sensível à dessecação a partir deste momento; muitas sementes formam raízes laterais quando a radícula está morta, tornando-se aptas para germinar (KOSTER e LEOPOLD, 1988).

4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura

De maneira geral, as radículas de embriões embebidos por 18 horas e dessecados (Figura 14B) não apresentaram danos ultraestruturais após a reidratação quando comparadas a radículas de embriões provenientes de sementes embebidas por 18 horas sem dessecação (Figura 14A). Entretanto,

embriões com raiz primária de 1 mm e dessecados (Figura 14D), quando comparados aos embriões com raiz primária de 1 mm que não passaram pelo processo de dessecação (Figura 14C), apresentaram danos na ultraestrutura das raízes primárias como rachaduras e depressões. Também nos embriões com raiz primária de 3 mm que sofreram dessecação (Figura 14F), foi possível visualizar danos na ultraestrutura da raiz primária, como rachaduras, depressões e morte de células, quando comparados a embriões com raiz primária de 3 mm que não passaram pela dessecação (Figura 14E).

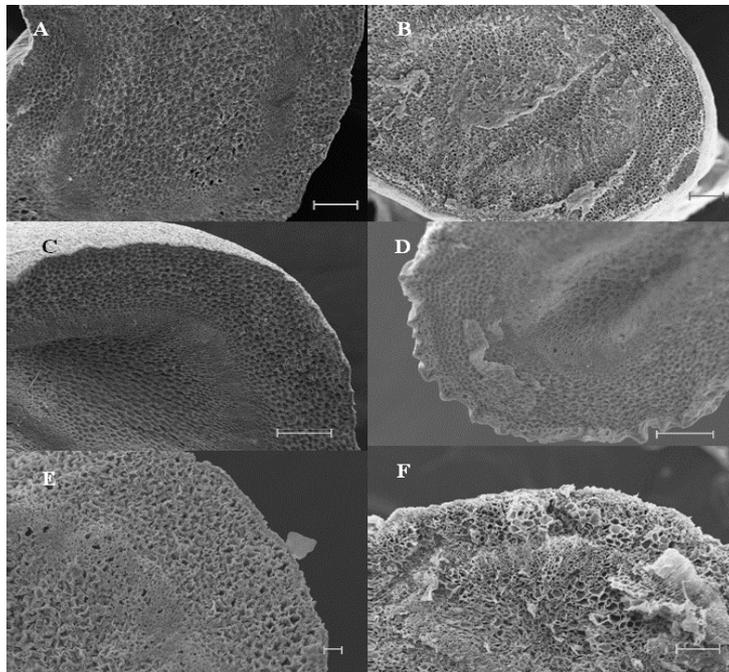


Figura 14 Aspecto ultraestrutural de corte transversal da radícula de sementes de *E. falcata* após 18 horas de embebição (A) (100 μm) e corte transversal da radícula após 18 horas de embebição, dessecação e reidratação (B) (100 μm). Corte transversal da raiz primária de sementes de *E. falcata* com 1 mm (C) (100 μm) e corte transversal da raiz primária de sementes embebidas com raiz primária de 1 mm, dessecadas e reidratadas (D) (100 μm). Corte transversal da raiz primária de sementes de *E. falcata* com 3 mm (E) (20 μm); e corte transversal da raiz primária de sementes embebidas com raiz primária de 3 mm, dessecadas e reidratadas (F) (100 μm).

Sementes dessecadas após 18 horas de embebição não apresentaram danos significativos em sua ultraestrutura, o que poderia justificar o fato de embriões embebidos por 18 horas e dessecados permanecerem tolerantes à dessecação (Figura 8).

Segundo Viché, Farrant e Driouich (2004), no estado hidratado, as células vegetais são caracterizadas por ter um único ou vários vacúolos grandes e cheios de água, no entanto, durante a desidratação, a água é perdida a partir dos vacúolos e o citoplasma encolhe criando tensões na membrana plasmática, o que pode resultar em rasgamento da membrana plasmática causando danos irreversíveis para as células.

Não foi possível inferir se tais danos foram causados durante a dessecação ou ao longo dos processos de pré-umidificação e reidratação. Entretanto é possível inferir que os danos mais pronunciados observados nas raízes primárias de 1 mm e 3 mm seriam uma das causas da reduzida porcentagem de germinação e de sobrevivência após a dessecação e reidratação (Figura 8).

A forma com que ocorre o reparo dos danos causados nas membranas pelos processos de dessecação e reidratação ainda não é conhecida (BEWLEY, 1997), porém, a ativação de proteínas antioxidantes estaria envolvida no processo.

4.6 Quantificação de peróxido de hidrogênio

Apenas o tratamento controle diferiu dos demais, apresentando maior concentração de peróxido de hidrogênio (Figura 15).

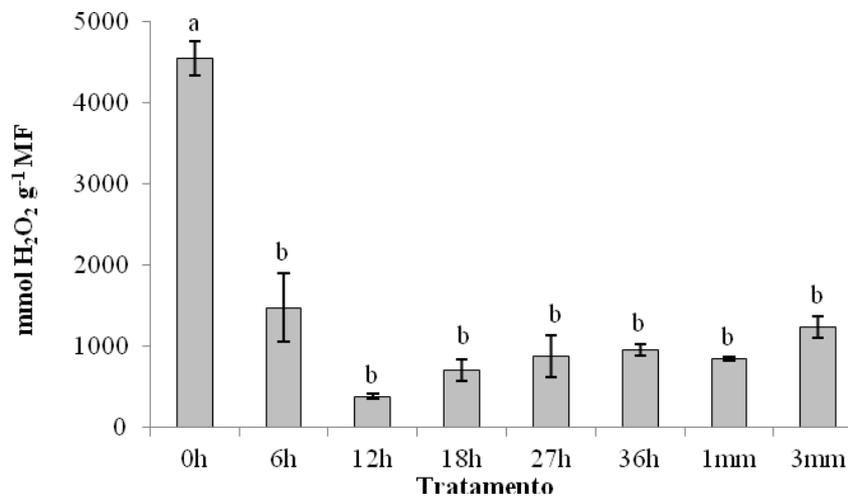


Figura 15 Quantificação de peróxido de hidrogênio ao longo da embebição em sementes de *E. falcata*. Cada barra representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A partir de 6 horas de embebição, a produção de H₂O₂ manteve-se reduzida, indicando a presença e ação de mecanismos envolvidos em sua degradação. Em baixas concentrações, o H₂O₂ pode agir como uma molécula sinalizadora envolvida na tolerância a estresses bióticos e abióticos (GILL e TUTEJA, 2010).

Entretanto, a concentração e produção de H₂O₂ varia com a espécie e com as partes da semente, de acordo com dados da literatura. Como exemplo, em eixos embrionários de ervilha o conteúdo de H₂O₂ aumentou gradualmente durante a germinação, entretanto o conteúdo nos cotilédones permaneceu relativamente baixo durante as primeiras 12 horas de embebição. Além disto, em tais sementes, H₂O₂ não foi detectado em eixos embrionários isolados de sementes secas nem em sementes após 6 horas de embebição (WOJTYLA et al., 2006). Em sementes de *Lupinus luteus* L. houve aumento no conteúdo de peróxido de hidrogênio nos eixos embrionários durante a embebição, entretanto nos cotilédones após 6 horas

de embebição houve decréscimo nos teores de H_2O_2 (GARNCZARSKA e WOJTYLA, 2008).

Os sítios exatos de produção de EROs durante a germinação ainda não são precisamente conhecidos, porém sabe-se que a produção de EROs é um dos principais fatores que afetam o processo germinativo (BAILLY, 2004). A germinação das sementes depende também de uma série de mecanismos de proteção contra os danos do estresse, especialmente danos oxidativos, a reativação do metabolismo durante a germinação é a principal fonte de EROs (WANG; MØLLER; SONG, 2012).

O peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa, é um bioproduto da atividade da SOD para prevenir o dano celular, e deve ser eliminado através da conversão à água em reações subsequentes envolvendo enzimas como APX e CAT, as quais regulam seus níveis nas células vegetais.

Bailly, El-Maarouf-Bouteau e Corbineau (2008) relatam que o peróxido de hidrogênio pode ser benéfico, no caso de superação de dormência, ou maléfico, no caso de envelhecimento, para a germinação dependendo do nível de acúmulo nas células do embrião.

A concentração efetiva de radicais livres nos tecidos vegetais é um resultado do equilíbrio dinâmico entre as taxas de produção e degradação (GARNCZARSKA e WOJTYLA, 2008).

4.7 Avaliação da peroxidação lipídica

Foi observado que, ao longo do processo germinativo, houve diminuição da formação de malondialdeído (MDA), evidenciando redução da peroxidação lipídica (Figura 16).

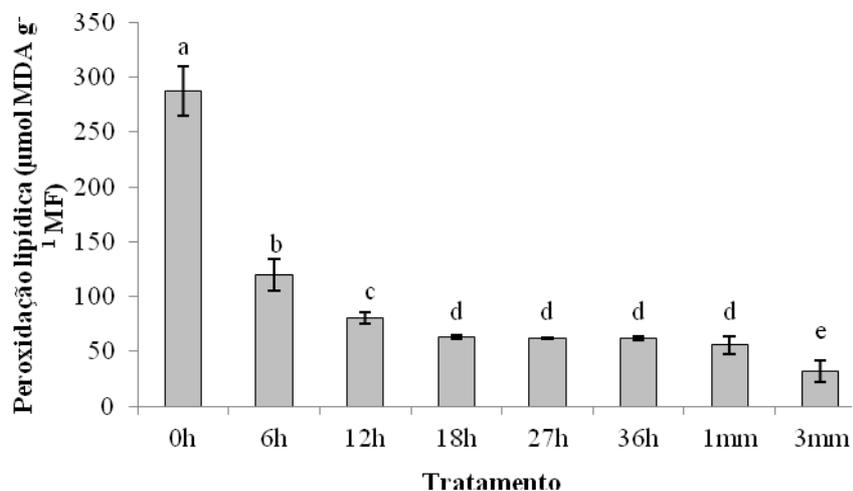


Figura 16 Avaliação da peroxidação lipídica através da quantificação de MDA ao longo da embebição em sementes de *E. falcata*. Cada barra representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Embora as membranas estejam protegidas nas sementes maduras e secas, os danos podem ocorrer durante a embebição (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010). A estrutura da membrana que se mantém numa fase gel durante a dessecação de maturação sofre uma transição para um estado líquido cristalino quando reidratada, e, caso ocorra uma rápida e heterogênea entrada de água, os danos em sua estrutura levarão ao extravazamento de solutos (HOEKSTRA; GOLOVIAN; BUITINK, 2001; WEITBRECHT; MULLER; LEUBNER-METZGER, 2011). Porém, segundo Bewley (1997), após um curto período de reidratação as membranas voltam a uma configuração estável, na qual o extravazamento de solutos é reduzido.

É descrito na literatura o papel da composição do tegumento, das lentes, da micrópila e do hilo no controle da absorção de água em sementes de *Fabaceae* (SOUZA e MARCOS FILHO, 2001; WOJTLA et al., 2006; HU et al., 2009). Uma vez que as sementes utilizadas neste trabalho sofreram escarificação mecânica com lixa até que o cotilédone fosse

exposto, a absorção de água pelas sementes pode ter sido rápida, causando alta peroxidação lipídica nos estágios iniciais da embebição.

A reativação do metabolismo seguido da embebição da semente é uma importante fonte de EROs. Segundo Gill e Tuteja (2010), a peroxidação de lipídios, assim como o dano na molécula de DNA, individualmente, podem ser considerados como os maiores determinantes da perda de viabilidade das sementes.

Uma das alterações na composição da membrana consiste no acúmulo de lipídios peroxidados, um indicador de injúrias e degradação de lipídios insaturados, provavelmente relacionados com a presença de radicais livres altamente reativos (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993). O malondialdeído (MDA) é o produto final da peroxidação de ácidos graxos insaturados de fosfolipídios e é um dos responsáveis pelos danos nas membranas celulares (SHARMA et al., 2012). Os produtos da quebra dos aldeídos tais como o MDA podem formar conjugados com DNA e proteínas (GILL e TUTEJA, 2010).

4.8 Atividade do sistema antioxidante

4.8.1 Atividade da dismutase do superóxido (SOD)

Durante as 12 primeiras horas de embebição não houve diferença significativa na atividade da SOD. Entretanto, a partir das 18 horas de embebição houve aumento na atividade dessa enzima, sendo que, estatisticamente, a atividade se manteve elevada até que a raiz primária atingisse 3 mm de comprimento (Figura 17).

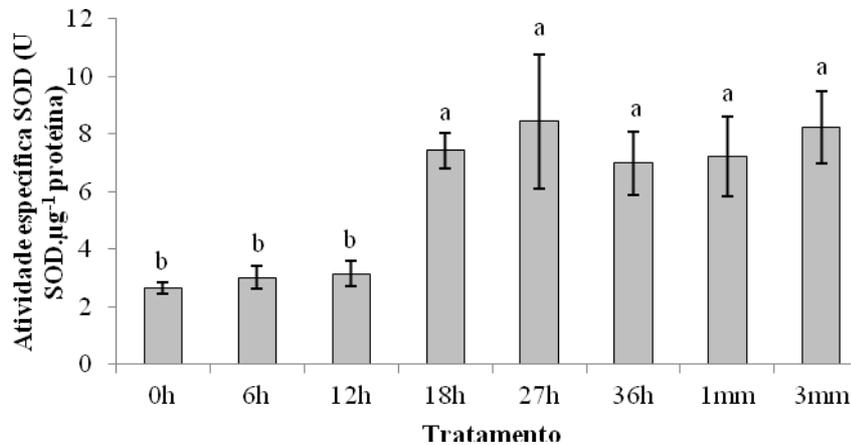


Figura 17 Avaliação da atividade da enzima SOD ao longo da embebição em sementes de *E. falcata*. Cada barra representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Atividade dessa enzima varia com a espécie durante a embebição. Em sementes de milho foi observado aumento na atividade específica da enzima SOD durante as primeiras 96 horas de embebição (LEPRINCE et al., 1990). Já durante o mesmo processo com sementes de girassol, Bailly et al. (2002) observaram aumento na atividade de diferentes enzimas antioxidantes, exceto para SOD.

Nas sementes de *Lupinus luteus* L. houve aumento na atividade da SOD nos eixos embrionários até a emergência da radícula, enquanto que nos cotilédones a atividade permaneceu constante (GARNCZARSKA e WOJTYLA, 2008). Segundo esses autores, o aumento da atividade da enzima pode ter sido estimulado pela crescente formação do ânion superóxido ao longo da embebição.

A atividade da SOD aumenta em plantas sujeitas a vários estresses ambientais e a ampliação de sua atividade é correlacionada com o aumento da tolerância das plantas aos estresses ambientais (SHARMA et al., 2012).

A análise eletroforética em sementes de ervilha demonstrou que as enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX estão presentes nas sementes secas e são ativadas durante a germinação, especialmente no eixo embrionário; a presença de todas essas enzimas, bem como outros antioxidantes de baixa massa molecular em sementes secas, possibilita à maquinaria antioxidante atuar assim que as enzimas sejam ativadas pela embebição (WOJTYLA et al., 2006).

4.8.2 Atividade da catalase (CAT)

Assim como para a atividade da SOD, a atividade da CAT se manteve baixa durante as primeiras 12 horas de embebição, apresentando aumento a partir das 18 horas, mantendo-se elevada até que a raiz primária atingisse 3 mm de comprimento (Figura 18).

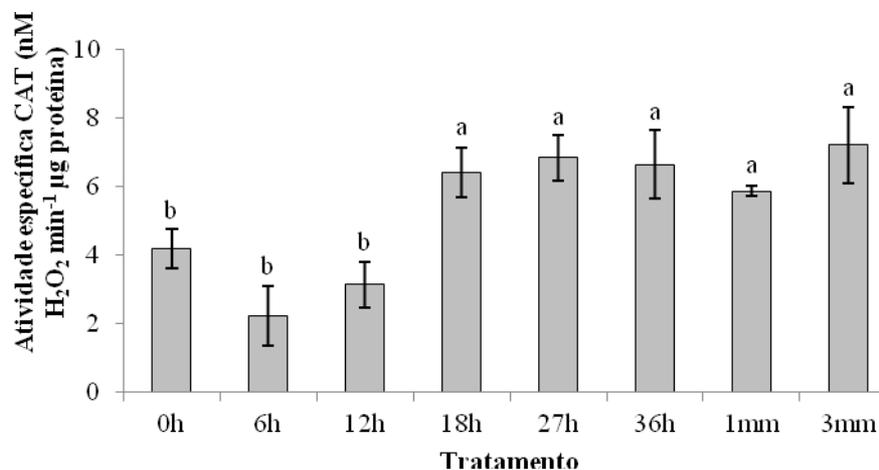


Figura 18 Avaliação da atividade da enzima CAT ao longo da embebição em sementes de *E. falcata*. Cada barra representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Um evento inicial da fase I da embebição é a retomada do metabolismo energético (BEWLEY, 1997; WOJTYLA et al., 2006; NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010). Após a fase inicial de aumento no consumo de oxigênio pela respiração, a taxa declina até que a radícula protrude dos tecidos adjacentes (BEWLEY, 1997). Sabe-se que o metabolismo respiratório é uma das fontes potenciais para a produção de EROs (MITTLER, 2002) e, com o aumento do metabolismo, é possível que ocorra aumento na produção de EROs que podem causar peroxidação lipídica e danos celulares (GILL e TUTEJA, 2010), desta forma, é necessário que a maquinaria antioxidante atue para evitar os danos causados pelas espécies reativas.

Em sementes de ervilha foi observado aumento da atividade da CAT tanto nos eixos embrionários quanto nos cotilédones (WOJTYLA et al., 2006), ocorrendo o mesmo em eixos e cotilédones de *Lupinus luteus* L. ao longo da embebição (GARNCZARSKA e WOJTYLA, 2008). Em soja, a CAT foi a enzima mais eficiente em remover o H_2O_2 de células de sementes com alta viabilidade nos estádios iniciais da embebição (GIDROL et al., 1994).

Karuppanapandian et al. (2011) sugerem que o aumento na atividade da CAT é um traço adaptativo que ajuda a superar os danos ao metabolismo dos tecidos através da diminuição dos níveis tóxicos de H_2O_2 .

Assim como observado neste trabalho, as enzimas SOD e CAT foram detectadas em sementes secas de *Lupinus luteus* L. e, segundo Garnczarska e Wojtyla (2008), a presença destas enzimas nas sementes secas é de grande importância para o primeiro estágio da germinação.

4.8.3 Atividade da peroxidase do ascorbato (APX)

Para a enzima APX, foi observado aumento da atividade após 12 horas de embebição (Figura 19).

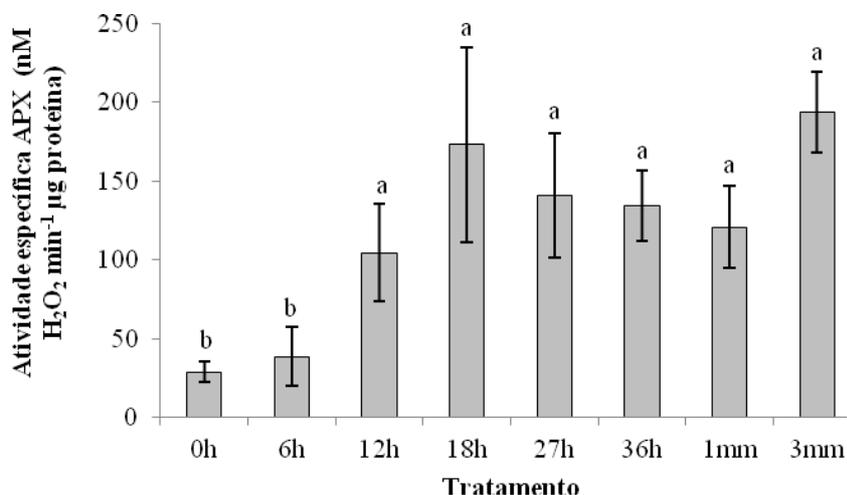


Figura 19 Avaliação da atividade da enzima APX ao longo da embebição em sementes de *E. falcata*. Cada barra representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A APX apresenta maior afinidade pelo H₂O₂ do que a CAT (SHARMA et al., 2012), o que justifica o fato de em um menor tempo de embebição (12 horas) ter sido observado o aumento de sua atividade quando comparada à CAT (18 horas) (Figura 18).

No caso de sementes secas e maduras de milho, quando colocadas para embeber, observou-se um rápido aumento da atividade de algumas enzimas do sistema antioxidante, como SOD, CAT e APX, dentre outras (HUANG e SONG, 2013), indicando o aumento da atividade metabólica com a embebição.

Segundo Wojtyla et al. (2006), a análise correta da absorção de água e seu movimento durante as fases iniciais da germinação é necessária para se compreender todos os processos de ativação da vida a partir da anabiose, e além disso, mudanças induzidas pela adição de água à semente seca são importantes para a compreensão da ativação enzimática.

Para todas as enzimas analisadas neste trabalho, foi observada atividade específica no tempo 0 da embebição (semente seca). Segundo

Garnczarka e Wojtyla (2008), assume-se que as estruturas e enzimas necessárias para a retomada inicial da atividade metabólica estão geralmente presentes nas sementes secas, tendo sobrevivido, pelo menos parcialmente, intactas à fase de dessecação que finaliza a maturação de sementes.

Segundo Leprince, Hendry e Mckersie (1993), o sistema antioxidante enzimático está provavelmente mais envolvido em uma resposta antioxidante inicial, através da neutralização de moléculas de oxigênio ativado potencialmente tóxicas formadas durante a perda de água.

A diminuição da peroxidação lipídica ao longo da embebição em sementes de *E. falcata* (Figura 16) pode ter sido causada pela regulação e produção de EROS, como o H_2O_2 (Figura 15), alcançado através do aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX (Figuras 17, 18 e 19).

4.9 Quantificação de proteínas totais

O conteúdo de proteínas totais decresceu durante as primeiras 12 horas de embebição, permanecendo constante até que a raiz primária atingisse 3 mm de comprimento (Figura 20).

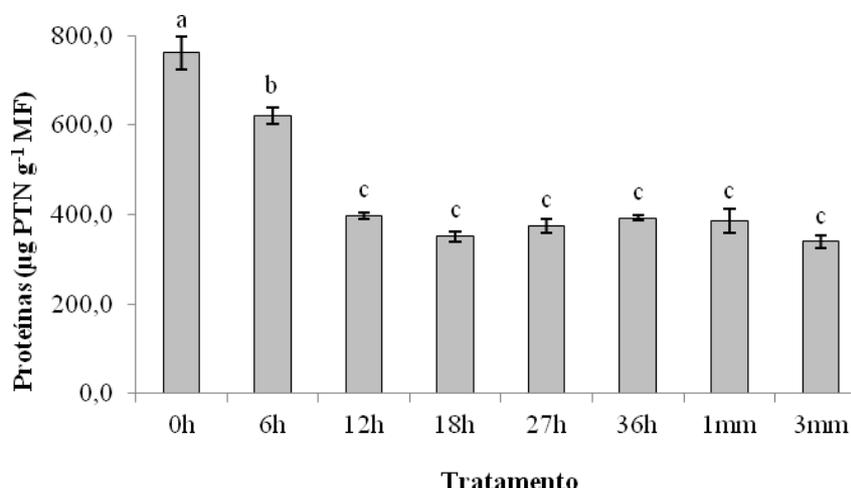


Figura 20 Quantificação de proteínas totais ao longo da embebição em sementes de *E. falcata*. Cada barra representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O processo de degradação proteica durante a germinação é comum para diferentes espécies, gêneros e famílias de plantas. Em sementes de *Erythrina velutina* forma *aurantiaca* também foi observado o decréscimo na quantificação de proteínas ao longo da germinação e formação de plântulas (OLIVEIRA et al., 2008).

Kirmizi e Güleriyüz (2007) observaram decréscimo nos valores de proteínas totais durante 7 dias de germinação de sementes de *Vicia faba*, coincidindo com o aumento do conteúdo de aminoácidos livres totais. Em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. também foi observada a queda no conteúdo de proteínas totais durante a germinação (CORTE; LIMA; BORGES, 2006).

A mobilização de proteínas de reserva durante a embebição das sementes é um processo crucial para o estabelecimento da plântula, pois tais proteínas que foram sintetizadas e armazenadas em abundância nas sementes são metabolizadas em aminoácidos livres para a biossíntese e geração de energia (WILSON e WILSON, 2012).

Segundo Müntz (1996), em sementes de dicotiledôneas durante a germinação existem endopeptidases especiais que atuam na degradação de proteínas de armazenamento. Tais proteínas, em sentido restrito, são as globulinas, características de sementes de dicotiledôneas, representando fonte de carbono e nitrogênio quando reativadas. Além disso, Müntz et al. (2001) afirmam que a iniciação da mobilização das proteínas de armazenamento durante o início da germinação é realizada por proteases, o que indica que os mecanismos de proteção de tais proteínas contra a degradação durante o meio e final da maturação foram superados.

O processo de germinação é acompanhado pela digestão de reservas, sendo as proteínas convertidas em aminoácidos pela atividade de proteases, os quais são translocados para os pontos de crescimento do eixo embrionário para a formação de tecidos vivos, ou participam de reações da cadeia respiratória (MARCOS FILHO, 2005).

4.10 Reindução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *E. falcata*.

4.10.1 Experimento 1

Houve efeito apenas do potencial osmótico de -1,4 MPa, sobre os diferentes comprimentos de raiz primária, após 35 dias em casa de vegetação. Sementes com raiz primária de 1 mm apresentaram 21,25% de sobrevivência, e sementes com 3 mm apresentaram 3,75% de sobrevivência (Figura 21).

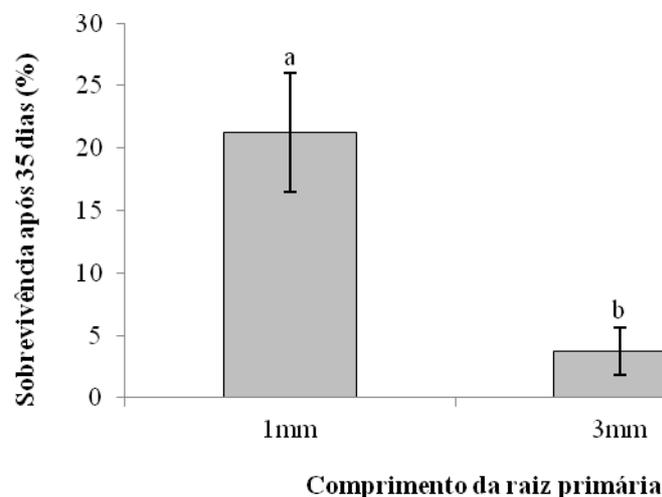


Figura 22 Porcentagem de sobrevivência de plântulas a partir de sementes de *E. falcata* incubadas em PEG a -1,4 MPa com raiz primária de 1 mm e 3 mm, após 35 dias em casa de vegetação. Cada barra representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Entretanto, a incubação das sementes em PEG a -1,4 MPa não foi eficiente para elevar a porcentagem de sobrevivência aos 35 dias quando comparado às sementes que não foram incubadas em PEG, uma vez que sementes com raiz primária de 1 mm não incubadas em PEG apresentaram 22,5% de sobrevivência e com raiz primária de 3 mm apresentaram 11,25% de sobrevivência ao 35 dias após transferência para casa de vegetação (Figura 8).

Segundo Buitink et al. (2003), nem todos os mecanismos que são induzidos durante a incubação em PEG estão necessariamente relacionados com a tolerância à dessecação, mas também podem estar relacionados com uma resposta ao estresse osmótico exercido sobre os tecidos pelo PEG.

Foi observada diferença significativa com relação ao grau de umidade apenas para raízes primárias de 1 mm do tratamento controle quando comparada aos pré-tratamentos com PEG (Figura 22).

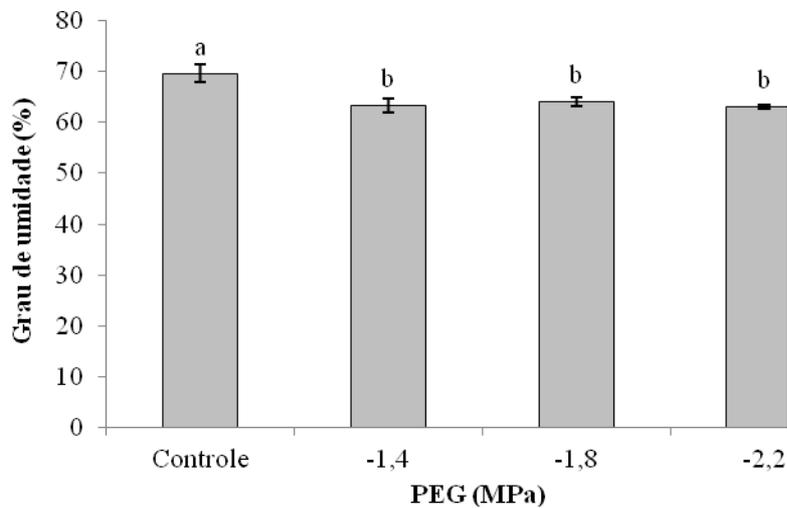


Figura 23 Grau de umidade em sementes de *E. falcata* incubadas em PEG por 3 dias a 5 °C com raiz primária de 1 mm. Cada barra representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Como mostrado na Figura acima, apesar da diferença significativa com relação ao grau de umidade, houve pouca desidratação das sementes incubadas em PEG ao longo de 3 dias, o que poderia explicar a baixa porcentagem de sobrevivência após 35 dias da transferência para casa de vegetação.

Segundo Buitink et al. (2003), os parâmetros que influenciam o restabelecimento de tolerância à dessecação são temperatura, potencial hídrico e o tamanho da radícula protrudida.

Vieira et al. (2010a) observaram que o tratamento osmótico seguido de secagem lenta foi eficiente na reindução de tolerância em radículas protrudidas com comprimento de 3 mm de *Tabebuia impetiginosa*.

Segundo Buitink et al. (2003), o tratamento osmótico é capaz de induzir mudanças nos fluxos através de diferentes rotas, juntamente com a estabilização do crescimento.

4.10.2 Experimento 2

Após 5 dias da reidratação não foi observada a retomada do crescimento das raízes primárias. As sementes que não apresentaram necrose e degradações visíveis foram consideradas sobreviventes à dessecação e, após 35 dias da transferência para casa de vegetação, foi avaliada a porcentagem de formação de plântulas normais. Entretanto não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com relação às porcentagens de sobrevivência (Figura 23).

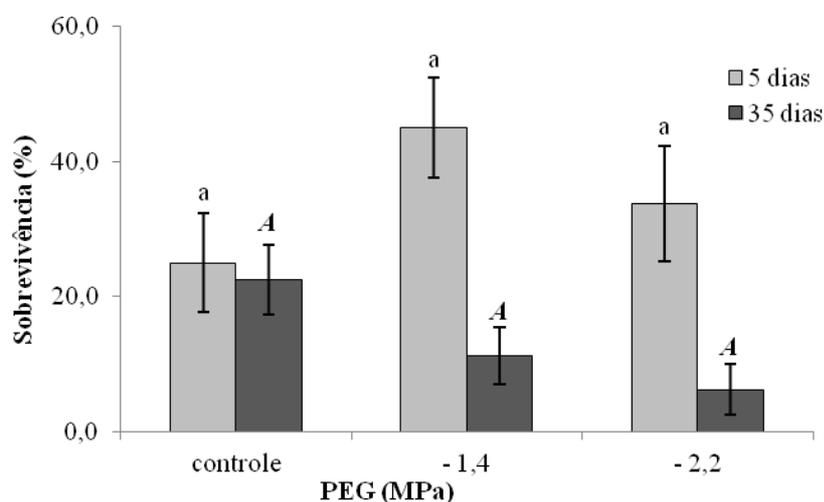


Figura 23 Porcentagem de sobrevivência após 5 dias de reidratação e sobrevivência de plântulas após 35 dias em casa de vegetação a partir de sementes de *E. falcata* incubadas em PEG a -1,4MPa e -2,2MPa com raiz primária de 1 mm. Cada barra representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para sobrevivência após 5 dias e maiúsculas para sobrevivência após 35 dias) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Foi observado que o grau de umidade após a incubação em PEG por 3 dias no escuro não diferiu entre os tratamentos (Figura 24).

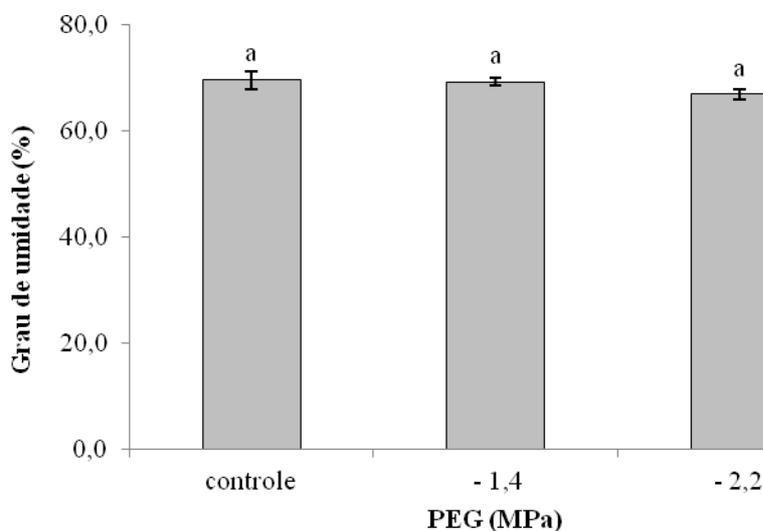


Figura 24 Grau de umidade em sementes de *E. falcata* incubadas em PEG com diferentes potenciais osmóticos por 3 dias a 10 °C com raiz primária de 1 mm. Cada barra representa a média de quatro repetições de 20 sementes e as barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em sementes de *Medicago truncatula*, durante a incubação em PEG, ocorreu síntese de substâncias protetoras, tais como sacarose e dehidrinas, demonstrando que o estresse moderado prévio pode levar à tolerância à dessecação. BUITINK et al. (2003) observaram que baixa temperatura de incubação (10°C) é ótima, mas não crítica, para o restabelecimento da tolerância a dessecação em sementes germinadas.

Como não foi observada redução do grau de umidade em sementes incubadas em PEG (Figura 24) pode não ter ocorrido sinalização e síntese de moléculas protetoras, impossibilitando o aumento na porcentagem de sobrevivência de sementes de *E. falcata* após a dessecação (Figura 23).

De acordo com Vieira et al. (2010a), incubação em PEG seguida pela secagem rápida não foi eficiente para reinduzir a tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e, de acordo com esses autores, esse tipo de secagem pode não permitir o acúmulo de moléculas protetoras, tais como sacarose e oligossacarídeos maiores.

A perda e a reindução de tolerância à dessecação são processos que envolvem interações metabólicas e estruturais. A falta ou mau funcionamento de alguma dessas características resultam em diferentes graus de tolerância. Entretanto, a completa proteção contra os danos da dessecação parece ser impossível (VERTUCCI e FARRANT, 1995).

5 CONCLUSÕES

A escarificação mecânica consiste em um método eficiente para a superação de dormência em sementes de *E. falcata*. Tais sementes apresentam rápida absorção de água nas primeiras 18 horas quando escarificadas com lixa d'água e a emergência da radícula ocorre após 36 horas de embebição.

Sementes de *E. falcata* toleram a dessecação até as 18 horas de embebição e sementes com raiz primária de 3 mm apresentam formação de novas raízes após a dessecação e reidratação. A dessecação das sementes a partir de 27 horas de embebição prejudica o crescimento e desenvolvimento de plântulas.

Durante a embebição de sementes de *E. falcata*, foi observada redução na produção de H_2O_2 e peroxidação de lipídios, e aumento na atividade de enzimas antioxidantes. O conteúdo de proteínas totais diminuiu ao longo da embebição.

Não foi possível restabelecer a tolerância à dessecação em sementes germinadas de *E. falcata* com radícula de 1 mm e 3 mm utilizando PEG 6.000.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. **Apostila do curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA, 2004. 43p.

ALMEIDA, E. E. Caracterização farmacognóstica da espécie *Erythrina falcata* Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n.1, p. 100-105, Jan./Mar. 2010.

ANGELOVICI, R.; GALILI, G.; FERNIE, A.R. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, London, v.15, n.4, p. 211-218, Apr. 2010.

BAILLY, C. et al. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 357, p.701-708, Apr. 2001.

BAILLY, C.; BAGATEK-LESZCZYNSKA, R.; COME, D. Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 12, n.1, p. 47-55, Mar. 2002.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n.2, p. 93-107, June, 2004.

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUATEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology, **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v.331, n. 10, p. 806-814, Oct. 2008.

BALESTRAZZI et al. Seed imbibition in *Medicago truncatula* Gaertn.: expression profiles of DNA repair genes in relation to PEG-mediated stress, **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.168, n. 7, p. 706-713, May 2011.

BARBEDO, C. J.; MARCUS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes, **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v.12, n.2, p.145-164, May/Aug. 1998.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. Seed dormancy in trees of climax tropical vegetation types. **Tropical Ecology**, Varanasi, v. 46, n. 1, p.17–28, June/Aug. 2005.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Orthodox and recalcitrant seeds. In: **Tropical Tree Seed Manual**. Reforestation, Nurseries and Genetic Resources (RNGR) Programme, The US Department of Agriculture, Forest Service, p. 137-147, 2003.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, July 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n.1-2, p. 248-254, May 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 395 p.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, London.,v.53, p. 302–310, 1978.

BUITINK, J.; VU, B.Z.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Wallington, v. 13, n. 4, p. 273-286, Dec. 2003.

CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 2, p.15-25, Abr. 2006.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CHEN, Q. et al. Proteomic profiling and redox status alteration of recalcitrant tea (*Camellia sinensis*) seed in response to desiccation. **Planta**, New York, v. 233, n. 3, p. 583-592, Mar. 2011.

COLVILLE, L.; KRANNER, I. Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 62, n.3, p. 241-255, Dec. 2010.

CORTE, V. B.; LIMA, E. E.; BORGES, C. A. P. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.6, p.941-949, Nov./Dez. 2006.

COSTA, M. C. D. **Armazenamento de plântulas de *Sesbania virgata***. 2011. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **Design of seed storage facilities for genetic conservation**. Rome: IPGRI, 1985. 100 p.

DAVIDE, A. C.; CHAVES, M. M. F. . Morfologia de sementes, plântulas e mudas de *Erythrina falcata* Benth. e *Platycyamus regnellii* Benth. Fabaceae. **CERNE**, Lavras, v. 2, n.2, p. 69-80, 1996.

DAVIDE, A.C.; FARIA, J. M. R.; BOTELHO, S.A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG; Lavras: UFLA, 1995. 41p.

DIAS, S. A. Neuropharmacological and genotoxic evaluation of ethanol extract from *Erythrina falcata* leaves, a plant used in Brazilian folk medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 23, n.2, p. 335-341, Mar./Abr. 2013.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.41, n.9, p.1167-1174, Sept. 1990.

FARIA et al. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula*

seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, Aug. 2005.

FARRANT, J. M. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. **Plant Ecology**, Dordrecht, v.151, n. 1, p.29-39, Nov. 2000.

FARRANT, J. M. et al. Desiccation tolerance in the vegetative tissues of the fern *Mohria caffrorum* is seasonally regulated. **The Plant Journal**, Malden, v. 57, n.1, p. 65–79, Oct. 2009.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1. pacote computacional).

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**, Paris, v. 47, n. 1, p. 56-62, Jan. 2009.

GARNCZARSKA, M.; WOJTYLA, L. Differential response of antioxidative enzymes in embryonic axes and cotyledons of germinating lupine seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 30, n.4, p. 427-432, July 2008.

GECHEV, T. S. et al. Molecular mechanisms of desiccation tolerance in resurrection plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 69, n. 19, p. 3175–3186, Oct. 2012.

GIANNOPOLITIS, C. N.; REIS, S. K. Superoxide dismutases occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.59, n.2, p.309–314, Feb. 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.48, n. 2, p. 909-930, Dec. 2010.

GUIMARÃES, C. C. et al. Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum*

dubium (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.33, n. 2, p. 207-215, Abr. 2011.

HAVIR, E. A., MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.84, n.2, p.450–455, June 1987.

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

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical Bulletin**, Rome, n.1, 1996.

HU, X.W. et al. 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**, Wallington, v.19, n.2, p.73-80, June 2009.

HUANG, H.; SONG, S. Change in desiccation tolerance of maize embryos during development and germination at different water potential PEG-6000 in relation to oxidative process. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 68, n.1, p. 61-70, July 2013.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. 777 p.

KIRMIZI, S.; GULERYUZ, G. Protein mobilization and proteolytic enzyme activities during seed germination of broad bean (*Vicia faba* L.). **Zeitschrift fur . Naturforschung C.**, Tubingen, v. 61, n.3-4, p. 222-226, Mar./Apr. 2006.

KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A. C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, n. 3, p.829-832, Nov. 1988.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v.188, n. 3, p. 655–673, Sept. 2010.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: from genomics to the field. **Plant Science**, Ireland, v.179, n. 6, p. 554-564, Dec. 2010.

LEPRINCE, O. et al. The role of free radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays*). **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, n. 4, p. 573-580, Apr. 1990.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallington, v. 3, n. 4, p. 231-246, Dec. 1993.

LIMA, H.C. de. *Erythrina* in **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29676>>.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 1.

LOUREIRO, M. B. Aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de sementes e plântulas de *Amburana cearensis* (fr. All.) A.c. smith (*Leguminosae - Papilionoideae*). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 37, n.4, p. 679-689, July/Aug. 2013.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, Mar. 1962.

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

MATHEUS, M. T. et al. Superação da dormência em sementes de duas espécies de *Erythrina*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, p. 48-53, July/Set., 2010.

MEDEIROS, A. C. de S.; ABREU, D. C. A. de Instruções para testes de germinação de sementes florestais nativas da Mata Atlântica. **Comunicado Técnico**, Colombo, n. 151, 5 p, 2005.

MELLO, J. I. O.; BARDEDOL, C.J.; SALATIONOLL, A. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 4, p.889-899, July/Aug. 2010.

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

MOÏSE, J.A. et al. Seed coats: structure, development, composition and biotechnology. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, New York, v. 41, n. 5, p. 620-644, Sept./ Oct. 2005.

MÜNTZ, K. et al. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 362, p. 1741–1752, Sept. 2001.

MÜNTZ, K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 298, p. 605-622, May 1996.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.22, n. 5, p.867–880, Aug. 1981.

NERY, F. C. **Germinação, cultivo *in vitro* e tolerância ao congelamento de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)**. 2008. 217 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination-still a mystery. **Plant Science**, Ireland, v. 179, n. 6, p. 574–581, Dec. 2010.

ORWA, C. et al. **Agroforestry database**: a tree reference and selection guide version 4.0. 2009. <<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>>.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallington, v. 9, n. 1, p. 13–37, Jan. 1999.

PAMMENTER, N.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, p. 56-69, 2000. Especial.

POTTS, M. Desiccation tolerance: a simple process?. **Trends in microbiology**, London, v. 9, n. 11, p. 553-559, 2001.

PUKACKA, S.; MALEC, M.; RATAJCZAK, E. ROS production and antioxidative system activity in embryonic axes of *Quercus robur* seeds under different desiccation rate conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 33, n. 6, p. 2219-2227, Nov. 2011.

RAJJOU, L. et al. Seed germination and vigor. **Annual Reviews of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 507–533, 2012.

REISDORPH, N. A.; KOSTER, K. L. Progressive loss of desiccation tolerance in germinating pea (*Pisum sativum*) seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, n. 2, p. 265-271, 1999.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto rio grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.102-123, jan./fev., 2001.

SANTOS, L. W. Armazenamento e métodos para a superação da dormência de sementes de mulungu. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 171-177, 2013.

SHARMA, P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, Oxford, p. 1-26, 2012.

SILVA, A. J. C.; CARPANEZZI, A. A.; LAVORANTI, O. J. Quebra de dormência de sementes de *Erythrina crista-galli*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, n.53, p.65-78, 2006.

SILVA, K. B. Armazenamento de sementes de *Erythrina velutina* Willd. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.35, n.4, p.809-816, July/Ago. 2011.

SILVA JÚNIOR, V. T. Armazenamento de sementes de *Erythrina velutina* Willd. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.36, n.2, p.247-257, Mar./Abr. 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 703 p.

SOUZA, F. H. D. D.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed–environment relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, p.365–375; 2001.

VARGHESE, B. et al. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 142, n. 4, p. 326-338, Aug. 2011.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, East Park Shannon, v. 151, n. 1, p. 59-66, Feb. 2000.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.237-271.

VICRÉ, M.; FARRANT, J. M.; DRIOUICH, A. Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 1329-1340, Nov. 2004.

VIEIRA, C. V. et al. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 62, n. 3, p. 257-263, Dec. 2010a.

VIEIRA, E. L. **Manual de fisiologia vegetal**. São Luís: EDUFMA, 2010b. 230p. Disponível em: < http://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=eid=enzo_ItcvMCEoi=fndepg=PA1edq=a+%C3%A1gua+constitui+cerca+de+nos+tecidos+vegetais&ots=S4m4L_eaW&sig=YT5rY-c4iE841FwMnRVTdj-e5Wc#v=onepage&q=a%20%C3%A1gua%20constitui%20cerca%20de%20nos%20tecidos%20vegetais&f=false > Acesso em: 25 fev. 2013.

WANG, W.-Q.; MØLLER, I. M.; SONG, S.-Q. Proteomic analysis of embryonic axis of *Pisum sativum* seeds during germination and identification of proteins associated with loss of desiccation tolerance. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 77, n.21, p. 68–86, Dec. 2012.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Molecular physiology of legume seed development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.56, p. 253–279, 2005.

WEITBRECHT, K.; MULLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.62, n. 10, p. 3289–3309, Mar. 2011.

WILSON, A. L. T.; WILSON, K. A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 145 , n.1, p. 140–153, Jan. 2012.

WOJTYLA, L. et al. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 163, n. 12, p. 1207–1220, Dec. 2006.