

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**MECANISMOS DE CONTROLE DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Caesalpinia echinata* LAM. (PAU-BRASIL) e *Caesalpinia
peltophoroides* BENTH. (SIBIPIRUNA)**

JOÃO PAULO NALDI SILVA

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

BOTUCATU – SP

2010

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

**MECANISMOS DE CONTROLE DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Caesalpinia echinata* LAM. (PAU-BRASIL) e *Caesalpinia
peltophoroides* BENTH. (SIBIPIRUNA)**

JOÃO PAULO NALDI SILVA

DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

ORIENTADOR

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

BOTUCATU – SP

2010

“Acredite e não tenha medo;
faça o seu que a magia acontece;
enxergue primeiro que depois aparece.”

Trecho retirado do livro “Diário da Sibila Rubra, de Kizzy Ysatis”
Aprendidas com um amigo incrível

DEDICO

Aos meus pais, Gilberto e Cleusa.

Que me deixaram acreditar que

posso ser o que quiser.

AGRADECIMENTOS

Nesses pouco mais de dois anos em que estive trabalhando nesta dissertação, foram muitas as pessoas que me ajudaram, tanto para tirar dúvidas sobre sementes, quanto para me apoiar nos dias difíceis, além das instituições que me bancaram e permitiram que eu realizasse essa pós-graduação. A todos sou muito grato.

Preciso agradecer a todos os amigos do Index, Juliana Iura, Nestor Martini Neto, Marcio Bonjovani, Carolina Oliveira, Edmir Lamarca, Débora Molizane, Cibelle Martins, Carmen Teixeira, Talita Amador, Liliana Delgado, Claudio Barbedo e Tatiana Mescia, que me acolheram de forma carinhosa e com muitas risadas, suportaram todos os meus surtos de ansiedade, ajudaram a beneficiar os milhões de frutos de pau-brasil, ensinaram a fazer o café que o orientador gosta, por terem me feito rir na hora do aperto, pelas caronas até o metrô, e por me ajudarem a crescer profissionalmente, esses dois anos foram incríveis.

Agradeço imensamente a todos os alunos e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, do Instituto de Botânica, onde passei boa parte desses dois anos. A todos os alunos (não vou arriscar esquecer de alguém) que me deram força nos dias ruins, que fizeram companhia nos fins de semana e feriados, tiraram minhas dúvidas, me levaram para o bar. Muito obrigado! Agradeço também a Mary Monteiro, que suportou toda a minha pressa, me livrou de vários pepinos no laboratório e ainda arranjava nitrogênio líquido no dia 24 de dezembro!

Agradeço também pela oportunidade de ter conhecido a cidade de Botucatu, assim como aos alunos e funcionários do Departamento de Botânica, da UNESP, e da PG do Instituto de Biociências, em especial a Luciene, agüentando a minha pressa pelos documentos. À Dra Silvia Machado, por toda a atenção, apoio e cordialidade dada a mim, obrigado.

Agradeço em especial a amiga Jaqueline Corsato, por todos os momentos que apoiávamos um no outro, você gritando daí e eu gritando daqui! Ao colega de papos Valdir Zucarelli e a Douglas Kohatsu, que suportaram minha presença por curtos 6 meses na cidade, sempre prestativos, sinto saudades de todos.

Agradeço também aos funcionários da Estação Ecológica e Experimental de Mogi-Guaçu, por todo o apoio na coleta de frutos e sementes de pau-brasil. Especialmente ao Dr João Del Giudice, pela paciência em ficar de olho no bosque de pau-brasil para me avisar da floração das árvores.

Agradeço também ao professor José Marcio Rocha Faria, da Universidade Federal de Lavras, por toda a ajuda na montagem dos experimentos de secagem utilizando as soluções salinas, tirando as minhas dúvidas sempre de maneira atenciosa.

Um exemplo de profissional que quero ser quando crescer, agradeço todas as palavras de estímulo da Dra Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro, do Instituto de Botânica, espero aprender muito mais com a senhora!

Quase que chegando aos 45 minutos do segundo tempo, agradeço muito ao pós-doc Semi-Deus Dr Danilo Centeno, que não tem nem um ano de Botânico completado ainda, e já me ajudou em todas as análises de ciclitóis e de ABA, na discussão dos resultados a o que fazer com o GC-MS (e com a vida), quando a luz acaba, pelo apoio e torcida durante a escrita e pelas idéias para o doutorado, sem falar na paciência de tirar todas as minhas dúvidas, todos os dias.

Preciso agradecer não apenas nestas frases, o Professor Dr Eduardo Purgatto, da Universidade de São Paulo, por todo o auxílio dado nas análises de ABA, que apesar de estar na França fazendo seu pós doutorado, respondia todos os meus três emails por dia, seja sábado ou domingo, tirando todas as milhões de dúvidas bestas que tinha e me ensinando a utilizar o GC-MS a distância, sempre muito atencioso e cordial. Merci.

Nestas análises, tive ajuda crucial também da sempre humorada Dra Patrícia Pinho na extração de ABA das amostras, além da ajuda do Dr Marco Tiné para o preparo de diazometano, agradeço muito pela paciência e por me ensinar a como NÃO explodir o laboratório!

Agradeço o apoio financeiro concedido pela FAPESP, ao aprovar meu projeto de bolsa de mestrado (Processo: 08/51971-8), e através do projeto temático “Carboidratos de plantas tropicais como moduladores de processos ecofisiológicos e indicadores de respostas a estresses ambientais” (Processo: 05/04139-7), coordenado pela Dra Márcia Regina Braga, que sempre apoiou este trabalho.

Agradeço também o apoio financeiro do CNPq, através de projetos (Processo: 481.484/2007-8) e (Processo: 477.640/2009-5) coordenados pelo Dr Claudio José Barbedo.

Agradeço também o apoio financeiro dado desde o início dos tempos por Gilberto e Cleusa, principalmente no início desta pós graduação. Espero não precisar mais deste tipo de apoio, apesar de ser o único que eu possa gastar com itens que não seja material de consumo, além de não precisar devolver o que sobrar.

Agradecimentos sem palavras a todos os meus amigos de longa data, Danilo Toyota, Yassuo Watanabe e Rodrigo Bega, pela paciência por todos os ‘não’ que tive que dar, por me

agüentarem nos dias de estresse, por me abrigarem por dias e dias em casa, e principalmente por me darem todo o apoio que precisava sem precisar pedir.

Outro amigo a agradecer é Hugo Vigerelli, que me ajudou a ver um lado da vida otimista e cheio de esperanças e de possibilidades. Este trabalho não seria o mesmo sem o seu apoio.

Peço perdão a minha família, por todos os aniversários que perdi, as viagens que deixei de ir e ao pouco tempo que passei com vocês nesses dois anos. E agradeço ao apoio incondicional que sempre me deram para a carreira e para a vida. Pai, Mãe, Ju e Ká, muito obrigado!

Agradeço a Claudio Barbedo e a Marília Gaspar por terem me aceitado como orientado e me ensinado não apenas sobre sementes e bioquímica, mas também sobre a vida profissional e pessoal que pretendo ter. Obrigado por todas as palavras de incentivo e puxões de orelha, e desculpem qualquer coisa que tenha passado batido. Não faço ainda idéia do que fui capaz de aprender com vocês, mas acredito que um dia a ficha caia. Agradeço desde já.

Por fim, preciso agradecer ao Dr. Emerson Alves da Silva, e a Dra Maria Angela M. de Carvalho, responsáveis pela primeira entrevista que fiz no Instituto de Botânica, permitindo que eu pudesse fazer um trabalho como esse. Muito obrigado.

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução geral.....	3
Revisão de literatura.....	6
Capítulo 1 – Determinação da fase tolerante e intolerante à dessecação em sementes maduras de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (pau-brasil).....	13
Capítulo 2 – Variações na composição dos carboidratos solúveis e de ciclitóis durante a aquisição e perda de tolerância à dessecação em sementes de <i>C. echinata</i> Lam (pau-brasil).....	33
Capítulo 3 – Aquisição e perda de tolerância à dessecação em sementes de <i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth (sibipiruna).....	72
Capítulo 4 – Análise comparativa da tolerância à dessecação em sementes de duas <i>Caesalpinia</i>	100
Considerações finais.....	115
Referências.....	116

RESUMO - A aquisição da tolerância à dessecação ocorre durante a maturação da semente, após acúmulo de reservas e antes do início do processo natural de secagem, porém, com o avanço da germinação a sensibilidade a dessecação aumenta. Estresses hídricos podem induzir ou restabelecer a tolerância à dessecação em sementes, porém, não se sabe em quais processos ele atua, como na ativação de genes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aquisição e perda de tolerância à dessecação em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), e a possibilidade de indução deste processo avaliando as modificações nos carboidratos solúveis e de ciclitóis, nos níveis endógenos de ABA e na expressão de aquaporinas. Foram observadas diferenças na aquisição de tolerância em sementes imaturas de mesma idade, produzidas nas mesmas matrizes em 2007 e 2008, com diferentes composições de carboidratos solúveis. Sementes maduras perdem a tolerância à dessecação logo após protrusão da raiz primária, em comprimentos dependentes do grau de deterioração da semente. Sementes imaturas e maduras tolerantes de *C. echinata* suportaram a desidratação de formas diferentes, utilizando reservas de amido e ciclitóis, com papel da sacarose quando secas. Esses resultados foram comparados com sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth (sibipiruna), demonstrando comportamentos fisiológicos distintos, provavelmente relacionados com o tipo de reserva que acumulam.

Termos para indexação: tolerância à dessecação em sementes, carboidratos solúveis, ciclitóis, *C. echinata*, *C. peltophoroides*.

ABSTRACT - The acquisition of desiccation tolerance occurs during seed maturation, after reserves accumulation and before the natural process of drying, however, with seed germination the desiccation sensitivity increases. Water stress can induce or restore the desiccation tolerance in seeds, but it is unclear what processes it acts, like activation of genes. The objective of this work was to evaluate the acquisition and loss of desiccation tolerance in *Caesalpinia echinata* Lam (brazil-wood) seeds, and the possibility to induction this process, evaluating the soluble carbohydrates and cyclitols changes, the ABA endogenous levels and expression of aquaporins. Differences were observed in the tolerance acquisition in immature seeds of the same age, produced by the same trees in 2007 and 2008, showing different compositions of soluble carbohydrates. Mature seeds lose desiccation tolerance soon after radicle protrusion in length depending on the degree of seed deterioration lot. Immature and mature tolerant seeds of *C. echinata* support the dehydration by different ways, using starch reserves and cyclitols, seen sucrose when the seed dry. These results were compared with seeds of *Caesalpinia peltophoroides* (sibipiruna), showing different physiological parameters, probably related to the type of reserves that they accumulate.

Index terms: seed desiccation tolerance, soluble carbohydrates, cyclitols, *C. echinata*, *C. peltophoroides*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é um dos biomas com maior diversidade biológica do planeta. Abrange cerca de 15% do território nacional e está localizada em 17 estados brasileiros, estendendo-se até o Paraguai e a Argentina (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2001). É, também, um dos biomas mais devastados por atividades antrópicas, com história marcada por diversos episódios desde a colonização do País. Entre eles, figuram a exploração da madeira do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), os ciclos da cana-de-açúcar, do café e da soja, a exploração imobiliária e madeireira, entre outros (Dean, 1996). Pode ser considerada um exemplo mundial da necessidade de conservação do patrimônio genético, por já ter perdido cerca de 90% do total de sua área, restando menos de 100.000 km² (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2001).

Conservar uma espécie não significa apenas garantir sua sobrevivência, esse papel seria mínimo e poderia ser desempenhado mantendo poucos indivíduos de cada espécie em jardins botânicos, zoológicos e outros tipos de coleções de seres vivos. Essa conservação das espécies também deve implicar na manutenção de sua variabilidade genética intra-específica (Rocha, 2004).

Existem, basicamente, duas estratégias de conservação. A conservação *in situ* é aquela realizada dentro dos próprios ecossistemas e em habitats naturais conservados; objetiva manter a biodiversidade dentro do contexto do ecossistema no qual é encontrada. Já a conservação *ex situ* é a manutenção de amostras de organismos fora de seu habitat natural na forma de indivíduos inteiros, como sementes, pólen, propágulos vegetativos e culturas de células ou tecidos (Botanic Gardens Conservation International, 2001).

A metodologia convencional de conservação de sementes são os bancos de germoplasma que compreendem a secagem e armazenamento dessas sementes por períodos prolongados, frequentemente na escala de décadas. Porém, sementes de diferentes espécies e regiões podem apresentar diferentes níveis de tolerância à dessecação, além de não suportarem serem armazenadas nesses níveis por grandes períodos sem ocorrer perda de viabilidade.

Esse comportamento fisiológico diferenciado entre as sementes pode ter sido resultado do processo natural de seleção das espécies em ambientes com expressivas sazonalidades térmica ou hídrica, compreendendo tanto espécies que necessitaram produzir sementes que pudessem resistir às condições impróprias à germinação logo após a dispersão, e espécies

selecionadas em ambientes com condições adequadas para a germinação das sementes durante o ano todo (Barbedo & Marcos Filho, 1998).

Apesar do comportamento distinto entre as sementes ter sido detectado desde o início do século passado (Kidd, 1914; Castro & Krug, 1951; Zink & Rochele, 1964), apenas na década de 70 foi proposta uma classificação, incluindo-se também a capacidade e previsibilidade de seu armazenamento. Foram classificadas como ortodoxas as sementes que podem ser secas abaixo de 10% de teor de água e armazenadas em temperaturas negativas por longos períodos havendo pequena perda de viabilidade. Por outro lado sementes recalcitrantes são aquelas dispersas com teor de água elevado, perdem a viabilidade quando secas abaixo de 20-30% de umidade e não toleram temperaturas negativas, inviabilizando o armazenamento a longo prazo (Roberts, 1973). Variações nas respostas das sementes levaram à observação de um terceiro grupo, formado por sementes dispersas úmidas, mas que suportam secagem até 12% de umidade e toleram armazenamento em temperaturas baixas, porém, não negativas, sendo denominadas sementes intermediárias (Hong & Ellis, 1996).

Apesar de trabalhos sobre os mecanismos que estariam envolvidos no processo de tolerância à dessecação ainda hoje estão baseados nessas categorias de sementes (Pritchard et al., 2004; Marcos-Filho, 2005; Ellis et al., 2007), nos últimos anos vem se tornando mais evidente que esse comportamento abrange diversas características que não se limita a categorias distintas, mas dentro de um *continuum*, este formado pelo máximo de ortodoxia em um extremo e o máximo de recalcitrância no outro, em níveis diferenciados pelos diversos processos físicos e fisiológicos que as sementes podem adquirir durante sua formação, e que resultarão no quanto são sensíveis à dessecação (Walters, 2000; Berjak & Pammenter, 2004, 2008; Daws et al., 2008).

Caesalpinia echinata Lam, o pau-brasil, é nativa do Brasil e de ocorrência natural desde o Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro na floresta pluvial atlântica, e está em risco de extinção (Rocha, 2004). Suas sementes toleram ser secas até 10% de umidade, e vêm se mostrando de grande interesse para estudos desse comportamento por apresentarem características bioquímicas e fisiológicas díspares do normalmente encontrado em sementes com elevada tolerância à dessecação, pois perdem a viabilidade rapidamente mesmo quando secas, se armazenadas acima de 20°C (Barbedo et al., 2002), porém, se mantêm viáveis por mais de 2 anos se armazenadas em temperaturas negativas (Hellmann et al., 2006). Acumulam amido e sacarose como principais reservas, seguido de alguns ciclitóis, e apenas traços de rafinose e estaquiose (Borges et al., 2006; Garcia et al., 2006).

Estudos recentes relatam que é possível restabelecer a tolerância a dessecação que foi perdida durante a germinação da semente (Faria et al., 2005) ou induzir esse processo na semente imatura (Leduc, 2007) ao se impor, sobre estas, estresses hídricos. Estudos sobre a aquisição e perda do processo de tolerância à dessecação, no desenvolvimento da semente e durante sua germinação, podem fornecer informações importantes para melhor compreensão deste processo e em subsidiar metodologias para a conservação de sementes nativas em bancos de germoplasma.

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivos, analisar as modificações decorrentes da aquisição e perda de tolerância à dessecação em sementes de *Caesalpinia*, particularmente as relacionadas com variações na composição de carboidratos solúveis e de ciclitóis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.a Comportamentos das sementes após dispersão

A tolerância à dessecação de sementes é um comportamento fisiológico que pode ser considerado como resultado do processo de seleção natural em ambientes com expressivas sazonalidades térmica ou hídrica. Assim, as espécies que produzem sementes tolerantes à dessecação supostamente necessitaram de sistemas capazes de resistir a condições impróprias à germinação de suas sementes logo após a dispersão. Espécies cujas sementes são dispersas com elevados teores de água e são intolerantes à dessecação, por sua vez, podem ter sido selecionadas em ambientes com distribuição regular de suficiente quantidade de água e temperaturas adequadas para a germinação das sementes e para o estabelecimento de plântulas durante o ano todo (Barbedo & Marcos Filho, 1998).

Apesar desse comportamento diferenciado entre as sementes ter sido detectado desde o início do século passado (Kidd, 1914; Castro & Krug, 1951; Zink & Rochele, 1964), apenas na década de 70 foi proposta uma classificação dessas sementes, incluindo-se também a capacidade e previsibilidade de seu armazenamento. Dessa forma, foram denominadas sementes ortodoxas as que resistem à secagem até umidade abaixo de 10%, característica que permite armazená-las em temperaturas negativas, mantendo a viabilidade por períodos prolongados; em outro extremo foram designadas as recalcitrantes, que são dispersas ainda úmidas, não toleram secagem até cerca de 20% e conseqüentemente não suportam muito tempo de armazenamento (Roberts, 1973).

Inicialmente, o estudo do comportamento de sementes que apresentavam comportamento não ortodoxo foi baseado na umidade das sementes na época de dispersão, analisando a viabilidade dessas sementes após remoção de água dos tecidos de forma gradativa (Hong & Ellis, 1990). Com o avanço no conhecimento sobre as categorias inicialmente criadas, notou-se um terceiro grupo de sementes, caracterizadas pela dispersão com elevado teor de água, como nas recalcitrantes, mas que suportam serem desidratadas até 10-13% de umidade, ou seja, não tão intensamente até valores suportados pelas ortodoxas mas bem inferiores aos valores suportados pelas recalcitrantes; dessa forma, apresentam maior chance de sucesso no armazenamento. Essas sementes foram denominadas intermediárias (Hong & Ellis, 1996).

Apesar da categorização das sementes em três grupos distintos ser útil (Ellis et al., 2007), hoje se considera que esse comportamento engloba um *continuum*, formado pelo máximo de ortodoxia em um extremo e o máximo de recalcitrância no outro (Berjak & Pammenter, 2008; Daws et al., 2008). O conceito de *continuum* engloba a grande variabilidade que ocorre não apenas entre, mas também dentro da mesma espécie. Trabalhos

recentes indicam que o local de origem dessas sementes possui efeito significativo no desenvolvimento da semente e no grau de tolerância à dessecação que pode ser adquirida pelas espécies (Daws et al., 2004, 2006). Dessa forma, no conceito de *continuum* mesmo sementes categorizadas como ortodoxas poderiam não ser igualmente tolerantes à dessecação (Walters, 1998).

2.b Aquisição e perda de tolerância à dessecação

A aquisição da tolerância à dessecação pelas sementes tolerantes ocorre durante a formação e maturação da semente, e tem a água papel fundamental durante todo o processo (Berjak & Pammenter, 2001). O período de desenvolvimento de uma semente pode ser dividido convencionalmente em três fases. A primeira fase é a de histodiferenciação, caracterizada por expressiva divisão celular acompanhada de um aumento rápido no peso fresco e no conteúdo de água da semente.

Após este evento, segue-se a fase de expansão celular e de deposição de reservas nas células. A capacidade de tolerar a dessecação é adquirida logo após esta fase e antes do início do processo natural de secagem, e parece ser iniciado por fatores maternos, e não diretamente através de sinais ambientais (Bewley & Black, 1994), para mais tarde, estar sob controle do embrião. A dificuldade de se estudar o processo de aquisição de tolerância está em separar os fatores endógenos envolvidos por se sobreporem aos processos de maturação e desenvolvimento de dormência, quando isso ocorre (Berjak & Pammenter, 2008).

Finalmente, o desenvolvimento da maioria das sementes termina com uma fase pré-programada da secagem nas sementes tolerantes, com redução considerável do teor de água (entre 90 a 95%) e do metabolismo da semente e do embrião, passando a um estado quiescente (Black & Pritchard, 2002); nas sementes não tolerantes, o elevado teor de água é mantido, sendo metabolicamente ativas quando dispersas, podendo a semente germinar quando ainda está ligada à planta-mãe (Barbedo & Marcos Filho, 1998). Entretanto, o tipo e a intensidade do metabolismo podem diferir, dependendo da fase de desenvolvimento e o conteúdo de água no momento da dispersão.

Por outro lado, a sensibilidade a dessecação aumenta notoriamente enquanto o processo de germinação avança, mesmo nas sementes mais tolerantes à dessecação, com a fase mitótica e extensa vacuolização das células do embrião sinalizando a perda do processo de tolerância (Farrant et al., 1986; Berjak et al., 1989). Nas sementes mais sensíveis a secagem, se há algum processo ativo, ele é perdido logo que se inicia a protrusão da raiz primária, sem haver a necessidade de nova entrada de água, embora o estágio exato da perda do processo de tolerância à dessecação possa variar entre as espécies (Farrant et al., 2004).

Diferenças encontradas nas respostas das sementes sensíveis à dessecação têm levantado a hipótese dos fatores ambientais apresentarem maior participação no processo de

aquisição de tolerância à dessecação (Berjak & Pammenter, 2008). Contudo, há ainda insuficiente informação científica para corroborar essa hipótese. Em recente trabalho, Daws et al. (2004), monitorando o desenvolvimento de sementes de *A. hippocastanum* por um gradiente de latitudes, observaram que quanto maior a quantidade de graus dia acumulado pela planta, mais robusta, mais desenvolvida e menos sensível a dessecação é a semente.

Entretanto, no caso de nove espécies de *Coffea*, todas da África tropical, Dussert et al. (2000) não encontraram relação entre o tempo de desenvolvimento da semente e o nível de tolerância à dessecação adquirida, mas foram capazes de demonstrar correlação inversa entre a sensibilidade à dessecação e o número de meses secos depois da dispersão de sementes em vários habitats. Embora as diferenças na quantidade de graus dia entre as estações possam ser uma característica das zonas temperadas, elas são menos acentuadas nos trópicos e, conseqüentemente, são mais difíceis de explicar (Berjak & Pammenter, 2008).

Trabalhos recentes com sementes ortodoxas têm demonstrado que as mesmas podem readquirir a tolerância à dessecação, perdida durante a germinação, quando submetidas a estresses hídricos em soluções osmóticas (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005; Massetto et al., 2008). Mais recentemente, a tolerância à dessecação também vem sendo estudada durante a maturação das sementes, procurando induzir o embrião imaturo a tolerar a secagem (Leduc, 2007); essa indução foi obtida, por exemplo, incubando-se as sementes imaturas de *C. echinata* em soluções de polietilenoglicol (PEG) em potencial hídrico ligeiramente inferior ao do embrião.

Estresses hídricos, portanto, podem ser importantes ferramentas para estimular processos que levem à tolerância à dessecação, dentre os quais pode estar a ativação de genes. A ativação de diversos genes por estresse hídrico é reportada na literatura (Le & McQueen-Mason, 2006), mas pouco se sabe sobre a ativação de genes ligados à tolerância à dessecação. Em sementes intolerantes à dessecação esse conhecimento assume importância ainda maior, visto que não se sabe a fonte dessa intolerância: a ausência dos genes ou sua não-atividade. Alguns resultados promissores, nesse sentido, foram obtidos por Bonjovani & Barbedo (2008), verificando que estresses hídricos diminuíram a sensibilidade ao frio dos embriões de *I. vera*, altamente intolerantes à dessecação (Bilia et al., 1999). Apesar desse ganho de tolerância não ter resultado em aumento do potencial de armazenamento, esses resultados indicam a possibilidade de ampliação desse processo nesses embriões.

2.c Carboidratos, ABA e aquaporinas e a tolerância à dessecação em sementes

Processos e mecanismos de proteção vêm sendo identificados sobre diversos aspectos, e juntos promovem a tolerância à dessecação das sementes, embora o modo como operam e sua interação ainda não estejam muito bem compreendidos (Berjak et al., 2007). Entre outros mecanismos que podem estar envolvidos no processo de tolerância à dessecação, o

acúmulo de carboidratos não estruturais no período de maturação foi bastante investigado e parece invariável que a sacarose e certos oligossacarídeos da série da rafinose (ROS), como a rafinose e estaquiose são acumulados durante a maturação, na fase de secagem, de sementes tolerantes a dessecação (Steadman et al., 1996; Obendorf, 1997; Black et al., 1999; Hoekstra et al., 2001; Buitink et al., 2003; Leduc, 2007). Além disso, a alta concentração de sacarose é também comum nos tecidos secos das plantas revivescentes (Berjak et al., 2007). Outros açúcares como os ciclitóis livres e galactosil ciclitóis também se acumulam em algumas sementes e parecem contribuir na tolerância à dessecação de maneira semelhante aos ROS (Obendorf, 1997; Peterbauer & Richter, 2001), quando estes não estão evidenciados (Horbowicz et al., 1998; Steadman et al., 2000; Borges et al., 2006).

O papel da sacarose no estado seco em tecidos da semente já foi bastante discutido (Berjak et al., 2007), esse dissacarídeo teria um papel dinâmico de impedir a aproximação das membranas umas às outras, substituindo fisicamente a água quando esta é removida na secagem e, dessa forma, prevenindo sua proximidade lateral (Hoekstra et al., 2001). Esta proximidade promoveria mudanças nos fosfolípidos e em alguns componentes da membrana que são acompanhadas pela exclusão de proteínas integrais (Bryant et al., 2001; Koster & Bryant, 2005; Halperin & Koster, 2006).

Contudo, a partir de um amplo levantamento sobre o acúmulo de sacarose em sementes ortodoxas e não ortodoxas, se encontrou uma variedade de sementes sensíveis à dessecação que acumulam grandes quantidades de sacarose e alguns oligossacarídeos (Steadman et al., 1996). No entanto, a sacarose não tem como desempenhar parte da proteção contra danos de secagem como nas sementes tolerantes à dessecação, já que as sementes recalcitrantes teriam perdido a viabilidade anteriormente, em umidades ainda elevadas, sem que se tenham iniciado os benefícios provenientes da contribuição da sacarose ao estado vítreo, ou em neutralizar o contato lateral entre as membranas. É provável que, nessas sementes, a hidrólise da sacarose proporcione um substrato prontamente disponível para o processo respiratório necessário para sustentar o desenvolvimento em curso que aumenta durante a germinação (Berjak & Pammenter, 2008). Outra visão seria a da ação benéfica dos carboidratos solúveis estar associada, ainda, a um sistema antioxidante bastante eficiente (Walters et al., 2002).

O ácido abscísico (ABA) pode também estar envolvido na aquisição da tolerância à dessecação (Chandler & Robertson, 1994; Bradford & Chandler, 1992; Han et al., 1997; Vicré et al., 2004; Le & McQueen-Mason, 2006). Durante a formação da semente o ABA tem papel crucial sobre eventos tais como a deposição das reservas de armazenamento, inibição da germinação precoce, a indução de dormência primária em algumas sementes e a aquisição de tolerância à dessecação (Bewley & Black, 1994; Kermode, 2005).

As concentrações de ABA são baixas durante os estágios iniciais do desenvolvimento das sementes, aumentando de maneira acentuada e geralmente concomitante ao máximo peso fresco, tendo seus níveis reduzidos à medida que se inicia a etapa de secagem da maturação (Kermode, 2005). Essa redução também poderia sinalizar a diminuição da sensibilidade da semente ao seu efeito (Ackerson, 1984 a,b). Ou ainda, esses picos de ABA durante a maturação poderiam estar relacionados com a aquisição da tolerância, preparando a semente para a etapa de secagem (Tetteroo et al., 1994).

Na maturação de sementes de *Fagus sylvatica* L. (tolerantes à dessecação) coletadas em três diferentes anos, foram observados picos de ABA sempre uma semana antes da aquisição de tolerância à dessecação pela semente imatura, em umidades ainda elevadas (60 %), mas com a etapa de dessecação já iniciada. Apesar da relação aparente entre a secagem e o aumento dos níveis de ABA, esses picos seriam apenas uma constante do desenvolvimento sem relação direta com a aquisição de tolerância à dessecação (Kalemba et al., 2009).

Apesar da relação do ABA com a tolerância à dessecação não ter sido, ainda, confirmada (Xu et al., 1990; Tarquis & Bradford, 1992; Bochicchio et al., 1994), evidências de sua ação impedindo a germinação ou influenciando o conteúdo de carboidratos solúveis e a regulação de transcrição do gene *lea* (Bray, 1993; Tetteroo et al., 1994) ainda o colocam como fator ligado à aquisição da tolerância à dessecação.

Algumas classes de proteínas específicas estão fortemente relacionadas com o processo de tolerância à dessecação em sementes, como por exemplo, as Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEAs), Heat Shock Proteins (HSPs), entre outras (Barbedo & Marcos-Filho, 1998). Juntamente com a sacarose, as LEAs têm sido o foco de atenção recente no contexto da aquisição e retenção de tolerância à dessecação nas sementes (Buitink et al., 2002; Kermode & Finch-Savage, 2002; Berjak, 2006; Berjak et al., 2007).

O aparecimento de LEAs ocorre durante a maturação das sementes tolerantes à dessecação e está relacionado com uma variedade de estresses em células vegetais que causam déficit hídrico (Cuming, 1999). Tem sido sugerido que, devido à característica de atrair água, alguns grupos de LEAs poderiam formar uma concha protetora de hidratação em torno das estruturas intracelulares e de macromoléculas, enquanto outros grupos teriam a capacidade de seqüestrar íons durante a desidratação e no estado seco (Berjak & Pammenter, 2008). Uma característica adicional ligando LEAs ao fenômeno da tolerância à dessecação é que surgem de forma concomitante com o ácido abscísico, regulador de transcrição do gene *Lea*, como já discutido (Bray, 1993).

As aquaporinas constituem outro grupo de proteínas, cuja participação no processo de tolerância à dessecação de sementes ainda não foi elucidada. Estas proteínas constituem

canais que facilitam o transporte de água através das membranas. São proteínas bastante conservadas entre as espécies, sendo descritas em diversos grupos de procariotos e eucariotos (Park & Saier, 1996; Kozono et al., 2003).

As aquaporinas são classificadas segundo sua seqüência e localização (Kaldenhoff & Fischer, 2006). Nas plantas superiores encontramos as proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs), proteínas do tipo nodulina 26 (NIPs), proteínas intrínsecas básicas (SIPs) (Johanson & Gustavsson, 2002) e as proteínas intrínsecas de membrana plásmática (PIPs) (Kaldenhoff & Fischer, 2006). As TIPs contribuem nos fluxos de água e de pequenos solutos que atravessam a membrana dos vacúolos, tendo papel na regulação de turgor celular, além de atuar no equilíbrio das concentrações de uréia entre compartimentos celulares diferentes. As PIPs representam a subfamília com o maior número de membros (13 em *Arabidopsis* e milho) e a maioria está localizada na membrana plasmática (Kaldenhoff & Fischer, 2006).

Em geral, as aquaporinas formam canais seletivos que podem favorecer também o transporte de substâncias como glicerol, CO₂ e uréia (Gaspar et al., 2003; Uehlein et al., 2003). Sua expressão é regulada principalmente durante a expansão celular, em situação de estresse hídrico e salino e pelo aumento nos níveis de ABA (Luu & Maurel, 2005).

Poucos trabalhos sobre as aquaporinas durante o desenvolvimento de sementes são encontrados na literatura, tendo as pesquisas como principal alvo os processos de embebição e germinação (Willigen et al., 2006). Considerando-se que a tolerância à dessecação, naturalmente ou artificialmente adquirida, envolve fluxos de água pela semente (Faria et al., 2005; Leduc, 2007), o estudo de expressão de aquaporinas é necessário para complementar as evidências do modo de operação desse mecanismo.

2.d Espécies modelos de estudo

Caesalpinia echinata Lam., o conhecido pau-brasil que deu nome ao nosso País, ou ibirapitanga (madeira vermelha) na linguagem tupi-guarani, é pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, e apresenta distribuição natural restrita à floresta pluvial tropical atlântica e está ameaçada de extinção (Rocha, 2004). Apresenta sementes planas e irregularmente orbiculares, com 1 a 1,5 cm de diâmetro (Cunha & Lima, 1992), presentes 1 ou 2 sementes por fruto (Lewis, 1998), com coloração verde clara no início do desenvolvimento até uma coloração parda, quando maduras (Borges et al., 2005).

Essas sementes toleram secagem até atingirem níveis abaixo de 8% de água (Barbedo et al., 2002) e vêm se mostrando de grande interesse para estudos de tolerância à dessecação, acumulando amido como principal polissacarídeo de reserva, seguido de alguns ciclitóis como o pinitol e ciceritol (Borges et al., 2006; Garcia et al., 2006), com apenas traços de rafinose e estaquiose (Borges et al., 2006; Garcia et al., 2006). Perdem a viabilidade rapidamente, mesmo quando secas, se armazenadas em temperaturas acima de 20°C

(Barbedo et al., 2002), mas mantêm a viabilidade por mais de 2 anos se armazenadas em temperaturas negativas (Hellmann et al., 2006). Embora o pau-brasil tenha sido pouco estudado quanto à sua capacidade de recuperar a tolerância à dessecação após o início da germinação, foi possível induzir essa tolerância em sementes imaturas (Leduc, 2007).

Caesalpinia peltophoroides Benth (sibipiruna), é também pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, com distribuição principalmente na região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro, sul da Bahia e no Pantanal Mato-Grossense (Lorenzi, 1992), porém, devido a sua grande utilização na ornamentação urbana, é facilmente encontrada em São Paulo. Árvore de grande porte que apresenta potencial madeireiro, sendo utilizada na construção civil e na produção de móveis, e pode ser utilizada em planos de recuperação de áreas degradadas (Santana & Santos, 1999).

Das poucas informações encontradas sobre essas sementes, a semente madura de sibipiruna apresenta cerca de 50% de lipídios, 32% de carboidratos solúveis, 7,7% de amido e 6,8% de proteínas solúveis (Corte et al., 2006), podem ser armazenadas por até 360 dias em câmara fria, porém em ambiente natural, perdem sua capacidade germinativa em 240 dias de armazenamento (Figliolia et al., 2001). São visualmente parecidas com as sementes de pau-brasil, com o mesmo tom amarronzado nas sementes maduras, porém maiores em comprimento e largura. As sementes imaturas apresentam tegumento fino e transparente, com cotilédones verdes e eixo embrionário bem definido.

3. CAPÍTULO 1

DETERMINAÇÃO DA FASE TOLERANTE E INTOLERANTE À DESSECAÇÃO EM SEMENTES MADURAS DE *Caesalpinia echinata* Lam. (PAU-BRASIL)

JOÃO PAULO NALDI SILVA, MARÍLIA GASPAR, CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

RESUMO – A tolerância à dessecação em sementes maduras ortodoxas é perdida com o avanço do processo de germinação, possibilitando diferentes comportamentos fisiológicos para estudo dentro de uma mesma espécie. Objetivou-se determinar a manutenção do processo de tolerância à dessecação em sementes maduras germinantes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), e o momento de sua perda. Foi determinado o tempo de secagem das sementes até 10% de teor de água utilizando soluções de K_2CO_3 e o tempo de equilíbrio em solução osmótica de PEG a -3 MPa. Foram agrupadas sementes germinantes de mesmo comprimento de raiz primária e posteriormente secas até 10% de teor de água. Os resultados permitiram estabelecer a secagem utilizando K_2CO_3 em 3 dias, e incubação em PEG por 24 horas. Sementes maduras germinantes de pau-brasil perdem a tolerância à dessecação após a protrusão da raiz primária e parece ser influenciada pelo grau de deterioração do lote, determinando sementes com 3 e 5 mm de raiz primária como grupos a serem estudados. Tais resultados permitiram identificar comportamentos fisiológicos diferentes nas sementes maduras, fornecendo metodologias essenciais para o estudo de tolerância à dessecação.

Termos para indexação: à dessecação, germinação, secagem, osmoregulação, sementes

DETERMINATION OF TOLERANT AND INTOLERANT PHASES IN MATURE SEEDS OF *CAESALPINIA ECHINATA* LAM. (BRAZIL-WOOD)

ABSTRACT – The desiccation tolerance in mature orthodox seeds is lost with the beginning of the germination process, enabling different physiological parameters to compare into the same species. The objective of this work was to determine the maintenance of the process of desiccation tolerance in germinating mature seeds of *Caesalpinia echinata* (brazil wood), and your loss. It was determined the time of seed drying at 10% water content using K_2CO_3 solutions and the time of equilibrium using PEG at -3 MPa. Germinating seeds were grouped in the same length of primary root and then dried to 10% water content. The results allowed establishing the drying using K_2CO_3 in 3 days, and incubation in PEG for 24 hours. Germinating mature seeds of *C. echinata* lose desiccation tolerance after radicle protrusion and appear to be influenced by the level of seed lot deterioration, setting seed with 3 to 5 mm of primary root as groups to be studied. These results allowed determining various physiological parameters in mature seeds, providing essential methodologies for the study of desiccation tolerance.

Index terms: tolerance, germination, drying, osmoregulation, seeds

INTRODUÇÃO

A aquisição da tolerância à dessecação pelo embrião, nas sementes ortodoxas, ocorre durante a formação e maturação da semente (Berjak & Pammenter, 2001), logo após a fase de expansão celular e de deposição de reservas nas células e antes do início do processo natural de secagem (Bewley & Black, 1994), que após iniciado, leva a redução acentuada do teor de água e do metabolismo da semente e do embrião, observando na semente madura um estado quiescente (Black & Pritchard, 2002).

Por outro lado, a sensibilidade a dessecação aumenta notoriamente enquanto o processo de germinação avança, mesmo em sementes ortodoxas. Nestas sementes, o processo de hidratação segue um padrão trifásico conforme descrito por Bewley & Black (1994), no qual a primeira fase é caracterizada pelo aumento rápido do teor de água da semente devido aos altos potenciais matriciais dos tecidos. Após essa fase, a absorção de água é lenta e se inicia o restabelecimento dos processos metabólicos do embrião.

Até esta fase, a manutenção da tolerância à dessecação é mantida (De Castro et al., 2004b), porém, com a retomada do crescimento embrionário evidenciada pela protrusão da raiz primária, esse processo é perdido (Buitink et al., 2003; Oliveira, 2009), embora o estágio exato da perda da tolerância à dessecação nas sementes ortodoxas possa variar entre as espécies (Farrant et al., 2004). Nas sementes recalcitrantes se há algum processo ativo, ele é perdido logo que se inicia a protrusão da raiz primária.

Os estudos de tolerância à dessecação de sementes geralmente envolvem dois tipos de secagem: secagem rápida que objetiva redução considerável do teor de água de um lote em um período curto e em níveis pré-determinados, a fim de estabelecer umidades críticas que o lote é capaz de suportar; e secagem lenta, que promove perda de água pela semente de maneira lenta e controlada, geralmente associada a potenciais hídricos específicos que se quer manter o embrião.

Na secagem rápida são normalmente utilizadas estufas de secagem com circulação forçada de ar, e mais recentemente soluções salinas concentradas que são capazes de entrar em equilíbrio com a atmosfera circundante, criando ambiente com baixa umidade relativa (Medeiros, 2006). A retirada de água das sementes é promovida em ambos os métodos por dois processos simultâneos: a perda de água da superfície da semente para o ar circundante, que ocorre quando a pressão parcial de vapor na superfície da semente é maior do que a no ar circundante; e o movimento de água do interior para as camadas superficiais da semente, em virtude do gradiente de potencial hídrico entre as duas regiões (Vilela & Silva, 1992).

Na secagem lenta podem ser utilizadas soluções osmóticas como soluções de polietilenoglicol (PEG), manitol, sacarose e sais inorgânicos como NaCl e MgSO₄ (Vasquez, 1995; Leduc, 2007). O PEG é um agente osmótico macromolecular, quimicamente inerte, não degradável, atóxico para as sementes por não penetrar nos tecidos devido ao elevado peso molecular e não ser incorporado (Villega et al., 1991). Por ser capaz de estabelecer gradientes osmóticos entre a solução e a semente, esse composto tem sido utilizado com sucesso para simular os efeitos do déficit hídrico em plantas (Hasegawa et al., 1984), e também utilizado para promover *priming* em sementes germinantes (Bittencourt et al., 2004). Porém, para se ter uma adequada utilização da solução osmótica para a desidratação controlada, é importante ter conhecimento do potencial hídrico das sementes no momento da incubação do lote.

Sementes maduras de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) toleram secagem até atingirem níveis abaixo de 8% de água (Barbedo et al., 2002) e vêm se mostrando de grande interesse para estudos de tolerância à dessecação. Perdem a viabilidade rapidamente, mesmo quando secas, se armazenadas em temperaturas acima de 20°C (Barbedo et al., 2002), mas mantêm a viabilidade por mais de 2 anos se armazenadas em temperaturas negativas (Hellmann et al., 2006). Embora tenha metodologias para estudo da tolerância à dessecação em sementes imaturas (Leduc, 2007), o pau-brasil foi pouco estudado quanto a métodos de secagem e hidratação durante a germinação (Lamarca et al., 2009).

Dessa maneira, para compreender as mudanças físicas e fisiológicas que ocorrem na semente após hidratação, este trabalho objetivou identificar os momentos do processo da embebição e/ou da germinação nos quais a semente madura germinante ainda é tolerante à dessecação e quando esta é completamente perdida, utilizando sementes maduras de *C. echinata* como modelo de estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Flores de *Caesalpinia echinata* foram marcadas, na base de inflorescências que tivessem pelo menos três flores abertas, de 15 matrizes localizadas em bosques já estabelecidos da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, no município de Mogi-Guaçu, São Paulo.

A coleta de sementes foi realizada em 2007, aos 60 dias após a antese (DAA), caracterizando o estágio da semente madura (Borges et al., 2005), com auxílio de sombrite.

Para verificar possíveis alterações no comportamento de tolerância à dessecação nas sementes com diferentes características, o material vegetal foi levado para o Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica e separado em quatro grupos da seguinte forma: sementes intactas com coloração típica da espécie, sementes intactas de cor parda (maduras de elevada qualidade fisiológica), segundo Borges (2007), sementes intactas de cor esverdeada (de boa qualidade fisiológica, porém imaturas) segundo Borges (2007) e sementes hidratadas e secas no próprio ambiente (sementes de baixa qualidade fisiológica). Os grupos formados foram caracterizados quando a teor de água, matéria seca, potencial hídrico, germinação e armazenados em envelopes de papel Kraft a -18°C .

Testes de Germinação

Os testes de germinação e as análises da produção de plântulas normais foram realizados em germinadores Marconi tipo MA400 com circulação interna de água, a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas e 100% UR (Mello & Barbedo, 2007). As sementes foram colocadas em rolo de papel para germinação (Germitest), umedecidos previamente com água de torneira (Brasil, 2009), em quatro repetições de 20 sementes cada (excepcionalmente 10 sementes quando não havia material suficiente). Foram feitas leituras diárias, registrando-se as sementes germinadas (protrusão da raiz primária de, no mínimo, 2 cm) e o desenvolvimento de plântulas normais (Barbedo et al., 2002). Foi calculado o Índice de Velocidade de Germinação (IVG), através da adaptação da fórmula de Índice de Velocidade de Emergência (Maguire, 1962).

Nos experimentos envolvendo comprimentos de raiz primária, além do índice de germinação (G) e plântulas normais (PN) da testemunha, foi determinada a taxa de sobrevivência das sementes após serem secas (Tx), sendo considerada sobrevivente a semente com raiz primária protruída e que após secagem e nova hidratação, manteve seu desenvolvimento. O valor da taxa de sobrevivência se refere apenas as sementes que germinaram, e por isso pode alcançar valores maiores que o índice de germinação da testemunha.

Determinação do teor de água, matéria seca e potencial hídrico das sementes

O teor de água (expresso em porcentagem, com base na massa úmida) e o conteúdo de matéria seca das sementes (mg.semente^{-1}) foram determinados gravimetricamente pelo método de estufa a $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 17 horas (Brasil, 2009). O potencial hídrico das sementes foi obtido através de psicrômetro, modelo WP4 Dewpoint Potentiometer, da Decagon (USA), baseando-se no ponto de orvalho, utilizando três repetições de 5 sementes cada. A aferição da relação entre potencial hídrico medido e potencial hídrico de equilíbrio

foi realizada por meio de isotermas de sorção de água, em soluções de potencial osmótico conhecido, com polietileno glicol (PEG), segundo Michel & Kauffmann (1973) bem como por meio de equilíbrio em atmosfera com umidade relativa controlada e pré-estabelecida, utilizando-se sais específicos (Medeiros, 2006).

Secagem das sementes

As sementes foram submetidas a dois tipos de secagem:

i) com solução osmótica com polietilenoglicol (PEG 6000), em gerbox recobertas por uma camada de papel de germinação, durante 24 horas, acondicionados em geladeira a 8°C.

ii) com atmosfera controlada, em caixas plásticas (75 cm de comprimento x 60 cm de largura x 40 cm de altura) contendo solução saturada de K_2CO_3 com umidade relativa de 43% a 20°C, sem haver contato das sementes com a solução salina. Esta secagem diferencia-se por ser rápida e faz com que as sementes atinjam cerca de 10% de umidade, que a caracteriza como tolerante a dessecação (Faria et al., 2005; Alpert, 2005). Após incubação do material, o ambiente interno da caixa deve entrar em equilíbrio em menos de 24 horas, com as sementes armazenadas por um período total de 3 dias, para garantir a secagem e manutenção no estado seco.

Determinação das fases de tolerância e intolerância à dessecação das sementes germinantes

Para determinar a perda de tolerância à dessecação pela semente germinante, sementes de *C. echinata* foram colocadas para germinar em períodos progressivos de embebição:

- Experimento 1 (8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 48 horas);

Com o mesmo propósito, foram medidas as raízes primárias dessas sementes formando os seguintes grupos:

- Experimento 2 (0; 1; 2 a 5; 6 a 7; e 9 a 11 milímetros) após 4 meses de armazenamento;
- Experimento 3 (0; 5; 10 e 15 milímetros), após 15 meses de armazenamento;
- Experimento 4 (0; 3; 4 e 5 milímetros), após 17 meses de armazenamento.

Após atingir cada tempo de embebição e/ou obter os comprimentos de raiz primária desejados, os lotes de sementes foram secos conforme descrito anteriormente.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 9 tempos de embebição compondo os tratamentos do Experimento 1, 4 comprimentos de raiz primária compondo os tratamentos do Experimento 2, ou 3 comprimentos de raiz primária compondo os tratamentos dos Experimentos 3 e 4.

RESULTADOS

Caracterização do lote

As sementes das diferentes categorias foram separadas através de características visuais do tegumento e morfofisiológicas apresentadas abaixo (Tabela 1 e Figura 1). Os resultados mostraram que as sementes de todas as categorias apresentaram valores de umidade e potencial hídrico semelhantes, com pouca variação na matéria seca (Tabela 1). Com relação à germinação, não se verificou diferença, contudo, a produção de plântulas normais e o índice de velocidade de germinação foram mais elevados para as sementes intactas quando comparadas às demais. Apesar de valores de germinação e de plântulas normais próximos ao lote de sementes intactas e superiores aos demais, as sementes esverdeadas apresentaram um IVG inferior. As sementes pardas intactas e as hidratadas e secas apresentaram em todos os parâmetros avaliados, valores semelhantes entre si e inferiores ao demais (Figura 1).

TABELA 1. Teor de água, Potencial hídrico e Matéria Seca de sementes maduras (60 DAA) de *C. echinata*, beneficiadas e agrupadas primeiramente quanto a aspectos visuais do tegumento da semente (Intacta, Esverdeada Intacta, Parda Intacta, Hidratada e seca), lote 2007.

Categorias	Teor de água (% bu)	Potencial hídrico (-MPa)	Matéria seca (g.semente ⁻¹)
Intacta	13,0	-55,8	0,293
Esverdeada Intacta	12,7	-59,4	0,258
Parda Intacta	12,4	-69,5	0,262
Hidratada e seca	12,4	-65,1	0,304

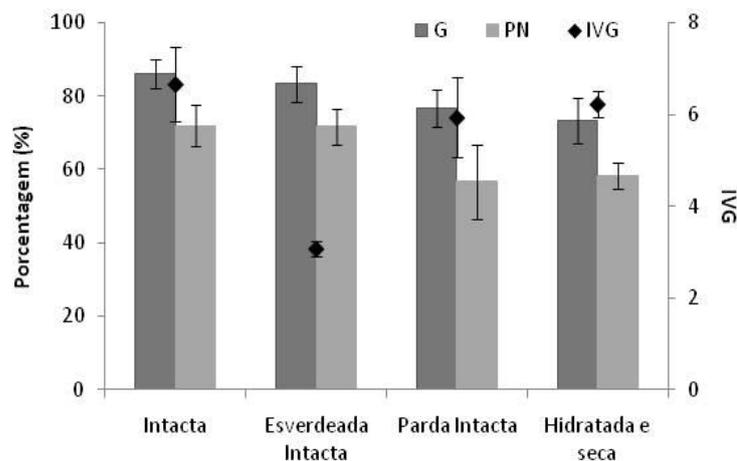


FIGURA 1. Germinação (G), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Plântulas Normais (PN) de sementes maduras (60 DAA) de *C. echinata*, beneficiadas e agrupadas primeiramente quanto à aspectos visuais do tegumento da semente (Intacta, Esverdeada Intacta, Parda Intacta, Hidratada e seca), lote 2007.

As sementes esverdeadas intactas foram as escolhidas para os estudos iniciais de diagnose das fases de tolerância e intolerância à dessecação, dessa forma, foram realizados diversos testes para otimização dos experimentos e apresentados a seguir.

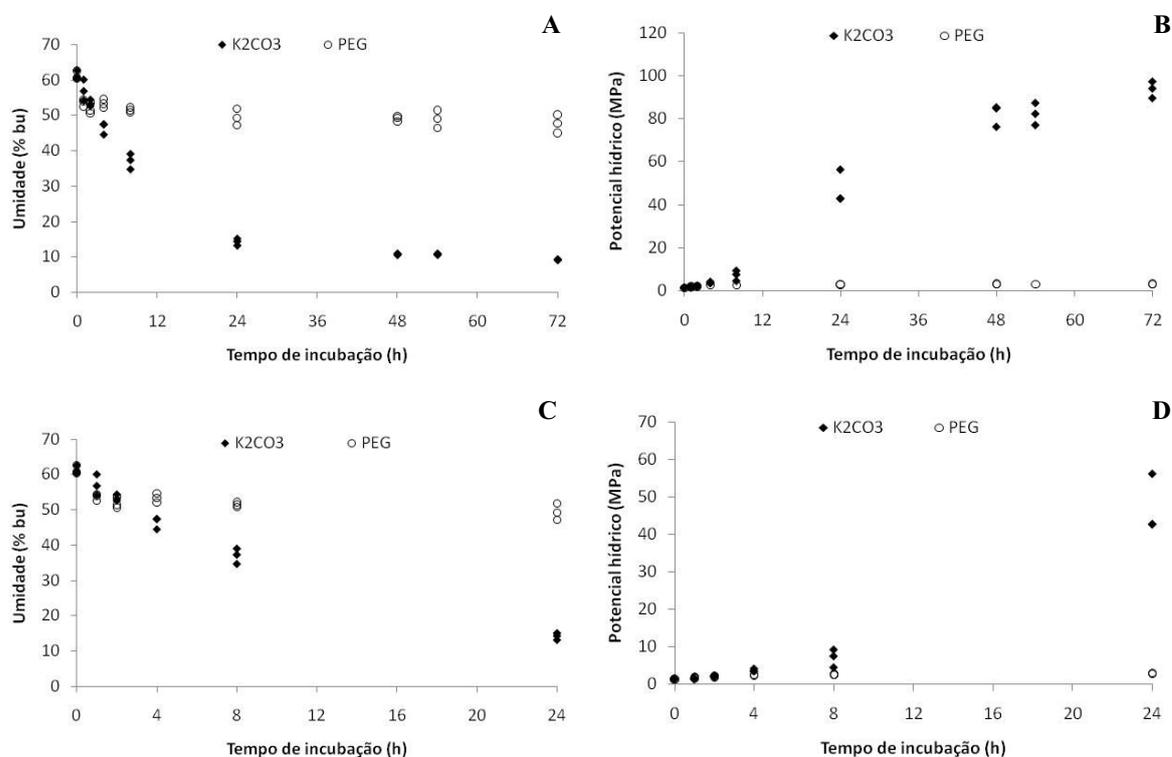


FIGURA 2. Secagem de sementes maduras (60 DAA) de *C. echinata* por períodos progressivos (A e B – 72 horas; C e D – 24 horas), após secagem em atmosfera com UR de 42% contendo solução de K₂CO₃; e após incubação em PEG a -3 MPa. A e C, Umidade (% em base úmida). B e D, Potencial Hídrico (-MPa). As sementes foram previamente embebidas por 16 horas (Umidade de 61,2%).

A Figura 2 mostra os resultados da incubação das sementes maduras previamente embebidas, em atmosfera com umidade relativa controlada de 42% e em incubação em solução de PEG a -3 MPa. Nota-se que a perda de umidade das sementes em atmosfera controlada foi rápida, com valores abaixo de 20% alcançados nas primeiras 24 horas de incubação. O mesmo efeito é observado no potencial hídrico das sementes que em 24 horas obtêm valores próximos a -50 MPa, e ao final de 72 horas de incubação atingem potencias de cerca de -100MPa. Já na incubação em PEG a redução de umidade foi lenta, não perdendo mais do que 10% em 72 horas de incubação, com estabilização do potencial hídrico das sementes depois de 8 horas de incubação.

Após otimização das soluções de incubação seguiram-se estudos para determinar o estágio de perda de tolerância à dessecação da semente madura de pau-brasil, inicialmente utilizando períodos de até 480 minutos de embebição (dados não apresentados), indicando

que a tolerância à dessecação dessas sementes é mantida até o final deste período, com todos os tempos de embebição apresentando valores de germinação e de plântulas normais mais baixos que os da testemunha, porém, não nulos.

Conseqüentemente um novo experimento foi instalado, em tempos de embebição de 8 a 48 horas (Figuras 3 e 4), com sementes do lote Esverdeada Intacta que estavam armazenadas por 6 meses, a temperaturas negativas, conforme Hellman et al. (2006).

Experimento 1

Na Figura 3 é possível notar que o teor de água da semente se estabiliza em valores próximos a 60%, alcançada após 16 horas de embebição, o mesmo ocorrendo com os valores de potencial hídrico (entre -0,5 e -1 MPa, após 16 horas de embebição). Neste experimento os índices de germinação, de IVG e de plântulas normais foram reduzindo se comparados progressivamente os tempos de embebição, com os tratamentos de 40 e 48 horas de embebição apresentando valores de germinação muito baixos (6 e 3% em média, respectivamente). Enquanto que os valores de teor de água e potencial hídrico se mantiveram em média, próximos a 60% e -1 MPa respectivamente, enquanto úmidas, e médias de 10% e -100 MPa respectivamente, após secas, com exceção dos períodos de 40 e 48 horas de embebição que apresentaram potenciais mais baixos, entre -80 e -85 MPa e teores de água por volta de 11% (Figura 3).

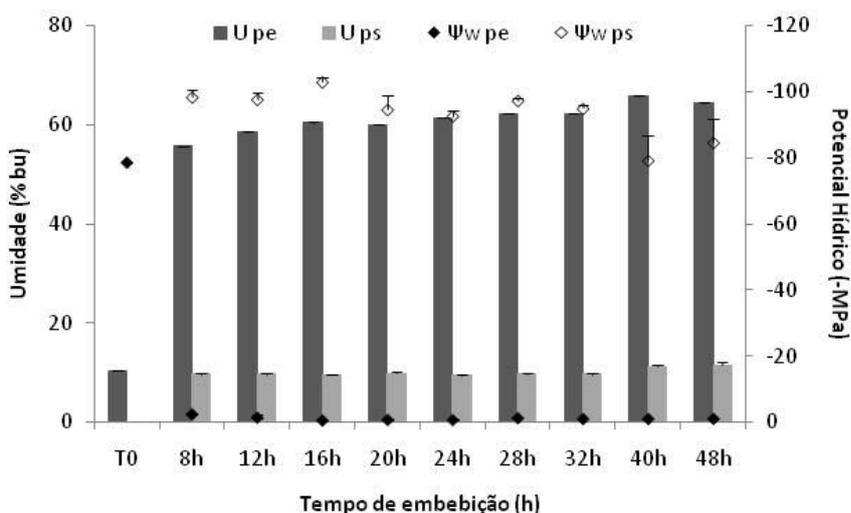


FIGURA 3. Teor de água e potencial hídrico de sementes maduras (60 DAA) de *C. echinata*, após períodos progressivos em embebição (8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 40 e 48 horas), com posterior secagem em atmosfera controlada, por 3 dias. Após embebição, teor de água (U_{pe}) e potencial hídrico (Ψ_{w pe}). Após secagem teor de água (U_{ps}) e potencial hídrico (Ψ_{w ps}).

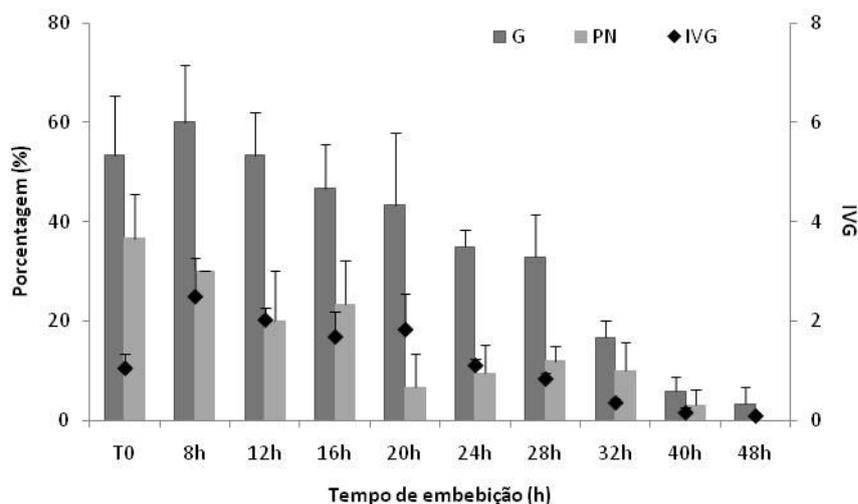


FIGURA 4. Germinação, Índice de Velocidade de Germinação e Plântulas Normais de sementes maduras (60 DAA) de *C. echinata*, após períodos progressivos em embebição (0, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 40 e 48 horas), com posterior secagem em atmosfera controlada, por 3 dias.

Também puderam ser observadas sementes com raiz primária protrusão e sementes ainda sem ocorrer protrusão da raiz nos mesmos períodos de embebição, indicando que esse parâmetro (tempo de embebição) pode não ser o melhor a ser utilizado para se procurar ponto de perda de tolerância à dessecação, além de aumentar a variação entre os tratamentos. Dessa maneira, novo experimento foi realizado, dessa vez empregando-se não o tempo de embebição, mas o avanço do crescimento da raiz primária como parâmetro para determinar o estágio de perda de tolerância à dessecação dessas sementes, procurando tornar o lote de sementes embebidas mais uniforme.

Experimento 2

A dificuldade desse método estava na obtenção de sementes com o mesmo comprimento de radícula, já que um número muito maior de sementes é necessário para se obter o número mínimo de repetições, além da variabilidade natural do objeto de estudo. Devido a essas questões, foram agrupados alguns comprimentos de raiz primária obtidos (2 a 5, 6 a 7 e 9 a 11 milímetros) e se priorizou as análises de germinação (Figura 5) em detrimento do teor de água, potencial hídrico e de matéria seca das sementes.

O padrão de embebição é semelhante ao quando se utilizava tempos de embebição das sementes, com o grupo de 1 mm de raiz primária apresentando 60% de teor de água e - 1,5 MPa em média. Também pode ser observada queda nos valores da taxa de sobrevivência enquanto a raiz primária cresce, porém, com continuação do processo de germinação mesmo após sementes com raiz primária de 9 a 11 mm serem secas e novamente hidratadas (Figura

5). Pode ser observado também, a redução no índice de plântulas normais, com valores iguais a zero já com 1 mm de comprimento de raiz primária. Nestes tratamentos, pode ser observada grande infestação das sementes por fungos.

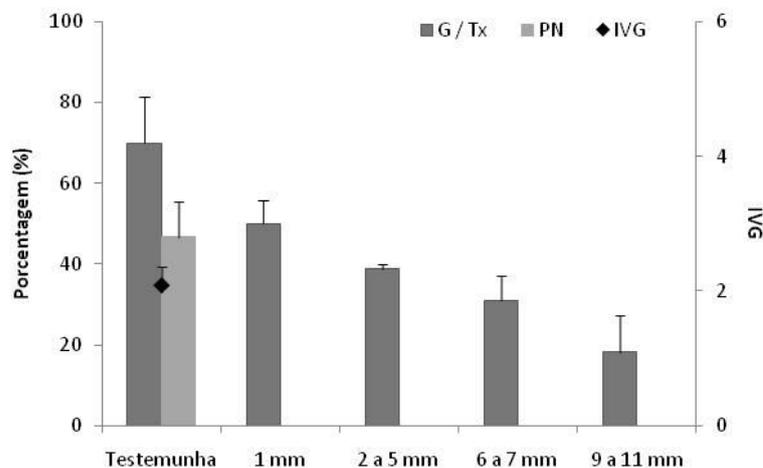


FIGURA 5. Germinação (G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Plântulas Normais e Taxa de sobrevivência (Tx) de sementes maduras (60 DAA) de *C. echinata*, após embebição e comprimento de raiz primária de 1, 2 a 5, 6 a 7, 9 a 11 milímetros, com posterior secagem em atmosfera controlada, por 3 dias. Germinação se refere apenas a testemunha.

Visando a otimizar e uniformizar os materiais coletados, em quantidade suficiente para se prosseguirem as análises, optou-se por agrupar todos os lotes de sementes maduras de 2007, já armazenados por 17 meses, realizando nova caracterização inicial dos parâmetros físicos e fisiológicos, mostrados na Tabela 2.

TABELA 2. Caracterização dos parâmetros físicos e fisiológicos de sementes maduras (60 DAA) de *C. echinata*, armazenadas por 17 meses.

Teor de água (% bu)	Potencial hídrico (-MPa)	Matéria seca (g.semente ⁻¹)	Germinação (%)	IVG	Plântulas Normais (%)
10,7	-68,2	0,234	48	3,4	26

Os resultados deste novo lote indicam pequeno acréscimo da umidade dessas sementes, além disso, a germinação e o índice de plântulas normais desse lote é menor do que qualquer outro lote analisado anteriormente (Tabelas 1 e 2).

Para maior eficácia na obtenção de sementes com comprimentos de raiz primária específicos, foi instalado teste de germinação analisando apenas o comprimento das raízes primárias após tempos de embebição progressivos (Bloco 1: 16 a 26h; 2: 28 a 38 horas, 3: 40 a 50h - Tabela 3).

TABELA 3. Comprimento da raiz primária de sementes maduras (60 DAA) de *C. echinata*, após períodos progressivos de embebição (16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 e 50 horas), com a quantidade de sementes expressa em %.

Embebição	Quantidade de sementes (%) x Comprimento de raiz primária (mm)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
16h	1	1																		
18h	3	2																		
20h	3	3	1																	
22h	4	5	1	1																
24h	7	4	2	1																
26h	4	6	3	1	1	1														
28h	1	4	1	2																
30h	2	5	2	2	1	1														
32h	1	5	2	2	1	2	1													
34h	1	3	3	2	2	1	2													
36h	2	4	3	2	1	2	1	1				1								
38h	2	4	2	4	2	2	2		1	1					1					
40h	1	1	1	1	1	1	1		1	1										
42h	3	1	1	1	1	1	1		1			1								
44h	3	2	1	1	1	1	1	1				1	1							
46h	6	2	1	1	1	1	1	1				1			1					
48h	8	2	1	1	1	1	1	1	1	1					1	1				
50h	5	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1							1	1	1

Experimento 3

Na figura 6, estão os resultados obtidos ao secar sementes com comprimento de raiz primária de 5, 10 e 15 mm até 10% de teor de água (dados não apresentados). Diferente do encontrado quando se utilizou apenas as sementes esverdeadas intactas (Figura 5), as sementes com raiz de 10 mm de comprimento não resistiram a secagem, e até mesmo com raízes de 5 mm apresentaram níveis mínimos de sobrevivência e zero de plântulas normais (Figura 6).

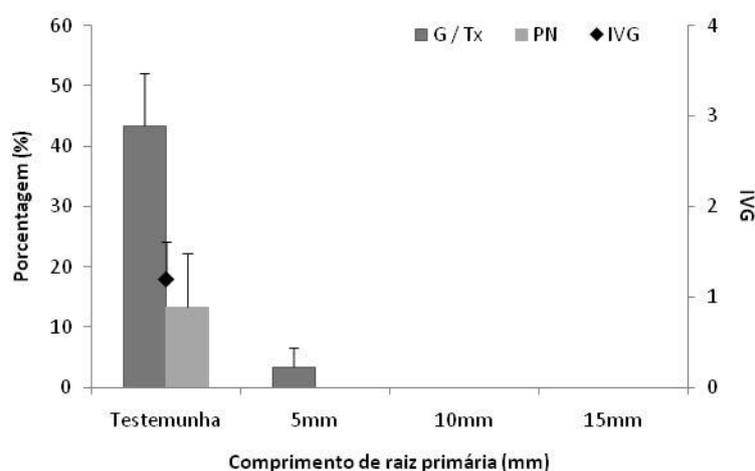


FIGURA 6. Germinação (G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Plântulas Normais e Taxa de sobrevivência (Tx) de sementes maduras (60 DAA) de *C. echinata*, após embebição e comprimento de raiz primária de 5, 10 e 15 milímetros, com posterior secagem em atmosfera controlada, por 3 dias. Germinação se refere apenas a testemunha.

Experimento 4

Neste experimento foram escolhidos comprimentos de raiz primária de 3, 4 e 5 mm, e após a secagem das sementes é possível observar que a semente madura com comprimento de raiz primária de 3 mm ainda apresenta algum grau de tolerância, o que não ocorre nos outros comprimentos (Figura 7). Sementes com comprimento de 4 mm de raiz apresentam queda acentuada na taxa de sobrevivência e de plântulas normais quando secas, com esses parâmetros próximos a zero quando o comprimento da raiz chega a 5mm (Figura 7).

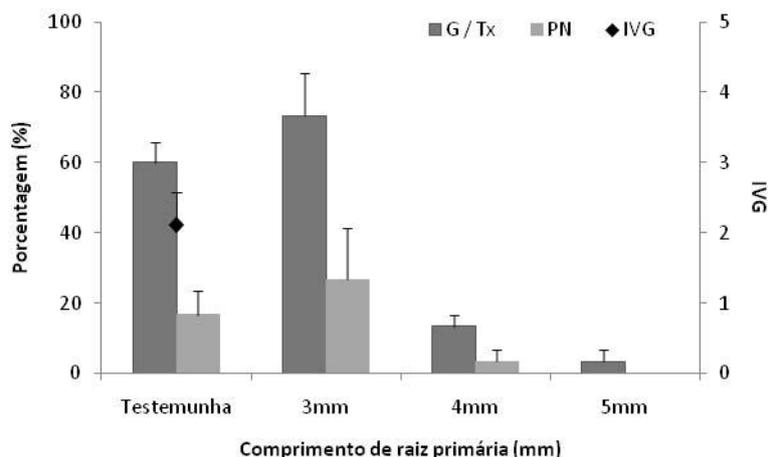


FIGURA 7. Germinação (G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Plântulas Normais e Taxa de sobrevivência (Tx) de sementes maduras (60 DAA) de *C. echinata*, após embebição e comprimento de raiz primária de 3, 4 e 5 milímetros, com posterior secagem em atmosfera controlada, por 3 dias. Germinação se refere apenas a testemunha.

DISCUSSÃO

A separação das sementes de *C. echinata* se mostrou eficiente, pois, apesar de não se notarem diferenças em relação à germinação, a produção de plântulas normais e o índice de velocidade de germinação destacaram as sementes intactas como o de melhor qualidade fisiológica, as esverdeadas intactas como o imediatamente inferiores àquelas devido ao IVG menor e, ainda, as demais como as de baixa qualidade (Figura 1).

Considerando que as sementes esverdeadas intactas apresentaram características bastante próximas as sementes intactas (sementes de melhor qualidade fisiológica) aquelas foram selecionadas para os estudos preliminares das fases de tolerância e intolerância à dessecação.

Os resultados das incubações para secagem de sementes com uso de K_2CO_3 e com PEG se mostraram adequados ao objetivo proposto. A perda de umidade das sementes em atmosfera controlada foi rápida (queda até 20% de teor de água em 24 horas de incubação) atende a necessidade de redução rápida da umidade das sementes para se verificar a tolerância à dessecação do lote, e, além disso, estabilizar os valores de teor de água próximos a 10%, com pouca variação (Figura 2A). Dessa maneira, pode-se determinar a incubação em atmosfera controlada por 3 dias, um dia de secagem e mais dois dias para manutenção das sementes no estado seco (J.M.R. Faria, da Universidade Federal de Lavras, 2008, comunicação pessoal).

Já a incubação em PEG permitiu a redução de umidade de forma lenta, como esperado, forçando e mantendo o potencial hídrico das sementes a estabilizar em valores próximos ao da solução de incubação (-3 MPa, Figura 2D), atendendo também as necessidades do tratamento de estresse osmótico, conforme protocolo sugerido por Leduc (2007) para a indução de tolerância em sementes imaturas, podendo ser escolhido para ensaios de restabelecimento de tolerância à dessecação, a incubação em solução osmótica de PEG a -3 MPa por 24 horas.

Os resultados obtidos no experimento 1, utilizando tempos de embebição progressivos mostram que a tolerância à dessecação dessas sementes é mantida por pelo menos até 32 a 40 horas de embebição, decaindo quanto maior o tempo de embebição, principalmente nos tempos de 40 e 48 horas de embebição (Figura 4). Esses resultados poderiam colocar os dois tratamentos como alvos para a re-indução de tolerância à dessecação, porém, as sementes maduras de pau-brasil apresentam velocidade de germinação relativamente rápida (Tabela 3), e, devido à própria variação natural que ocorre na germinação dessas sementes, pode-se notar que as sementes que sobreviveram nesses tratamentos tinham raiz primária curta ou ainda não protrudida, evidenciando que os tempos de embebição não são parâmetros confiáveis para o estudo proposto nas sementes maduras de *C. echinata*.

Utilizando comprimento de raiz primária como parâmetro para formar os grupos a serem secos, foi possível observar que a sensibilidade a dessecação aumenta enquanto a germinação avança (Figura 5), e que essas sementes ainda são capazes de resistir em comprimentos entre 9 e 11 milímetros, valores relativamente altos se comparadas a outras espécies tolerantes, como tomates e *M. truncatula* que já se mostraram sensíveis à dessecação com 2 mm de raiz primária (Lin et al., 1998; Buitink et al., 2003), indicando que a perda do processo de tolerância à dessecação ocorreria em comprimentos maiores da raiz primária.

Os resultados da caracterização do novo lote de sementes maduras de *C. echinata* formado já eram esperados (Tabela 2), já que os lotes provenientes deste já estavam armazenados há 17 meses e não apresentavam qualidade inicial elevada (Tabela 1 e Figura 1). Utilizando as sementes maduras deste lote formado para o experimento 3 (Figura 6), se obteve resultados inesperados quando mesmo a semente de 5 mm atingiu índice muito baixo de sobrevivência. Este comportamento pode estar ligado à deterioração do lote de sementes durante o armazenamento, sobre a capacidade de manutenção da tolerância à dessecação das sementes durante a germinação.

Ao selecionar menores comprimentos de raiz primária deste lote, foi possível observar que a semente madura com comprimento de raiz primária de 3 mm ainda é capaz de resistir a

secagem até teor de água de 10%, enquanto sementes com comprimento de 4 mm e 5 mm, não (Figura 7), indicando que os mecanismos de tolerância à dessecação que estavam mantidos nas sementes com 3 mm foram perdidos com o avanço da germinação.

CONCLUSÕES

As sementes esverdeadas intactas apresentaram semelhanças fisiológicas às sementes intactas, podendo ser utilizadas para os estudos iniciais de perda de tolerância à dessecação.

O armazenamento das sementes de pau-brasil proporcionou diferenças na sensibilidade à dessecação nas fases iniciais da germinação dessas sementes.

Nas sementes com curto período de armazenamento o comprimento da raiz primária foi um parâmetro mais eficiente do que o tempo de germinação para estudos de perda de tolerância à dessecação.

REFERÊNCIAS

- ALPERT, P. Sharing the secrets of life without water. *In: **Drying without dying**: The comparative mechanisms and evolution of desiccation tolerance in animals, microbes, and plants. **Integr. Comp. Biol.**, v. 45, p. 683-684, 2005.*
- BARBEDO, C.J.; BILIA, D.A.C. Evolution of research on recalcitrant seeds. **Scientia Agricola**, v. 55(especial), p. 121-125, 1998.
- BARBEDO, C.J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasílica**, v. 12, p. 145-164, 1998.
- BARBEDO, C.J.; BILIA, D.A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 431-439, 2002.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Seed recalcitrance - current perspectives. **South African Journal of Botany**, v. 67, p. 79-89, 2001.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Recalcitrant seeds. *In: Benech-Arnold RL, Sa'nchez RA, eds. **Handbook of seed physiology**: applications to agriculture. New York: Haworth Press, p. 305-345, 2004.*
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Review: From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. **Annals of Botany**, v. 101, p. 213-228, 2008.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds**. Physiology of development and germination, 2nd edn. New York: Plenum Press, 1994.

- BITTENCOURT, M.L. C.; DIAS, D.C.F.S; ARAUJO, E.F.; DIAS, L.A S. Controle da hidratação para o condicionamento osmótico de sementes de aspargo. **Rev. bras. sementes**, vol.26, n.2, p. 99-104, 2004.
- BORGES, I.F.; GIUDICE, J.D.; BILIA, D.A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; BARBEDO, C.J. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered Leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 851-861, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, p.399, 2009.
- BUITINK, J.; VU, B.L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, v. 13, p. 273-286, 2003.
- CUNHA, M.W.; LIMA, H.C. **Viagem a terra do pau-brasil**. Agência Brasileira de Cultura, Rio de Janeiro, 1992.
- DEAN, W. **A ferro e fogo: a história e a devastação da mata atlântica brasileira**. Companhia das Letras, São Paulo, 484p, 1996.
- DE CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. *In: GERMINAÇÃO, DO BÁSICO AO APLICADO*. Orgs: Ferreira, A.G., Borguetti, F. Editora Artmed, Porto Alegre, 2004.
- ELLIS, R.H.; MAI-HONG, T.; HONG, T.D.; TAN, T.T.; XUAN-CHUONG, N.D.; HUNG, L.Q.; NGOC-TAM, B.; LE-TAM, V.T. Comparative analysis by protocol and key of seed storage behaviour of sixty Vietnamese tree species. **Seed Science and Technology**, vol. 35, n. 2, p. 460-476, 2007.
- FARIA, J.M.R.; BUITINK, J.; VAN LAMMEREN, A.A.M.; HILHORST, H.W.M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 2119-2130, 2005.
- FARRANT, J.M.; BAILLY, C.; LEYMARIE, J.; HAMMAN, B.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Wheat seedlings as a model to understand desiccation tolerance and sensitivity. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 563-574, 2004.
- HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; HANDA, S.; HANDA, A.K. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. **HortScience**, v. 19, p. 371-377, 1984.
- HELLMANN, M.E.; MELLO, J.I.O.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; BARBEDO, C.J. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 93-101, 2006.
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome, IPGRI. 62p. (Technical Bulletin, 1), 1996.
- KALEMBA, E.M.; JANOWIAK, F.; PUKACKA, S. Desiccation tolerance acquisition in developing beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds: the contribution of dehydrin-like protein. **Trees**, v 23, p. 305–315, 2009.
- KERMODE, A.R. Role of abscisic acid in seed dormancy. **Journal of plant growth and regulation**, v. 24, p. 319–344, 2005.

- LAMARCA, E.V., LEDUC, S.N.M., BARBEDO, C.J. **Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil – Leguminosae) pelo teste de tetrazólio.** Revista Brasileira de Botânica. V.32, n.4, p.793-803. 2009.
- LEDUC, S.N.M. **Indução de tolerância à dessecação e variação de carboidratos solúveis em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) durante a maturação.** Instituto de Botânica, São Paulo, 2007. 110p. (Dissertação de Mestrado)
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-7, 1962.
- MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, v. 51, p. 914-916, 1973.
- MEDEIROS, A.C. de S. Preparo e uso de soluções salinas saturadas para a caracterização fisiológica de sementes florestais. Embrapa Florestas, Colombo. Circular técnica 125. 6p. 2006.
- MELLO, J.I.O. & BARBEDO, C.J. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae - Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, v. 31, n. 4, p. 645-655, 2007.
- OLIVEIRA, J.M. **Tolerância à dessecação em sementes de *Leucaena leucocephala* durante a germinação.** Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais. 2009. Pag. 98 (Dissertação de Mestrado)
- PRITCHARD, H.W.; DAWS, M.I.; FLETCHER, B.J.; GAMENE, C.S.; MSANGA, H.P.; OMONDI, W. Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 6, p. 863–870, 2004.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science & Technology**, v. 1, p. 499-514, 1973.
- ROCHA, Y.T. **Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade.** Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. 396p. (Tese de doutorado)
- VAZQUEZ, G.H. **Condicionamento fisiológico de sementes de soja: efeitos sobre germinação, vigor e potencial de armazenamento.** USP/ESALQ, Piracicaba, 1995. 138p. (Dissertação de Mestrado)
- VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n.11/12, p.1957-1968, 1991.
- VILLELA, F.A.; SILVA, W.R. Curvas de secagem de sementes de milho utilizando o método intermitente. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.49, n.1, p.145-153, 1992.
- WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Research**, v. 8, p. 223–244, 1998.
- WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12 (edição especial), p. 7-21, 2000.

4. CAPÍTULO 2

VARIAÇÕES NA COMPOSIÇÃO DOS CARBOIDRATOS SOLÚVEIS E DE CICLITÓIS DURANTE A AQUISIÇÃO E PERDA DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE *C. echinata* LAM (pau-brasil)

JOÃO PAULO NALDI SILVA, DANILO DA CRUZ CENTENO, MARÍLIA GASPAR,
CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

(Nas normas da Revista Brasileira de Sementes)

RESUMO - A aquisição da tolerância à dessecação ocorre durante a maturação da semente antes do início do processo natural de secagem. Por outro lado a sensibilidade à dessecação aumenta com o avanço da germinação, associada à protrusão da raiz primária. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aquisição e perda de tolerância à dessecação em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), confrontando os comportamentos tolerantes e intolerantes de sementes imaturas e maduras e analisando as modificações dos carboidratos solúveis e ciclitóis. Sementes imaturas de 43 DAA coletadas em dois anos das mesmas matrizes tiveram comportamentos antagônicos após secagem, evidenciando efeito ambiental sobre a aquisição da tolerância. Sementes com 3 mm de raiz primária suportam secagem até 10% de água, enquanto que sementes com 5 mm não, com aumento das proporções de sacarose em ambas. A manutenção do processo de tolerância a dessecação está ligada ao avanço da germinação, com outros mecanismos envolvidos além da sacarose. Sementes imaturas e maduras parecem ter estratégias diferentes para suportar a desidratação, ambas aumentam as proporções de sacarose na secagem, se utilizando de reservas de amido e de ciclitóis, com provável papel protetor de galactinol e *myo*-inositol.

Termos para indexação: tolerância à dessecação em sementes, carboidratos solúveis, maturação, germinação, *C. echinata*.

ACQUISITION AND LOSS OF DESICCATION TOLERANCE AND CHANGES IN SOLUBLE CARBOHYDRATES AND CYCLITOLS DURING MATURATION AND GERMINATION OF *C. echinata* LAM (BRAZIL-WOOD)

ABSTRACT - The acquisition of desiccation tolerance occurs during seed maturation before the natural process of drying. Moreover, the desiccation sensitivity increases with the seed germination associated with primary root protrusion. The objective of this work was to evaluate the acquisition and loss of desiccation tolerance in *Caesalpinia echinata* Lam (brazil-wood) seeds, comparing the tolerant and intolerant behavior of immature and mature seeds and analyzed the changes of soluble carbohydrates and cyclitols. Immature seeds collected at 43 DAF in two years of the same trees, shows antagonistic behavior after drying, implying environmental effect on the acquisition of seed tolerance. Seeds with 3 mm of primary root support drying up to 10% water content, whereas seeds with 5 mm not, with increasing proportions of sucrose in both. The maintenance of desiccation tolerance in mature seeds is linked to the advancement of germination, with other mechanisms involved in addition to sucrose. Immature and mature seeds seem to have different strategies to withstand dehydration, both increase the proportion of sucrose in the drying process, making use of starch reserves and cyclitols, with a probable protective role of galactinol and *myo*-inositol.

Index terms: seed desiccation tolerance, soluble carbohydrates, maturation, germination, *C. echinata*.

INTRODUÇÃO

Dentre as formas de conservação *ex situ*, a formação de bancos de sementes figura entre as principais (Barbedo & Marcos Filho, 1998), pois serve de base da conservação dos recursos genéticos das coleções ativas de espécies (Berjak & Pammenter, 2008). Para isso são necessárias informações importantes relativas ao armazenamento e à germinação das sementes, tais como tolerância à dessecação e os tipos de reservas da semente, que permitam a produção, beneficiamento e manutenção de sementes com elevado potencial fisiológico.

O armazenamento das sementes ortodoxas é favorecido pela diminuição da temperatura ambiente e do teor de água da semente (Roberts, 1973). Sementes ortodoxas são, dessa forma, tolerantes à dessecação, resistindo à secagem até umidade abaixo de 10%. Já as sementes recalcitrantes tendem a perder a viabilidade com a redução do grau de umidade, perdendo a viabilidade após secagem até cerca de 20% e, conseqüentemente, não suportando muito tempo de armazenamento (Roberts, 1973). Esse comportamento pode ser considerado um *continuum*, formado pelo máximo de ortodoxia em um extremo e o máximo de recalcitrância no outro (Barbedo & Bilia, 1998; Berjak & Pammenter, 2004). Esse conceito engloba a grande variabilidade que ocorre não apenas entre espécies, mas também dentro da mesma espécie. Trabalhos recentes indicam que o local de origem possui efeito significativo no desenvolvimento da semente e no seu grau de tolerância à dessecação (Daws et al., 2004 e 2006). Dessa forma, no conceito de *continuum*, mesmo sementes categorizadas como ortodoxas poderiam não ser igualmente tolerantes à dessecação (Walters, 1998).

A aquisição da tolerância à dessecação pelas sementes ortodoxas ocorre durante a formação e maturação da semente (Berjak & Pammenter, 2001), entre a fase de expansão celular e de deposição de reservas nas células e a do início do processo natural de secagem (Bewley & Black, 1994). Por outro lado, a sensibilidade à dessecação aumenta notoriamente com o início do processo de germinação, mesmo em sementes ortodoxas, e geralmente está associada à protrusão da raiz primária (De Castro et al., 2004b). Contudo, o momento exato da perda da tolerância à dessecação nas sementes ortodoxas pode variar entre as espécies (Farrant et al., 2004).

Entre os mecanismos que podem estar envolvidos no processo de aquisição e perda da tolerância à dessecação (Berjak & Pammenter, 2008), o acúmulo de carboidratos não estruturais no período de maturação foi bastante investigado, evidenciando o papel da sacarose e de certos oligossacarídeos, como rafinose e estaquiase (Steadman et al., 1996;

Black et al., 1999; Buitink et al., 2003; Leduc 2007). Esses açúcares teriam um papel dinâmico de impedir a aproximação das membranas umas às outras, substituindo fisicamente a água quando esta é removida e, dessa forma, prevenindo uma possível fusão destas (Hoekstra et al., 2001). Outra visão seria a da ação benéfica dos carboidratos solúveis estar associada, ainda, a um sistema antioxidante bastante eficiente (Walters et al., 2002).

Outros açúcares como os ciclitóis livres e galactosil ciclitóis também se acumulam em algumas sementes e parecem contribuir na estabilidade estrutural de organelas e de outras macromoléculas de maneira semelhante aos oligossacarídeos da série da rafinose - ROS (Obendorf, 1997; Peterbauer & Richter, 2001), quando estes não estão evidenciados (Horbowicz et al., 1998; Steadman et al., 2000; Borges et al., 2006). Além disso, açúcares como *myo*-inositol e o galactinol estão associados à formação de rafinose e estaquiose durante a maturação (Pridham & Hassid, 1965; Saravitz et al., 1987; Smith et al., 1991), com o *myo*-inositol sendo componente base das reações de síntese, e aparente regulador da via biossintética de ROS (Hitz et al., 2002; Zhao et al., 2004).

Trabalhos com sementes ortodoxas têm demonstrado que as mesmas podem readquirir a tolerância à dessecação, perdida durante a germinação, quando submetidas a estresses hídricos em soluções osmóticas (Bruggink & Toorn, 1995; Faria et al., 2005; Massetto et al., 2008; Oliveira, 2009). A tolerância à dessecação também vem sendo estudada durante a maturação das sementes, procurando induzir o embrião imaturo a tolerar a secagem (Black et al., 1999; Leduc, 2007); essa indução foi obtida, por exemplo, incubando-se as sementes imaturas de *C. echinata* em soluções de polietilenoglicol (PEG) em potencial hídrico ligeiramente inferior ao do embrião (Leduc, 2007). A perda de água de forma lenta possibilita respostas fisiológicas das sementes que levam a algum tipo de proteção, não apenas na germinação, mas também no desenvolvimento de sementes ortodoxas (Kermode & Finch-Savage, 2002) permitindo-lhes resistir a uma posterior desidratação.

Caesalpinia echinata Lam., o conhecido pau-brasil que deu nome ao nosso País, é pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, apresenta distribuição natural restrita à floresta pluvial tropical atlântica e está ameaçada de extinção (Rocha, 2004). Além da importância da espécie para a história e cultura de nosso país, somada ao fato de sua madeira apresentar propriedades para a confecção dos melhores arcos de violinos no mundo, essas sementes toleram secagem até atingirem níveis abaixo de 8% de água (Barbedo et al., 2002) e vêm se mostrando de grande interesse para estudos de tolerância à dessecação. Acumulam amido como principal polissacarídeo de reserva, seguido de alguns ciclitóis como

o pinitol e galactopinitol A e B (Borges et al., 2006. Garcia et al., 2006) e, diferentemente da maioria das sementes tolerantes à dessecação conhecidas, apresentam apenas traços de rafinose e estaquiose (Borges et al., 2006; Garcia et al., 2006). São sementes que perdem a viabilidade rapidamente, mesmo quando secas, se armazenadas em temperaturas próximas ou acima de 20°C (Barbedo et al., 2002), mas mantêm a viabilidade por mais de 2 anos se armazenadas em temperaturas inferiores a 0°C (Hellmann et al., 2006).

As sementes de pau-brasil têm sido pouco estudadas quanto à sua capacidade de recuperar a tolerância à dessecação após o início da germinação e, embora tenha sido possível induzir essa tolerância em sementes imaturas (Leduc, 2007), pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que possam estar envolvidos na aquisição e na perda de sua tolerância à dessecação. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a aquisição de tolerância a dessecação pelas sementes imaturas e a perda deste processo nas sementes maduras germinantes, procurando induzir tal processo ou restabelecê-lo através de estresse osmótico nas sementes, analisando o conteúdo e composição de carboidratos solúveis, germinação e dessecação das sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Sementes de *Caesalpinia echinata* foram coletadas em diferentes estádios de maturação. Para tanto, flores foram marcadas, na base de inflorescências que tivessem ao menos três flores abertas, em 15 matrizes localizadas em bosque estabelecido da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, no município de Moji-Guaçu, São Paulo (22°15-16' S e 47°8-12' W).

A coleta de frutos foi realizada, nos anos de 2007 e 2008, aos 43, 50-55 e 59-60 dias após a antese (DAA), as duas primeiras caracterizando estádios imaturos e a última maduros, segundo Borges et al. (2005). Os frutos foram beneficiados e separados em lotes homogêneos, sendo analisadas características como coloração da casca, rigidez e cor de acúleos. As sementes obtidas foram ainda separadas quanto a coloração do tegumento e características fisiológicas como teor de água, matéria seca, potencial hídrico e germinação. As sementes danificadas por insetos e/ou já germinadas foram descartadas.

Os experimentos com as sementes imaturas (intolerantes à dessecação) foram instalados após o beneficiamento, sendo o material armazenado em envelopes plásticos

semipermeáveis a 6°C por no máximo 15 dias. As sementes maduras (tolerantes à dessecação) foram armazenadas em envelopes de papel Kraft a -18°C.

Secagem e condicionamento osmótico das sementes

Sementes de 43 DAA e 50-55 DAA (imaturas) e sementes maduras com 3 e 5 milímetros de comprimento da raiz primária foram submetidas a dois tipos de tratamentos, secagem direta e secagem após prévio condicionamento osmótico das sementes. O condicionamento osmótico foi realizado com solução de PEG com potencial hídrico de -3,0 MPa, a 8°C por 24 h em câmara de refrigeração (Leduc, 2007). As fases de tolerância e intolerância à dessecação das sementes germinantes foram determinadas no Capítulo 1.

Foram realizados dois tipos de secagem:

i) em estufa a 40 °C com circulação forçada de ar, durante 6 a 12 horas, até atingirem 10% de água, como realizado por Leduc (2007) para as sementes de *C. echinata*;

ii) com atmosfera controlada, em caixas plásticas (75 cm de comprimento x 60 cm de largura x 40 cm de altura) contendo solução saturada de K₂CO₃ com umidade relativa de 43% a 20°C, sem haver contato das sementes com a solução salina, como realizado por Faria et al. (2005) para sementes de *Medicago truncatula*. Esta secagem diferencia-se da anterior por ser rápida e permitir que as sementes atinjam uniformemente cerca de 10% de umidade, que as caracterizam como tolerantes a dessecação (Faria et al., 2005; Alpert, 2005). Após incubação do material, o ambiente interno da caixa deve entrar em equilíbrio em menos de 24 horas, com as sementes armazenadas por um período total de 3 dias, para garantir a secagem e manutenção no estado seco (Capítulo 1).

Testes de Germinação

Os testes de germinação e as análises da produção de plântulas normais foram realizados em germinadores Marconi tipo MA400 com circulação interna de água, a 25±1°C, com fotoperíodo de 12 horas e 100% UR (Mello & Barbedo, 2007). As sementes foram colocadas em rolo de papel para germinação (Germitest), umedecidos previamente com água (Brasil 1992), em quatro repetições de 10 a 20 sementes cada. Foram feitas leituras diárias, registrando-se as sementes germinadas (protrusão da raiz primária de, no mínimo, 2 cm) e o desenvolvimento de plântulas normais (Barbedo et al., 2002). Foi calculado o Índice de Velocidade de Germinação (IVG), através da adaptação da fórmula de Índice de Velocidade de Emergência (Maguire, 1962).

Nos experimentos envolvendo comprimentos de raiz primária, além do índice de germinação (G) e plântulas normais (PN) da testemunha, foi determinada a taxa de

sobrevivência das sementes após serem secas (Tx), sendo considerada sobrevivente a semente com raiz primária protruída e que após secagem e nova hidratação, manteve seu desenvolvimento. O valor da taxa de sobrevivência se refere apenas as sementes que germinaram, e por isso pode alcançar valores maiores que o índice de germinação da testemunha.

Determinação do teor de água, matéria seca e potencial hídrico das sementes

O teor de água (expresso em porcentagem, com base na massa úmida) e o conteúdo de matéria seca das sementes (mg.semente^{-1}) foram determinados gravimetricamente pelo método de estufa a $103 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, por 17 horas (Brasil, 2009). O potencial hídrico das sementes foi obtido através de psicrômetro, baseando-se no ponto de orvalho, modelo WP4 Dewpoint Potentiometer, da Decagon (USA), utilizando três repetições de 5 sementes cada. A aferição da relação entre potencial hídrico medido e potencial hídrico de equilíbrio foi realizada por meio de isotermas de sorção de água, em soluções de potencial osmótico conhecido, com polietileno glicol (PEG), segundo Michel & Kauffmann (1973) bem como por meio de equilíbrio em atmosfera com umidade relativa controlada e pré-estabelecida, utilizando-se sais específicos (Medeiros, 2006).

Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas a partir de radículas das sementes coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C , em três repetições com cerca de 100 a 150 radículas, com posterior pulverização do material vegetal em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. Devido a pouca quantidade de material vegetal nas sementes imaturas, as repetições foram reunidas em apenas uma para análise.

Extração e análise de carboidratos não estruturais e osmólitos

A extração dos carboidratos solúveis foi realizada segundo metodologia adaptada por Garcia et al. (2006), a partir de 50 a 100 mg de material liofilizado. Como as radículas foram coletadas em nitrogênio líquido, não foi necessária a etapa de inativação de enzimas. A extração dos carboidratos foi realizada com etanol 80% na proporção de 1:10 (p:v), a 80°C por 15 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm em temperatura ambiente por 15 min. Ao término da centrifugação, retirou-se o sobrenadante, armazenando-o em frascos apropriados, devidamente identificados. O procedimento completo foi repetido mais duas vezes, para que fossem extraídos todos os açúcares solúveis.

Os resíduos da extração etanólica foram lavados com água deionizada, agitados em vortex com posterior retirada de água (que foi adicionada a parte aquosa da extração etanólica) e liofilizados por 48 horas, pesados e reservados para quantificação de amido.

Os sobrenadantes das amostras tiveram seu volume igualado e foram, então, utilizados para a quantificação dos açúcares através do método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), sendo utilizada uma solução de glucose ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 490 nm, em triplicatas para cada amostra. Após a quantificação dos açúcares totais pelo método do fenol-sulfúrico, separaram-se 1 mL das amostras e estas foram então deionizadas em colunas contendo resinas de troca catiônica e aniônica Dowex, sendo eluídas com 10 volumes de água deionizada. O material eluído teve seu pH neutralizado com hidróxido de amônio. Os eluatos foram concentrados até secagem completa e retomados em 1 mL de água deionizada, sendo novamente quantificados e, um volume contendo $400 \mu\text{g}$ de açúcar, de cada repetição, foi analisado através de cromatografia líquida de alta resolução em cromatógrafo DIONEX, modelo ICS3000, em coluna CarboPac PA-1. O sistema de eluição foi o isocrático com 250 mM de hidróxido de sódio (eluente B) em água (eluente A), com fluxo de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, por meio da seguinte programação: 0-2 min, 7% eluente B; 2,1-25 min, 4% eluente B; 25,1-30 min, 80% eluente B; 30,1-35 min, 7% eluente B (Garcia et al., 2006).

Quantificação de amido

Após liofilização, foram pesados 10 mg do resíduo da extração de carboidratos solúveis, para quantificação de amido, por meio de método enzimático, realizando-se digestões com alfa-amilase e amiloglicosidase como descrito por Amaral et al. (2007). A quantificação dos produtos da hidrólise enzimática foi realizada utilizando-se as enzimas glucose-oxidase e peroxidase (GOD-POD) e os reagentes 4-aminoantipirina e fenol em microplaca de Elisa para a leitura a 490 nm. A curva padrão foi construída a partir de quantidades crescentes de glucose na concentração de 1 mg mL^{-1} .

Análises de ciclitóis

Para a análise de ciclitóis, utilizou-se o extrato etanólico obtido na extração de açúcares solúveis totais, sendo evaporado e sililado utilizando piridina e BSTFA, e caracterizado por aparelho de cromatografia a gás acoplado a um espectrometro de massas CG / EM (Richter et al., 1990 modificado). A identificação de cada ciclitol foi realizada através da biblioteca de compostos do aparelho e na comparação dos Índices de Kovats obtidos na literatura, sendo

este índice calculado através do Índice de Retenção (IR) de cada composto quando comparados com padrão de alcanos de cadeias progressivamente maiores.

Após a identificação e calculadas as áreas referentes a cada ciclitol, os valores foram normalizados e as frequências relativas foram obtidas ao comparar as áreas normalizadas de cada açúcar, às áreas obtidas na testemunha, que foram consideradas de valor igual a 1.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos compondo o experimento com sementes imaturas de 2007, e 2 idades de maturação X 4 níveis de secagem nas sementes de 2008, e 8 tratamentos compondo o experimento na semente madura. Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste F); com as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, e os valores de porcentagem, transformados para $\text{arc sen } (\%)^{0,5}$.

RESULTADOS

Indução de tolerância à dessecação na semente imatura

O lote de sementes imaturas (43 DAA) de 2007 apresentou umidade compatível com a idade (67,7%), alta porcentagem de germinação (97%), mas valores não tão altos (53%) de formação de plântulas normais (Tabela 1). Entretanto, as sementes já se apresentavam suficientemente maduras para sobreviver à secagem até que o teor de água atingisse 12% (Tabela 1). O estresse osmótico nessas sementes resultou em diminuição do teor de água para cerca de 10%, equilibrando o potencial hídrico das sementes com o da solução de incubação (-2,8 MPa), sem causar expressiva redução nos valores de germinação (87%, Tabela 1). Já para o tratamento de secagem após o estresse osmótico, a secagem reduziu a umidade para 7,4%, sendo observada queda da germinação.

Dada a importância verificada na diferença do teor de água no lote 2007, maior cuidado foi tomado em 2008 quando, então, os valores de teor de água entre os diferentes tratamentos de secagem foram mais próximos.

As sementes imaturas de 43 DAA coletadas em 2008 apresentaram umidade e germinação elevadas (70,1% e 87%, respectivamente), e apresentaram baixos valores para

IVG (1,5), plântulas normais (18%) e de matéria seca (0,101 g.semente⁻¹) em relação ao obtido no ano anterior. Além disso, os resultados do tratamento de secagem foram opostos ao lote de 2007, obtendo 0% de germinação, e, nas sementes que sofreram estresse osmótico apenas 31% germinaram, e com a secagem subsequente, a germinação foi reduzida a zero.

Devido à variação natural que ocorre na formação de frutos e sementes de *C. echinata*, houve a obtenção de sementes mais maduras após o completo beneficiamento na coleta de 2008. Essas sementes apresentavam tegumento úmido e coloração verde ou roxa, e geralmente manchas escuras, indicando que estas sementes estavam com cerca de 50-55 DAA conforme descrição feita por Borges (2007). Ainda úmidas essas sementes apresentaram valores elevados de germinação e formação de plântulas normais (91% e 80%, respectivamente), ocorrendo redução nesses parâmetros após serem secas abaixo de 10% de umidade (49% e 20%, respectivamente), semelhante ao observado com a semente de 43 DAA de 2007 secas. Esse lote de sementes também apresentou queda na germinação após estresse osmótico, e após subsequente secagem, os valores de germinação e de plântulas normais reduziram ainda mais.

TABELA 1. Características físicas e fisiológicas de sementes imaturas de *C. echinata*, coletadas em diferentes idades e diferentes anos em Mogi-Guaçu/SP.

Colheita	Idade (DAA)	Tratamento	Umidade Inicial (% bu)	Umidade Final (% bu)	Potencial Hídrico (-MPa)	Germinação (%)	Plântulas Normais (%)	IVG	Matéria Seca (g.semente ⁻¹)
2007	43	Testemunha	67,7	67,7 a	-1,3	97 a	53 ab	2,9 a	0,170
		Estresse	67,7	57,9 b	-2,8	87 a	75 a	3,5 a	0,135
		Secagem	67,7	11,8 c	-95,2	53 b	42 b	1,6 b	0,168
		Estresse + Sec	67,7	7,4 d	-	7 c	3 c	0,2 c	0,172
		C. V (%)		2,81		11,44	33,83	19,60	
2008	43	Testemunha	70,0	70,0 aA	-1,5 cA	87 aA	18 aB	1,5 aB	0,101
		Estresse	70,0	60,9 bA	-2,3 cA	31 bB	13 aB	0,5 bB	0,096
		Secagem	70,0	7,8 cA	-77,4 aB	0 cB	0 aB	0 bB	0,090
		Estresse + Sec	70,0	9,4 cA	-62,7 bB	0 cB	0 aA	0 bB	0,076
		C. V (%)		3,97	4,04	22,85	41,45	22,8	
2008	50-55	Testemunha	57,1	57,1 aB	-1,4 bA	91 aA	80 aA	5,1 aA	0,203
		Estresse	57,1	52,7 bB	-2,4 bA	53 bA	38 bA	1,9 bA	0,179
		Secagem	57,1	9,9 cA	-80,5 aA	49 bA	20 bcA	2,0 bA	0,172
		Estresse + Sec	57,1	8,3 cA	-80,5 aA	20 cA	11 cA	0,7 cA	0,203
		C. V (%)		3,97	4,04	22,85	41,45	22,8	

Análises bioquímicas

O comportamento encontrado entre os diferentes anos e entre os estádios de sementes coletadas também foi estudado bioquimicamente, analisando as radículas coletadas desses experimentos.

Na Figura 1 verifica-se que os níveis de amido e de carboidratos solúveis totais aparecem maiores no lote de 50-55 DAA (Figura 1 D). Além disso, o nível de amido nas radículas do lote imaturo de 2007 é maior que o de mesma idade em 2008. Os níveis de açúcares solúveis totais entre esses dois lotes são bem próximos, porém o lote imaturo de 2007 tem níveis bem inferiores de açúcares solúveis totais que o lote de 50-55 DAA (Figura 1 D).

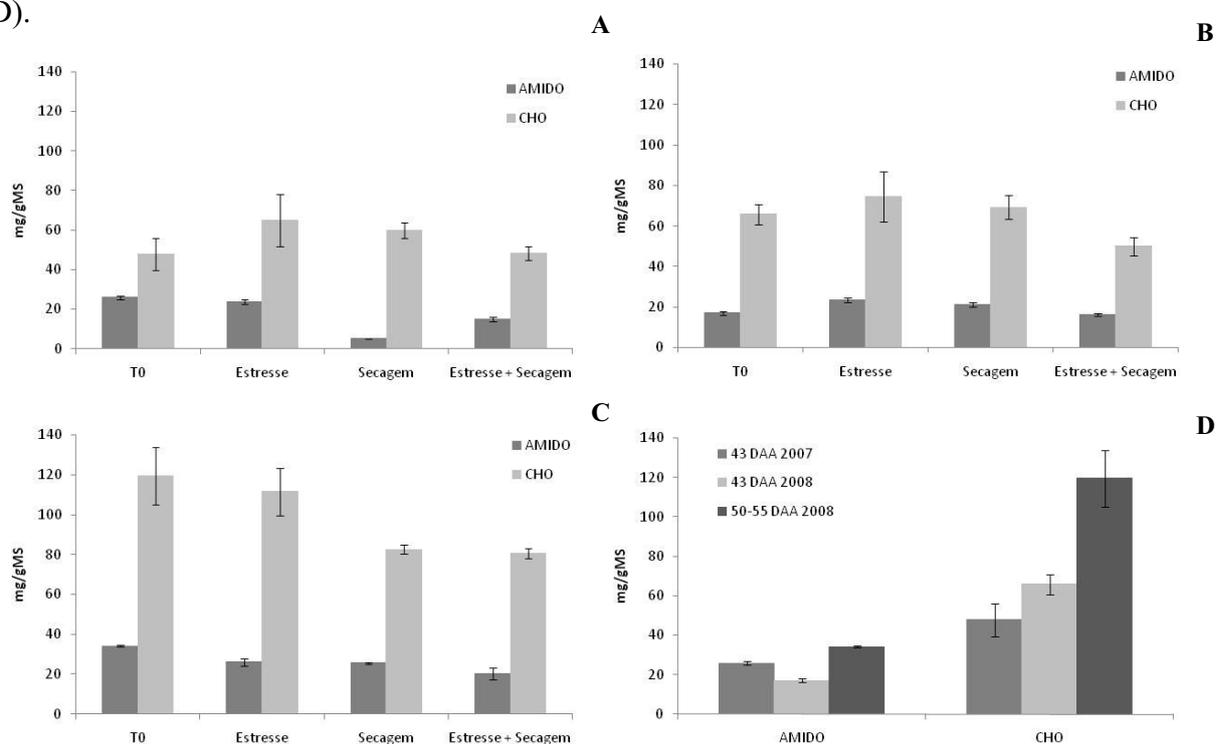


FIGURA 1. Quantificação de amido e de carboidratos solúveis totais de sementes de *C. echinata* coletadas em diferentes estádios de maturação e em diferentes anos, após os seguintes tratamentos: Testemunha (T0); estresse osmótico (Estresse); secagem até 10% (Secagem); secagem após estresse osmótico (Estresse + Secagem). A, sementes imaturas aos 43 DAA, lote 2007. B, sementes imaturas aos 43 DAA, lote 2008. C, sementes imaturas entre 50-55 DAA, lote 2008. D, comparação das testemunhas dos três lotes.

Analisando-se dentro de cada lote, a secagem proporcionou grande queda nos níveis de amido nas radículas das sementes imaturas de 2007 (Figura 1, A), além de pequeno aumento dos carboidratos solúveis totais, porém sem manter a viabilidade dessas sementes (Tabela 1). Excetuando-se esse resultado, não foram observadas grandes mudanças nos níveis

de amido nos diferentes tratamentos e nos diferentes lotes. O tratamento de estresse osmótico não provocou alterações significativas nas quantidades de carboidratos solúveis totais nas sementes, entretanto com a secagem subsequente esses níveis diminuíram em todos os lotes (Figuras 1, A, B e C), assim como os índices de germinação (Tabela 1). É possível notar ainda, que a queda de carboidratos solúveis totais nas radículas das sementes de 43 DAA de 2008 ocorreu também após o tratamento de secagem e em quantidades semelhantes ao lote do ano anterior (Figura 1, C).

Analisando-se o perfil dos açúcares solúveis através de cromatografia líquida de alta resolução (Tabelas 2, 3 e 4), são observadas nas radículas das sementes grandes proporções de ciclitóis, além da sacarose, com baixa proporção de glucose e frutose. Além disso, foram detectadas baixas proporções de oligossacarídeos da série da rafinose, principalmente nos lotes de 43 DAA de 2007 e de 50-55 DAA, sendo maiores nas sementes de 43 DAA de 2008.

O estresse osmótico não proporcionou grandes alterações nas proporções dos açúcares (principalmente sacarose, ciclitóis e oligossacarídeos da série rafinose), excetuando-se as sementes de 50-55 DAA, obtendo aumento dos níveis de rafinose e estaquiose com a contrapartida de ciclitóis (Tabela 4). Já os tratamentos que envolviam secagens, em todos os lotes, também levaram a diminuição dos níveis de ciclitóis e conseguinte aumento dos níveis de estaquiose e rafinose (Tabelas 2, 3 e 4), sendo que as maiores proporções encontradas desses açúcares foram nas radículas das sementes de 43 DAA de 2008 (Tabela 3), único lote que não apresentou germinação quando seca (Tabelas 1). A secagem também proporcionou aumento nas proporções de sacarose em todos os lotes, com maior amplitude nas sementes de 43 DAA de 2007 (Tabela 2), ocorrendo redução na quantidade de amido (Figura 1, A).

TABELA 2. Variações na composição de carboidratos solúveis em radículas de sementes (43 DAA) de *C. echinata*, após estresse osmótico e/ou após secagem em atmosfera controlada (cerca de 10% em base úmida), por 3 dias, lote 2007.

Tratamento	Ciclitóis (%)	Glucose (%)	Frutose (%)	Sacarose (%)	Rafinose (%)	Estaquiose (%)
Testemunha	69,6	4,5	1,7	21,5	1,1	1,5
Estresse osmótico	68,2	4,1	1,6	23,7	0,9	1,5
Secagem	53,7	5,3	2,6	35,0	1,5	1,9
Estresse + Secagem	55,1	6,2	3,0	30,6	2,3	2,9

TABELA 3. Variações na composição de carboidratos solúveis em radículas de sementes (43 DAA) de *C. echinata*, após estresse osmótico e/ou após secagem em atmosfera controlada (cerca de 10% em base úmida), por 3 dias, lote 2008.

Tratamento	Ciclitóis (%)	Glucose (%)	Frutose (%)	Sacarose (%)	Rafinose (%)	Estaquiose (%)
Testemunha	58,4	3,7	1,8	22,9	7,9	5,4
Estresse osmótico	61,5	3,3	1,3	21,1	7,7	5,1
Secagem	47,3	4,1	2,5	29,6	9,4	7,1
Estresse e Secagem	50,1	4,4	2,5	25,6	9,6	7,9

TABELA 4. Variações na composição de carboidratos solúveis em radículas de sementes (50-55 DAA) de *C. echinata*, após estresse osmótico e/ou após secagem em atmosfera controlada (cerca de 10% em base úmida), por 3 dias, lote 2008.

Tratamento	Ciclitóis (%)	Glucose (%)	Frutose (%)	Sacarose (%)	Rafinose (%)	Estaquiose (%)
Testemunha	56,4	5,6	0,7	31,2	1,6	4,6
Estresse osmótico	44,8	8,4	1,6	33,8	4,2	7,2
Secagem	47,5	6,4	1,5	36,2	3,7	4,8
Estresse e Secagem	44,1	7,6	1,8	35,5	4,9	6,1

A análise de ciclitóis por CG-EM permitiu identificar alguns açúcares deste grupo que estavam presentes nas radículas das sementes, como o pinitol, *chiro*-inositol e *myo*-inositol, e com prováveis chances de também terem sido encontrados galactopinitol A e B e galactinol (Figura 2).

Analisando a quantidade relativa desses açúcares nas radículas de sementes imaturas de 2007 (Figura 2, A), nota-se que os tratamentos tiveram efeito acentuado e positivo sobre as proporções de galactinol e negativo sobre as proporções de pinitol e *chiro*-inositol. A secagem proporcionou também aumento nos níveis de galactopinitol B, e leve aumento de *myo*-inositol. Enquanto que no tratamento de estresse com posterior secagem, houve aumento semelhante de galactopinitol B como na secagem, mas o mesmo não ocorre com os níveis de *myo*-inositol.

A variação encontrada nas proporções de galactinol vistas nas sementes de 43 DAA de 2007 não ocorreu nas sementes de mesma idade em 2008, tendo efeito positivo sobre os níveis de galactopinitol A, B e *myo*-inositol (Figura 2, B), principalmente pelos tratamentos de secagens que provocaram as maiores variações. Porém, foram exatamente os tratamentos onde a germinação foi zero (Tabela 1).

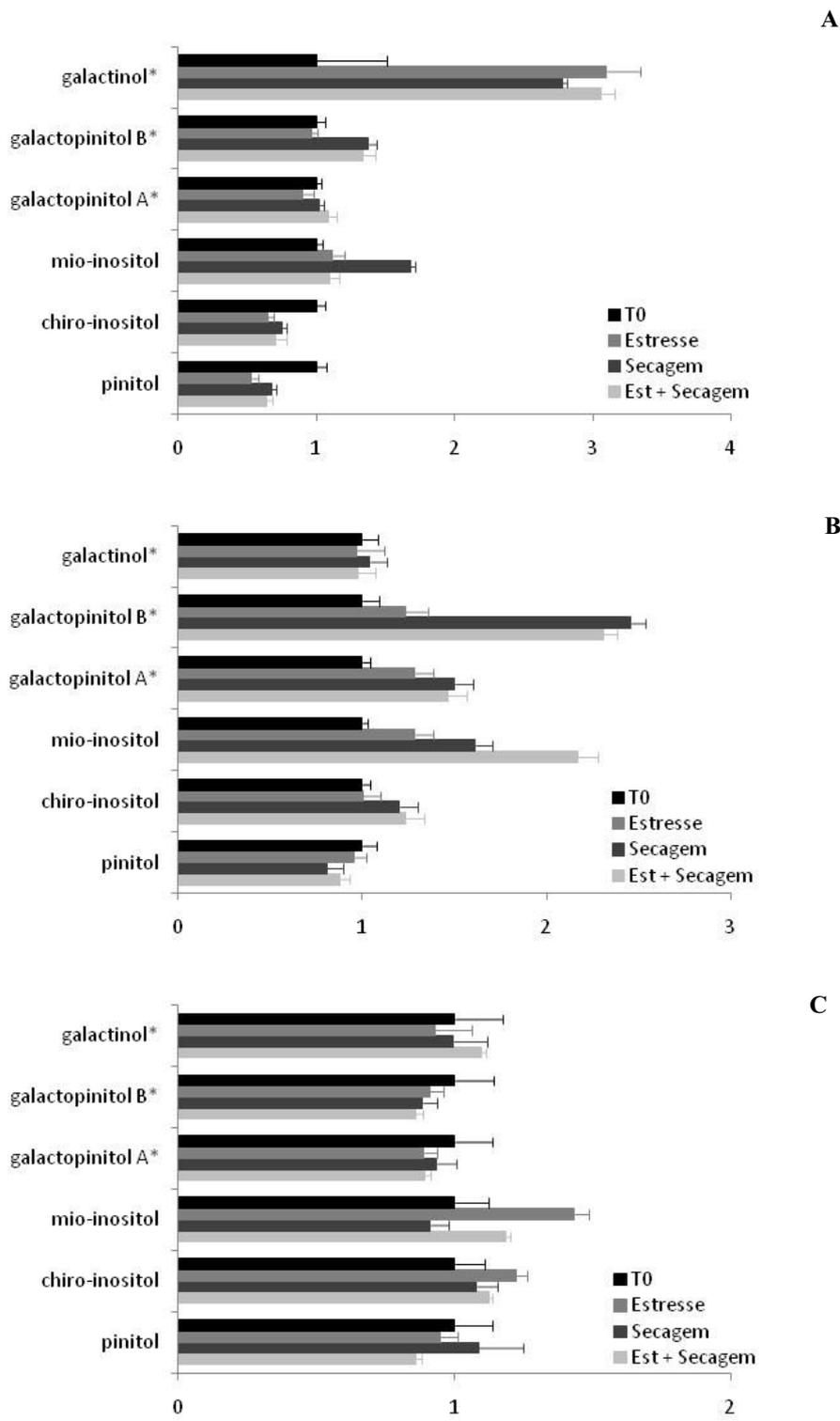


FIGURA 2. Quantidade relativa de alguns ciclitóis (pinitol, *chiro*-inositol, *myo*-inositol, galactopinitol A e B e galactinol), em sementes de *C. echinata* coletadas em diferentes estádios de maturação e em diferentes anos, após os seguintes tratamentos: Testemunha (T0); estresse osmótico (Est); secagem (Sec); secagem após estresse osmótico (Est + Sec). A, sementes aos 43 DAA, lote 2007. B, sementes aos 43 DAA, lote 2008. C, sementes entre 50-55 DAA, lote 2008. Os dados foram normalizados a partir da resposta calculada da testemunha de cada lote (=1). *Os valores encontrados provavelmente são de Galactopinitol A e B e galactinol.

Já no lote de sementes de 50-55 DAA coletado em 2008, não houve grandes variações entre os ciclitoís identificados, exceto pelo aumento de *myo*-inositol quando as sementes foram estressadas e com a secagem subsequente (Figura 2, C).

Ao analisar apenas as testemunhas dos três lotes de sementes imaturas, nota-se uma grande variação nas proporções dos ciclitoís, sendo interessante notar que apesar das respostas fisiológicas semelhantes entre o lote de sementes com 50-55 DAA de 2008 e o de sementes imaturas de 2007 (Tabela 1), a quantidade relativa de cada ciclitol encontrado é oposta entre eles (Figura 3).

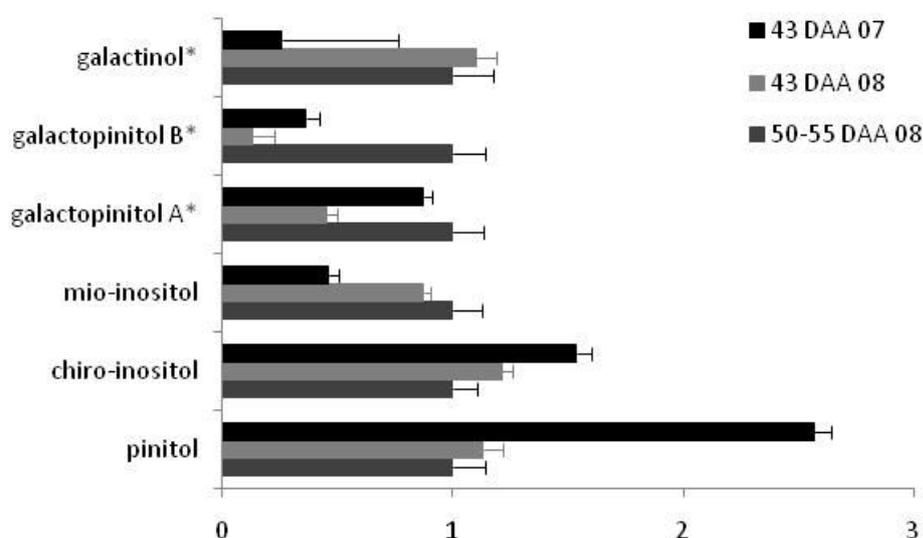


FIGURA 3. Quantidade relativa de alguns ciclitoís (pinitol, *chiro*-inositol, *myo*-inositol, galactopinitol A e B e galactinol), em sementes de *C. echinata* coletadas em diferentes estádios de maturação e em diferentes anos, comparando apenas as testemunhas. Os dados foram normalizados a partir da resposta calculada da testemunha 50-55 DAA 08 (=1). *Os valores encontrados provavelmente são de Galactopinitol A e B e galactinol.

Restabelecimento de tolerância à dessecação na semente madura

Os resultados de tentativa de restabelecimento de tolerância à dessecação com sementes maduras (59 DAA) coletadas em 2007 estão na Tabela 5, sendo selecionadas sementes com 3 milímetros (ainda tolerantes à dessecação), e com 5 milímetros (sensíveis à dessecação), como discutido no Capítulo 1.

Após 17 meses de armazenamento, a semente madura apresentava-se seca (10,6%), com potenciais hídricos tanto do embrião quanto do eixo embrionário elevados (-65,5 e -55,7 MPa, respectivamente), 49% de germinação e 24% de plântulas normais quando comparadas a semente de 43 DAA do mesmo ano (Tabela 1), mas com valores mais elevados de IVG (5,9) e de matéria seca (0,264 g.semente⁻¹).

As sementes que foram embebidas atingindo 3 e 5 milímetros de comprimento de raiz primária, tiveram acréscimo elevado de umidade (60,4 e 61%, respectivamente) e redução acentuada nos potenciais hídricos do embrião (-0,9 e -1MPa, respectivamente) e do eixo embrionário (-3,6MPa para ambos), porém, este se mantendo mais negativo. Essas sementes mantiveram a capacidade germinativa após serem selecionadas quanto ao comprimento (100% para ambos), porém formaram apenas 69% de plântulas normais.

Entretanto, houve perda acentuada da capacidade germinativa das sementes com 3 mm após secagem (29%), valor bem abaixo do obtido em análises prévias (73%, ver Capítulo 1). A perda completa de tolerância à dessecação é vista nas sementes secas com 5mm de comprimento, obtendo zero de sobrevivência, sendo que ambos os comprimentos não foram mais capazes de produzir plântulas normais.

Quando estas sementes passaram por estresse osmótico antes de serem secas, não houve diferenças na taxa de sobrevivência de ambos os comprimentos (Tabela 5), mesmo nas sementes com 3 mm de comprimento.

O estresse osmótico nas sementes de 5 mm causou pequena redução do teor de água da semente (54,1%), aumentando os potenciais hídricos do embrião e do eixo embrionário (-2,0 e -4,7 MPa, respectivamente), com manutenção da germinação e da formação de plântulas normais (Tabela 5).

TABELA 5. Características físicas e fisiológicas de sementes maduras de *C. echinata*, coletadas com 59-60 DAA, nos anos de 2007 e 2008 em Mogi-Guaçu/SP. Lote 2007 armazenado por 17 meses.

Colheita	Idade (DAA)	Tratamento	Umidade		Potencial Hídrico embrião (-MPa)	Potencial Hídrico eixo (-MPa)	Germinação ou Taxa de sobrevivência (%)	Plântulas Normais (%)	Matéria Seca (g.semente ⁻¹)
			Inicial (% bu)	Final (% bu)					
		Testemunha	10,6	10,6 c	-65,5 d	-55,7 d	49 b	24 b	0,264
		3 mm	60,4	60,4 a	-0,9 e	-3,6 e	100 a	69 a	0,213
		5 mm	61,0	61,0 a	-1,0 e	-3,6 e	100 a	69 a	0,290
		3 mm Secagem	60,4	9,4 c	-83,3 a	-81,4 b	29 b	0 c	0,295
2007	59	5 mm Secagem	61,0	10,8 c	-74,4 c	-70,9 c	0 c	0 c	0,289
		3 mm Estresse + Secagem	60,4	9,6 c	-65,2 d	-56,5 d	27 bc	4 bc	0,286
		5 mm Estresse + Secagem	61,0	9,8 c	-77,4 b	-84,4 a	0 c	0 c	0,305
		5 mm Estresse	61,0	54,1 b	-2,0 e	-4,7 e	100 a	62 a	0,300
		C.V (%)		2,69	1,71	2,20	18,72	22,45	

Análises bioquímicas

Na Figura 4, são apresentadas as quantificações de carboidratos solúveis totais e amido, a partir das radículas das sementes, do experimento de tentativa de restabelecimento da tolerância à dessecação.

A radícula da semente madura e seca de *C. echinata* apresenta níveis elevados de amido e de carboidratos solúveis totais (47,9 e 237,6 mg/g MS, respectivamente). Esses níveis apresentam modificações quando o processo de germinação se inicia, diminuindo a quantidade de açúcares solúveis totais nas radículas das sementes com 3 e 5 mm de raiz primária, porém com o dobro da quantidade de amido nas mesmas sementes (95,1 e 94,4 mg/g MS, respectivamente).

Quando estas sementes foram secas até 10%, pode-se observar aumento nos níveis de carboidratos solúveis em valores maiores que da testemunha (281,5 e 286,3 mg/g MS para 3 e 5mm, respectivamente), concomitante a redução de amido.

Esse aumento nos níveis de carboidratos solúveis não é observado quando sementes com 5mm de raiz primária foram previamente estressadas, ao invés disso, ocorre redução desses açúcares (171,6 mg/g MS). Esse comportamento não é visto nas sementes com 3mm secas após estresse osmótico, com pouca variação nos níveis de carboidratos solúveis em relação a mesma semente que foi apenas seca.

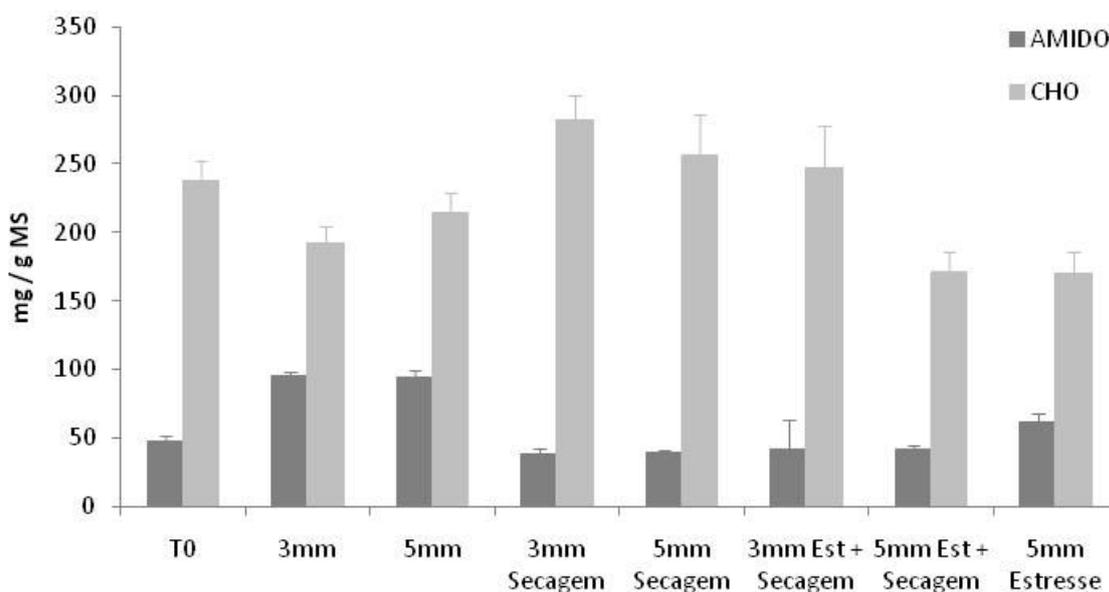


FIGURA 4. Quantificação de amido e de carboidratos solúveis totais nas radículas de sementes maduras de *C. echinata*. Testemunha (T0); 3mm de raiz primária (3mm); 5mm de raiz primária (5mm); sementes secas até 10% (Secagem); sementes secas após estresse osmótico (Est + Secagem); sementes após estresse osmótico (Estresse).

As sementes com 5 mm submetidas apenas a estresse não apresentam grandes diferenças nos níveis de açúcares solúveis quando comparadas a mesma semente úmida (170,5 mg/g MS), porém em níveis bem menores comparadas com as que sofreram apenas secagem. Além disso, o estresse osmótico proporcionou redução da quantidade de amido nas radículas (62,0 mg/g MS).

Analisando o perfil dos açúcares solúveis através de cromatografia líquida de alta resolução (Tabela 6), são observadas na semente madura de *C. echinata* proporções semelhantes de ciclitóis e de sacarose (43% em média) com baixas proporções de glucose (10,2%) e níveis mínimos de estaquiose e rafinose (1% em média).

Enquanto o processo de germinação avança, observado nas sementes com 3 e 5 mm de raiz primária, as proporções de ciclitóis oscilam levemente para baixo, enquanto as proporções de sacarose tem queda acentuada em contrapartida ao aumento de glucose (em maior proporção) e frutose. Já os níveis de rafinose e estaquiose se tornam mínimos e indetectáveis (Tabela 6).

Quando comparadas sementes de 3mm de raiz primária úmidas e as secas até 10% ocorre variação negativa nas proporções de ciclitóis (44,0 para 32,7%), e leve aumento de rafinose (0,1 para 1,2%), enquanto as proporções de sacarose tem aumento acentuado (37,2 para 53,7%) com redução nas de glucose. Observando as sementes úmidas e secas com 5mm o comportamento observado é semelhante, aumento de sacarose e redução de glicose, porém com pouca variação nas proporções de ciclitóis e rafinose, ambas, oscilando para baixo.

Comparadas a testemunha e sementes secas de 3mm, é notada apenas variação negativa na proporção de ciclitóis (43,1 para 32,7%), e positiva nas de sacarose (43,3 para 53,7%). Nas sementes secas com 5mm as diferenças nas proporções desses açúcares com a testemunha são ainda menores (Tabela 6).

TABELA 6. Variações na composição de carboidratos solúveis em radículas de sementes maduras de *C. echinata*, após germinação iniciada, estresse osmótico e/ou após secagem em atmosfera controlada (cerca de 10% em base úmida), por 3 dias.

Tratamento	Ciclitóis (%)	Glucose (%)	Frutose (%)	Sacarose (%)	Rafinose (%)	Estaquiose (%)
Testemunha	43,1	10,2	1,5	43,3	1,1	0,9
3 mm	44,0	17,4	1,2	37,2	0,1	0,0
5 mm	39,0	33,7	2,3	24,9	0,0	0,0
3 mm Secagem	32,7	11,6	0,6	53,7	1,2	0,2
5 mm Secagem	37,0	14,8	0,4	47,0	0,6	0,0
3 mm Est + Secagem	49,3	9,5	1,1	39,0	0,7	0,4
5 mm Est + Secagem	45,5	13,7	0,5	40,0	0,3	0,0
5 mm Estresse	40,9	34,2	1,3	23,5	0,1	0,1

Variações acentuadas são observadas quando comparadas as sementes com 3mm secas e as que passaram pelo estresse osmótico, com maiores proporções de ciclitóis (32,7 e 49,3%, respectivamente), oscilando os níveis de rafinose para baixo (1,2 e 0,7%, respectivamente). Enquanto a sacarose apresenta proporções mais baixas (53,7 e 39,0%).

Comportamento semelhante é visto quando comparadas as sementes com 5mm secas e as que passaram por estresse (Tabela 6), observando maiores proporções de ciclitóis (37 e 45,5%, respectivamente), e menores de sacarose (47 e 40%), novamente com menor amplitude de variações do que ocorre nas sementes com 3mm.

Não se observa alterações nas proporções dos açúcares quando observadas as sementes com 5mm e as mesmas após estresse osmótico (Tabela 6), apesar disso, os níveis de ciclitóis aumentaram quando as sementes foram secas após estresse (45,5%), o que não ocorreu quando foram apenas secas (37%).

A análise de ciclitóis por CG-EM (Figura 5) permitiu observar que enquanto o processo de germinação avança, ocorre aumento nas proporções de pinitol, galactopinitol A e B, seguido de aumento acentuado de *chiro*-inositol e principalmente de *myo*-inositol, sendo que as radículas das sementes com 5 mm de raiz primária apresentam proporções ainda maiores da maioria desses açúcares.

Quando sementes com 3 mm são secas até 10% de umidade, se observa oscilações negativas de galactopinitol A e de *myo*-inositol, enquanto há leve aumento de *chiro*-inositol, porém, todos ainda em proporções mais elevadas que a testemunha. Nas sementes com 5 mm a secagem provoca alterações mais visíveis, como a queda acentuada de galactopinitol A e B para níveis próximos da testemunha. Além disso, há queda acentuada de *myo*-inositol, de maior amplitude que a vista entre as sementes de 3 mm úmidas e após secagem, entretanto a proporção de *myo*-inositol nas sementes com 5 mm secas ainda é maior do encontrado nas sementes com 3 mm secas. Já o estresse osmótico provocou alteração ainda maior de *myo*-inositol nas sementes de 5 mm, porém reduzindo os níveis de galactopinitol A e B (Figura 5).

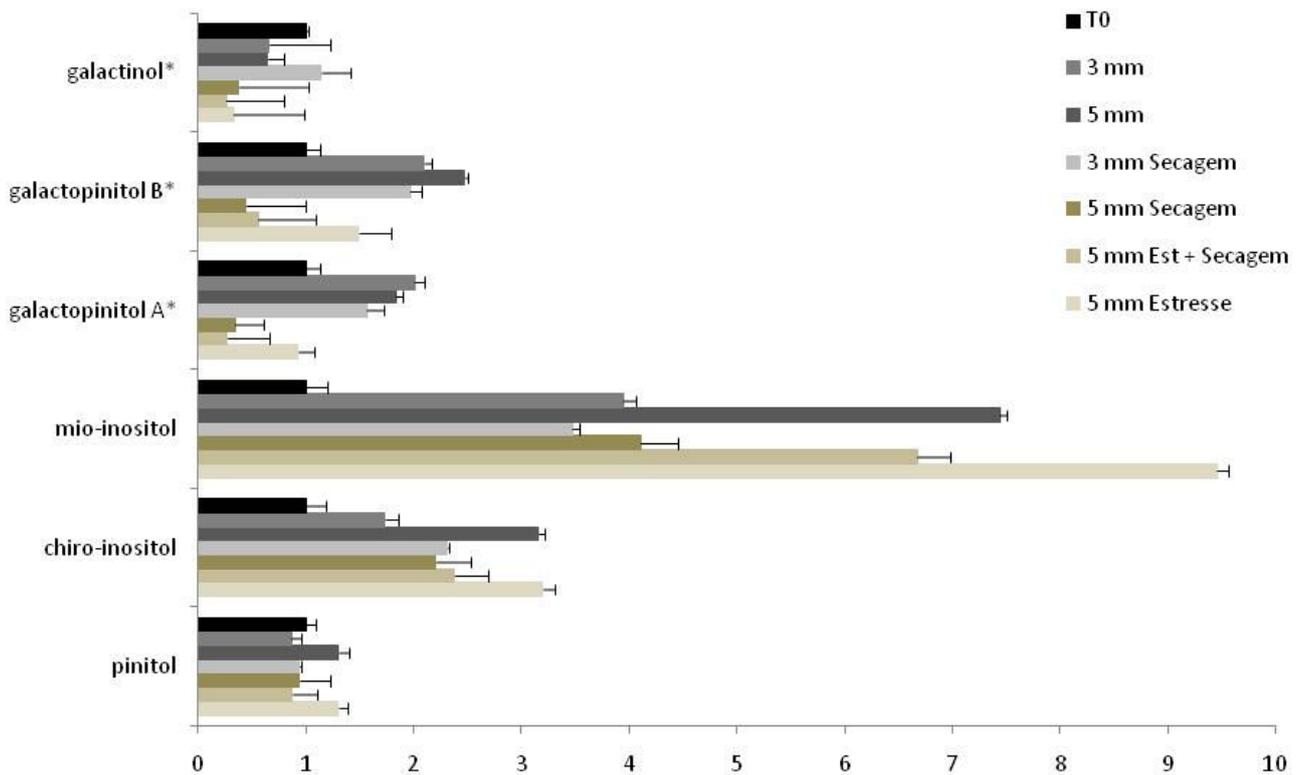


FIGURA 5. Quantidade relativa de ciclítóis (pinitol, *chiro*-inositol, *myo*-inositol, galactopinitol A e B e galactinol), em radículas de sementes maduras de *C. echinata*, após germinação iniciada, estresse osmótico e/ou após secagem em atmosfera controlada (cerca de 10% em base úmida), por 3 dias. Os dados foram normalizados a partir da resposta calculada da testemunha (=1). *Os valores encontrados provavelmente são de Galactopinitol A e B e galactinol.

DISCUSSÃO

Indução de tolerância à dessecação na semente imatura

O lote de sementes imaturas (43 DAA) de 2007 mostra características já observadas para esse estágio em trabalhos anteriores (Borges et al., 2005; Leduc, 2007). Porém, ao contrário do esperado, a semente sobreviveu ao tratamento de secagem até 12%, indicando que esse lote estaria fisiologicamente mais maduro do que o utilizado por Leduc (2007), de idade semelhante (45 DAA) e dessa forma com o processo de aquisição de tolerância à dessecação já iniciado. Outra observação nesse sentido é a obtenção de plântulas normais em valores próximos à testemunha (Tabela 1) nas sementes secas, que pode indicar também o vigor elevado dessas sementes e, por conseguinte, estágio de maturação mais avançado.

Em relação ao tratamento de estresse osmótico, os resultados foram os esperados, com valores de germinação semelhante à testemunha (Tabela 1). Já para o tratamento de secagem

após o estresse osmótico, a secagem reduziu a umidade para 7,4%, valor que deve estar ligado à queda de germinação ocorrida (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Leduc (2007), que, ao secar sementes de 55 DAA até umidades de 12 e 7%, observou quedas na germinação, de 78% para 28%. Esses resultados, somados aos obtidos e descritos neste capítulo, sugerem que o processo de aquisição de tolerância à dessecação das sementes de *C. echinata* pode não ser gradativo e contínuo, mas seja produto de etapas definidas, passando de uma fase intolerante até a de total tolerância à dessecação na semente madura, hipótese já feita por Walters (2000) para o processo de tolerância à dessecação em sementes.

O outro lote de sementes com 43 DAA, coletadas em 2008, apresentaram umidade e germinação elevadas, mas com baixos valores para IVG, plântulas normais e de matéria seca em relação ao obtido no ano anterior (Tabela 1); entretanto em relação apenas a matéria seca, pode haver grande variação entre os estádios de maturação das sementes de pau-brasil quando observada ao longo dos anos (Tabela 9). Dessa forma, os resultados do presente trabalho reforçam a idéia de que a maturação das sementes de *C. echinata* (e provavelmente o processo de aquisição de tolerância à dessecação) pode sofrer influência das condições ambientais em que a planta-mãe está submetida (Daws et al., 2004).

Além disso, os resultados do observado nas sementes de 43 DAA de 2007, em 2008 o tratamento de secagem ocasionou a perda completa da germinação. Declínio elevado da germinação dessas sementes após serem secas até baixos níveis de umidade era esperado para esse estágio (Leduc, 2007). Contudo, as sementes que sofreram estresse osmótico já se apresentaram prejudicadas, com queda acentuada da germinação (31%), e com a secagem subsequente, a germinação foi reduzida a zero (Tabela 1). Analisando esses resultados, o lote de sementes imaturas de 2008 provavelmente se encontrava fisiologicamente mais imaturo que o lote de 2007 e do utilizado por Leduc (2007), não suportando sequer leve desidratação pelo estresse osmótico, o que não proporcionou a indução de processo de tolerância à dessecação esperado.

As sementes consideradas mais maduras de 2008 apresentavam não apenas características visuais do tegumento de sementes entre 50 e 55 DAA, como relatado por Borges (2007), mas também valores de umidade, de matéria seca e de IVG indicando que esse lote formado estava fisiologicamente mais maduro que o de 43 DAA do mesmo ano (Tabela 1).

TABELA 9. Teor de água (% em base úmida), matéria seca (g.semente⁻¹), germinação (%) e plântulas normais (%) de sementes de *C. echinata* em diferentes épocas de maturação (DAA - dias após antese), coletadas em diferentes anos no arboreto experimental de Mogi-Guaçu/SP.

Autor	Ano	DAA	Teor de água (% bu)	Matéria Seca (g.s ⁻¹)	Germinação (%)	Plântulas Normais (%)
Borges et al. (2005)	2001	32	76,8	0,011	0	0
		40	75,4	0,033	40	0
		48	67,1	0,010	90	0
		52	60,4	0,141	100	0
		59	44,7	0,250	97	90
	2002	40	72,2	0,010	2	0
		50	69,8	0,098	70	10
		60	45,8	0,157	100	50
		65	30,6	0,171	100	80
Mello & Barbedo (2007)	2003	rd*	20,9	0,278	91	73
Leduc (2007)	2004	45	60,0	-	88	45
		55	55,0	-	100	75
	2005	45	60,0	0,243	98	70
		55	50,0	0,310	98	78
		65	22,0	0,310	98	88
Mello (2008)	2006	rd*	16,2	0,237	90	85
Silva (2010)*¹	2007	43	67,7	0,170	97	53
		60	13,0	0,293	86	72
	2008	43	70,0	0,101	87	18
		50-55	57,1	0,203	91	80
		59	9,6	0,308	80	64

* Sementes maduras coletadas recém dispersas, sem marcação prévia de inflorescências.

*¹ Dados apresentados neste capítulo.

Quando úmidas essas sementes também apresentaram germinação e formação de plântulas normais elevadas, com redução nesses parâmetros após serem secas abaixo de 10% de umidade, porém não igualmente às sementes de 43 DAA do mesmo ano, mas curiosamente, com resultados semelhantes aos observados com a semente de 43 DAA de 2007 secas até 12% umidade (Tabela 1), indicando que essas sementes já se apresentavam tolerantes à dessecação no momento da coleta. Contudo, esse lote de sementes também apresentou queda na germinação após estresse osmótico, e após subsequente secagem, os valores de germinação e de plântulas normais reduziram ainda mais (Tabela 1), resultados semelhantes com sementes mais maduras (55 e 65 DAA) foram obtidos por Leduc (2007), levando a supor que a perda de umidade de forma lenta em uma semente com o processo de

tolerância já iniciado, pode prejudicá-lo (Pammenter *et al* 1998).. Outra questão intrigante é o comportamento fisiológico na germinação e formação de plântulas normais semelhantes entre este lote e o lote de 2007, porém, com umidades iniciais diferentes (Tabela 1).

Restabelecimento de tolerância à dessecação na semente madura

As sementes maduras (59 DAA) coletadas em 2007 apresentam características normalmente observadas para essa idade (Borges *et al.*, 2005; Leduc, 2007; Lamarca *et al.*, 2009), umidade baixa, potenciais hídricos bastante reduzidos, e matéria seca elevada (Tabela 5). Os baixos valores de germinação (49%) e de plântulas normais (24%) estão relacionados ao processo de deterioração que estas sementes sofreram pelo armazenamento por 17 meses a -20°C , metodologia mais eficaz para a manutenção da viabilidade das sementes maduras de *C. echinata* por longos períodos (Hellman *et al.*, 2006).

Sementes com 3 mm de comprimento de raiz primária foram selecionadas após mostrar a manutenção da tolerância à dessecação ao serem secas até 10% de umidade. Da mesma maneira, sementes com 5 mm de comprimento de raiz primária foram selecionadas por terem perdido essa tolerância nas mesmas situações (Capítulo 1), sendo o alvo para o tratamento de estresse osmótico a -3MPa na tentativa de restabelecer a tolerância à dessecação, da mesma forma como foi possível induzir esse processo na semente imatura (Leduc, 2007).

O ganho de umidade e redução nos potenciais hídricos das sementes com 3 e 5 milímetros de comprimento de raiz primária (Tabela 5), são devido a alta velocidade de embebição dessas sementes (Lamarca *et al.*, 2009), e a pouca diferença temporal para se obter os dois comprimentos. Porém, é interessante notar que mesmo muito hidratadas o potencial hídrico apenas do eixo embrionário se mantêm consideravelmente baixo para ambos os comprimentos ($-3,6\text{MPa}$), sinalizando que o caminho da água é preferencialmente no sentido do eixo embrionário.

Ao invés do esperado, as sementes com 3 mm de raiz primária secas até 10% já se mostraram bastante sensíveis a dessecação, com baixa taxa de sobrevivência (29%) e zero de plântulas normais, sinalizando que uma maior deterioração do lote já havia ocorrido (Capítulo 1). Dessa forma, sementes secas com 5 mm de raiz primária já estavam completamente sensíveis a dessecação, não retomando o processo germinativo após reidratação (Tabela 5).

O estresse osmótico não foi capaz de retomar a tolerância à dessecação nas sementes com 5 mm de raiz primária (Tabela 5), talvez pelo fato da solução de incubação de PEG a -3 MPa não ter reduzido suficientemente o teor de água da semente, apenas 6,9%, ao invés de 10% como proposto por Leduc (2007), para sementes imaturas. No desenvolvimento de embriões de trigo, a tolerância à dessecação foi totalmente induzida após estresse causar a perda de 8,5% em relação ao peso fresco (Black et al., 1999), já em sementes germinantes de *M. truncatula*, o estresse osmótico de -1,7 MPa proporcionou restabelecimento de tolerância à dessecação com decréscimo de apenas 5,2% de umidade (Buitink et al., 2003), evidenciando que a magnitude do estresse osmótico que pode causar algum efeito fisiológico é variável entre as espécies, e parece ter sido insuficiente nas sementes com 5 mm de raiz primária de pau-brasil.

Além disso, mesmo sementes com 3 mm de raiz primária também não obtiveram nenhum ganho na retomada da germinação após o estresse osmótico, comportamento já observado para sementes germinantes de *Medicago truncatula* em situações semelhantes (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005), devido ao estresse osmótico insuficiente como discutido anteriormente, apesar de não ter sido realizado apenas o tratamento de estresse osmótico nas sementes com 3 mm de raiz primária.

Análises bioquímicas na semente imatura

Conforme esperado, os níveis de amido e de carboidratos solúveis totais aparecem maiores no lote de sementes imaturas 50-55 DAA, do que no lote de 43 DAA do mesmo ano (Figura 1 D), fator ligado ao maior tempo de maturação e já observado por Borges et al. (2005) e Leduc (2007) para eixo embrionário e cotilédones na mesma espécie em estádios semelhantes. Além disso, os níveis de amido nas radículas do lote imaturo de 2007 se apresentam maior que o de mesma idade em 2008, com níveis de açúcares solúveis totais bem próximos, o que concorda com a hipótese que sementes desse lote estariam mais maduras que as sementes de 43 DAA de 2008, porém em níveis bem inferiores de açúcares solúveis totais que o lote de 50-55 DAA (Figura 1 D).

É possível observar também que a secagem proporcionou grande queda nos níveis de amido nas radículas das sementes imaturas de 2007 (Figura 1, A). Esse resultado poderia indicar hidrólise de amido que favoreceria a osmoregulação das células para suportar a secagem, fato também ligado ao pequeno aumento dos carboidratos solúveis totais nas mesmas sementes, porém sem favorecer a viabilidade dessas sementes (Tabela 1).

O tratamento de estresse osmótico não provocou alterações significativas nas quantidades de carboidratos solúveis totais nas radículas das sementes, comportamento relatado por Leduc (2007) em eixos embrionários de sementes de *C. echinata*, sendo que o aumento observado nos níveis de carboidratos solúveis após estresse osmótico teria relação com a aquisição de tolerância à dessecação dessas sementes. Entretanto esses níveis caíram ainda mais no tratamento de secagem após o estresse osmótico em todos os lotes (Figura 1, A, B e C), não favorecendo a manutenção da viabilidade (Tabela 1). Além disso, a queda de carboidratos solúveis totais nas radículas das sementes de 43 DAA de 2008 após secagem reduziu em níveis semelhantes às radículas do ano anterior (Figuras 1, A e B), porém, obtiveram diferenças marcantes na germinação (Tabela 1).

O perfil dos açúcares solúveis através de cromatografia líquida de alta resolução (Tabelas 2, 3 e 4), mostram resultados semelhantes aos obtidos em eixos embrionários de *C. echinata* em trabalhos anteriores (Borges et al., 2005; Leduc, 2007). As altas proporções de oligossacarídeos da série da rafinose (ROS) encontradas nas sementes de 43 DAA de 2008 (Tabela 3) corroboram a hipótese deste lote ser mais imaturo que os outros avaliados. Analisando eixos embrionários de pau-brasil durante a maturação, Leduc (2007) constatou a diminuição de rafinose e estaquiose com o amadurecimento da semente, evidenciando que esses açúcares não atuam sobre a tolerância à dessecação nas sementes de *C. echinata*, sendo substituídos pelos ciclitóis, considerados responsáveis por esse papel quando os ROS não estão evidenciados (Obendorf, 1997; Borges et al., 2006).

Já os tratamentos que envolviam secagens, em todos os lotes, também levaram a diminuição dos níveis de ciclitóis e conseguinte aumento dos níveis de estaquiose e rafinose (Tabelas 2, 3 e 4). Essa relação entre as mudanças dos níveis desses açúcares pode estar ligada ao fato de que alguns ciclitóis são precursores naturais desses oligossacarídeos, além disso, rafinose e estaquiose podem estar envolvidos na proteção de membranas quando estas estão secas, da mesma forma que a sacarose (Koster, 1991; Obendorf, 1997; Peterbauer & Richter, 2001), entretanto as maiores proporções desses açúcares foram encontradas exatamente no único lote de sementes que não apresentou germinação quando seca (Tabela 1). Além disso, outros trabalhos com sementes de *C. echinata* mostraram apenas traços desses oligossacarídeos (Borges et al., 2006; Garcia et al., 2006), relacionando o processo de tolerância à dessecação na semente desta espécie principalmente com os ciclitóis, que nestas análises são encontrados em grandes proporções, porém sem explicar as variações encontradas na germinação dessas sementes após as sementes serem secas (Tabela 1).

A análise de ciclitóis por GC-MS permitiu identificar alguns açúcares deste grupo que estavam presentes nas radículas das sementes. Esses açúcares estão presentes na maturação de algumas sementes e estariam contribuindo na tolerância à dessecação de maneira semelhante aos oligossacarídeos da série da rafinose (Obendorf, 1997; Borges et al., 2006).

Acúmulo de ciclitóis é observado durante o desenvolvimento de sementes e após estresse hídrico (Horbowicz & Obendorf, 1994; Pinheiro et al., 2005), com o galactinol participando na síntese de rafinose (Saravitz et al., 1987; Liu et al., 1995) além de também atuar na proteção contra estresse oxidativo em plantas (Nishizawa et al., 2008), como recentemente descoberto. Nas sementes imaturas de 2007 esse acúmulo de galactinol ocorreu independente do tratamento realizado (Figura 2, A), porém as proporções de rafinose só aumentaram quando as sementes foram secas após estresse osmótico (Tabela 2), que resultou em queda acentuada de germinação (Tabela 1), sustentando o discutido anteriormente sobre o papel dos ROS nas sementes de pau-brasil. Entretanto, ação benéfica dos ciclitóis pode ter tido efeito quando estas sementes foram secas apenas até 12%, quando ocorreu acúmulo de galactinol e de *myo*-inositol (Figura 2, A), este que também poderia estar inibindo a via de síntese de rafinose (Hitz et al., 2002) e assim estaria com sua concentração elevada nas células.

Nas sementes de 43 DAA de 2007, não houve grandes alterações nos níveis de galactinol, mesmo com aumento das proporções de *myo*-inositol nas sementes secas (Figura 2, B), que é precursor de galactinol (Peterbauer & Richter, 2001), e que explicaria a alta sensibilidade desse lote à perda de água (Tabela 1). Além disso, as altas proporções de galactopinitol A e B encontradas, junto com *myo*-inositol, estariam relacionadas à síntese de rafinose e estaquiose por outra via de síntese (Peterbauer & Richter, 2001), e neste caso sem promover qualquer proteção.

Praticamente não houve alterações nas proporções de ciclitóis analisados individualmente nas sementes de 50-55 DAA (Figura 2, C), e dessa forma, a sensibilidade das sementes secas após estresse (Tabela 1) pode estar ligada a redução dos níveis de todos os ciclitóis como vista na cromatografia líquida (Tabela 4).

A análise das testemunhas dos três lotes de sementes imaturas não ajuda a elucidar as diferenças encontradas (Figura 3). Maiores proporções de pinitol, galactopinitol A e B eram esperadas quanto maior o tempo de maturação da semente de pau-brasil, sendo que estes dois últimos juntos com a sacarose, formam as maiores reservas de carboidratos solúveis na semente madura (Borges et al., 2006), entretanto, o lote de 43 DAA de 2007 é o que

apresenta a maior proporção de pinitol, oposto ao encontrado no lote de 50-55 DAA, apesar deste ter proporções mais elevadas de galactopinitol A e B. Além disso, os níveis de galactinol são semelhantes nas sementes de 43 DAA e 50-55 DAA coletadas no mesmo ano, porém a sensibilidade a secagem dos dois lotes foram completamente diferentes. Interessante é notar que apesar das respostas fisiológicas semelhantes entre este lote e o de sementes imaturas de 2007, a quantidade relativa de cada ciclitól encontrado é oposta entre eles (Figura 3).

Análises bioquímicas na semente madura

Os níveis de carboidratos solúveis totais e de amido encontrados nas radículas das sementes maduras de *C. echinata* são elevados (Figura 4), além disso, o perfil dos açúcares solúveis apresenta valores semelhantes aos encontrados em outros trabalhos utilizando a espécie (Borges et al., 2006; Leduc, 2007) diferenças encontradas podem estar relacionada com a variação natural ocorrente no desenvolvimento da semente, assim como já ocorre no conteúdo de matéria seca (Tabela 9), e por esses trabalhos terem realizadas as análises com o eixo embrionário inteiro. Além disso, altas concentrações de carboidratos solúveis foram encontradas em eixos embrionários de sementes de pau-brasil armazenadas congeladas por 30 e 90 dias, concomitante a solubilização de amido (Mello, 2008; Hellman et al., 2006), exatamente o que é observado na semente madura coletada em 2007 e armazenada por 17 meses.

Com a embebição e conseqüente início da germinação, os tecidos embrionários necessitam de energia de rápida mobilização, o que poderia explicar a diminuição da quantidade de açúcares solúveis nas sementes úmidas de 3 e 5 mm (Figura 4), além disso, pode ser evidenciado a degradação da sacarose e do aparente consumo total dos oligossacarídeos da série rafinose (ROS - rafinose e estaquiase), na formação de monossacarídeos como glucose e frutose (Tabela 6). Em sementes germinantes de soja, Kuo et al. (1990) associaram a conversão de óleos e oligossacarídeos solúveis, como sacarose e rafinose, em monossacarídeos, na rápida expansão do eixo embrionário, sendo que as maiores modificações encontradas no teor desses açúcares neste trabalho foram nas sementes com o processo de germinação mais avançado, com 5 mm de raiz primária (Tabela 6).

Somado a isso, as modificações vista nos ciclitóis, principalmente no aumento das proporções de galactopinitol A e B e *chiro*-inositol (Figura 5), devem estar relacionadas à mobilização desses açúcares para o início do processo de germinação. Já que a perda de ROS

e de ciclitóis nos eixos precedem a germinação de varias sementes de leguminosas (Gorecki et al., 1997). Além disso, Borges et al. (2006) relacionaram o aumento significativo de galactosil ciclitóis (como pinitol e ciceritol, entre outros) no final da fase de maturação das sementes de *C. echinata* com a aquisição de tolerância à dessecação e também como reserva energética para o crescimento das mudas, sendo que o aumento acentuado de *myo*-inositol (Figura 5), precursor da maioria dos ciclitóis e aparente regulador dessa via (Obendorf 1997, Hitz et al., 2002), evidencia que a via biossintética desses açúcares está em funcionamento.

Interessante é a observação da quantidade de amido que praticamente dobrou enquanto o processo de germinação avança (Figura 4). Thind & Malik (1995) observaram em sementes de *Abelmoschus esculentus* que durante as primeiras 72 horas de germinação ocorreu acúmulo de amido no eixo embrionário, concomitante a atividade do ciclo do glicoxilato. Stone & Gifford (1999) verificaram durante a germinação de sementes de *Pinus taeda*, que houve decréscimo no teor de açúcares solúveis, coincidente com a queda nos teores de triacilgliceróis, esses resultados indicam a provável conversão de lipídios em carboidratos (Lehninger, 1986), que segundo os autores, seria uma estratégia das sementes para acumular energia, preparando o eixo embrionário para o estabelecimento da plântula. Nas sementes de pau-brasil com 3 e 5 mm, é tanto observado níveis elevados e semelhantes de amido quanto o de plântulas normais (Tabela 5).

Quando estas sementes são secas até 10% de umidade o comportamento observado entre carboidratos solúveis e amido é oposto ao discutido anteriormente (Figura 4), com provável degradação de amido para formação principalmente de sacarose, que tem aumento acentuado nos dois tratamentos (Tabela 6), provavelmente como estratégia para manutenção de membranas no estado seco (Buitink et al., 2003; Berjak et al., 2007), entretanto é observada germinação apenas nas sementes secas com 3 mm (Tabela 5). Além disso, o fato de ter novamente encontrado níveis de rafinose e estaquiose nas sementes secas, deve estar relacionada com a diminuição das proporções de ciclitóis (Tabela 6), sendo alguns precursores naturais desse oligossacarídeo (Peterbauer & Richter, 2001), visto de maneira mais evidenciada nas sementes secas de 3 mm.

Ciclitóis como *myo*-inositol e galactinol estão presentes na maturação de algumas sementes e estariam contribuindo na tolerância à dessecação de maneira semelhante aos oligossacarídeos da série da rafinose (Obendorf, 1997; Borges et al., 2006), entretanto nas sementes secas com 5 mm esses níveis não sofreram grandes modificações, e, mesmo com proporções de sacarose mais elevadas que a semente de 3 mm, não suportaram a desidratação

(Tabela 5). Também é visto que o efeito da secagem sobre os tipo de ciclitóis nos dois comprimentos de raiz primária é a mesma (Figura 5), e, mesmo com maior amplitude de variação nas sementes com 5 mm, as proporções encontradas são semelhantes à testemunha ou a semente seca de 3 mm, o que dificulta a correlação desses açúcares com a tolerância à dessecação na semente germinante.

Como discutido na análise fisiológica das sementes, o estresse osmótico não promoveu o efeito desejado nas sementes de 5 mm como o aumento na concentração de carboidratos solúveis totais, evento que poderia levar a aquisição de tolerância à dessecação pelas sementes imaturas (Leduc, 2007), não ocorrendo modificações nem mesmo nas proporções de sacarose e de ciclitóis quando comparadas com as sementes úmidas (Tabela 6), exceto pelo grande aumento de *myo*-inositol (Figura 5), evidenciando que o estresse osmótico a -3 MPa foi leve, sendo assim, a perda de viabilidade das sementes com 5 mm secas após estresse não gera surpresa, além disso os níveis de carboidratos solúveis nestas sementes foi ainda menor comparada as mesmas ainda úmidas (Figura 4).

Nas sementes com 3 mm secas após estresse também não houve variações nos carboidratos solúveis, sendo provável o fraco efeito osmótico sobre as sementes, porém esses níveis se mantiveram semelhantes as sementes úmidas e poderiam explicar porque não houve algum ganho de tolerância, como observado em outros trabalhos em situações semelhantes (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005).

Entretanto, efeito osmótico é notado sobre as proporções e o perfil de ciclitóis quando as sementes estressadas são posteriormente secas (Tabela 6 e Figura 5), e dessa maneira, sugere que um estresse osmótico mais elevado poderia resultar em modificações mais contundentes sobre os processos metabólicos das sementes, principalmente nesses açúcares, podendo sinalizar uma retomada do processo de tolerância à dessecação na semente germinante.

Analisando o comportamento à secagem dos lotes de sementes intolerantes, sementes imaturas de 43 DAA de 2008, e as sementes maduras com 5 mm de raiz primária, é observado que as duas tem estratégia de aumentar as proporções de sacarose (Tabelas 3 e 6), porém, a semente imatura parece preferir o consumo de ciclitóis para tal objetivo (Tabela 3), enquanto na semente madura esse açúcar viria do consumo de amido (Figura 4). Apesar da diferença no sucesso dessa produção, acréscimo de apenas 7% de sacarose nas sementes imaturas e de cerca de 20% nas sementes maduras, provavelmente ligado à maturidade dos

processos metabólicos existentes nos estádios de desenvolvimento distintos. Em ambas esse acréscimo foi insuficiente para tolerar a secagem até 10% de umidade, ou ainda, outros mecanismos não teriam sido atingidos, ou já irrevogavelmente perdidos nesses estádios, não permitindo maior resistência à desidratação dessas sementes.

Quando observado os lotes que apresentaram algum grau de tolerância, sementes imaturas de 43 DAA de 2007, sementes imaturas de 50-55 DAA de 2008, sementes maduras de 59 DAA de 2007 e sementes maduras com 3 mm de raiz primária. Nas sementes imaturas de 2007 a estratégia também parece ser a de aumento nas proporções de sacarose durante a secagem (14%, Tabela 2), metabolizando ciclitóis, com aparente papel também de galactinol e *myo*-inositol (Figura 2, A), porém, esse comportamento não é evidenciado nas também imaturas de 50-55 DAA de 2008, quando ocorre pequeno acréscimo nas proporções de sacarose (5%, Tabela 4), reduzindo também as proporções de ciclitóis sem ocorrer variação qualitativa importante destes (Figura 2, C). Já a semente madura e seca (59 DAA), apresenta proporções semelhantes entre ciclitóis e sacarose (43% em média, Tabela 6, Testemunha), sendo que os níveis de ciclitóis pouco se alteram com o início da germinação (Tabela 6, 3 mm), porém quando secas, sementes tolerantes de 3 mm de raiz primária tem decréscimo das proporções de ciclitóis e na quantidade de amido, com provável favorecimento da formação de sacarose (15% de acréscimo, Tabela 6).

CONCLUSÃO

Os dados apresentados com as sementes imaturas mostram que os mecanismos do processo de tolerância a dessecação nas sementes de *C. echinata* são influenciados pelo ambiente em que as matrizes estão submetidas. Já a manutenção do processo de tolerância a dessecação na semente madura de pau-brasil está ligada ao avanço do processo de germinação.

O estresse osmótico de -3 MPa nas sementes maduras germinantes de pau-brasil não é suficiente para restabelecer tolerância à dessecação.

A via biossintética dos ciclitóis e a dos oligossacarídeos da série da rafinose têm relação com o processo de tolerância à dessecação nas sementes de pau-brasil.

REFERÊNCIAS

- ACKERSON, R.C. 1984a. Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*. 35: 403-413.
- ACKERSON, R.C. 1984b. Abscisic acid and precocious germination in soybeans. *Journal of Experimental Botany*. 35: 414-421.
- ALPERT, P. 2005. Sharing the secrets of life without water. *In: Drying without dying: The comparative mechanisms and evolution of desiccation tolerance in animals, microbes, and plants*. *Integr. Comp. Biol.* 45: 683-684.
- AMARAL, L.I.V., GASPAR, M., COSTA, P.M.F., AIDAR, M.P.M., & BUCKERIDGE, M.S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34(4): 425-431.
- BARBEDO, C.J. & BILIA, D.A.C. 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Scientia Agricola* 55(especial): 121-125.
- BARBEDO, C.J., BILIA, D.A.C. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica*. 25: 431-439.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botanica Brasílica* 12: 145-164.
- BERJAK, P. & PAMMENTER, N.W. 2001. Seed recalcitrance - current perspectives. *South African Journal of Botany* 67: 79-89.
- BERJAK, P. & PAMMENTER, N.W. 2004. Recalcitrant seeds. *In: Benech-Arnold RL, Sa'nchez RA, eds. Handbook of seed physiology: applications to agriculture*. New York: Haworth Press, 305-345.
- BERJAK, P., FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W. 2007. Seed desiccation tolerance mechanisms. *In: Jenks M, ed., Plant desiccation tolerance*. Ames, IO: Blackwell Publishing, in press.
- BERJAK, P. & PAMMENTER, N.W. 2008. Review: From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. *Annals of Botany* 101: 213-228.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*, 2nd edn. New York: Plenum Press.
- BLACK, M., CORBINEAU, F., GEE, H. & CÔME, D. 1999. Water content, raffinose and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology*. 120: 463-471.
- BORGES, I.F. 2007. Maturação de sementes de *Caesalpinia echinata* LAM. (pau-brasil) em bosques plantados no Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- BORGES, I.F., GIUDICE, J.D., BILIA, D.A.C., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. & BARBEDO, C.J. 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered

- Leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. Brazilian Archives of Biology and Technology 48: 851-861.
- BORGES, I.F., BARBEDO, C.J., RICHTER, A.A. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2006. Variation in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) Brazilian Journal of Plant Physiology. 18(4): 475-482.
- BRADFORD, K.J. & CHANDLER, P.M. 1992. Expression of 'dehydrin-like' proteins in embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza sativa* during dehydration. Plant Physiology 99, 488-94.
- BRASIL 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. SNDA/DNDV/CLAV, Brasília, p.365.
- BRAY, E.A., 1993. Molecular responses to water deficit. Plant Physiology 103: 1035–1040.
- BRUGGINK, G.T., TOORN, P.V.T. 1995. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. Seed Science Research. Wallington, v. 9, n. 1, p. 49-53.
- BUITINK, J., BENIT, L., VU, SATOUR, P. & LEPRINCE O. 2003. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaerte seeds. Seed Science Research. 13: 273-286.
- CHANDLER, P.M. & ROBERTSON, M. 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 45: 113-41.
- CHEN, K., MILLER, A.N., PATTERSON, G.W., COHEN, J.D. 1988. A rapid and simple procedure for purification of indole-3-acetic acid prior to GC-SIM-MS analysis. Plant Physiology, v.86, p.822-825.
- DAWS, M.I., LYDALL, E., CHMIELARZ, P., LEPRINCE, O., MATTHEWS, S., THANOS, C.A., PRITCHARD, H.W. 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. New Phytologist 162: 157–166.
- DAWS, M.I., CLELAND, H., CHMIELARZ, P., GORIAN, F., LEPRINCE, O., MULLINS, C.E. 2006. Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? Functional Plant Biology 33: 59–66.
- DE CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J., HILHORST, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In: Germinação, do básico ao aplicado. Orgs: Ferreira, A.G., Borguetti, F. Editora Artmed, Porto Alegre.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28: 350-356.
- FARIA, J.M.R., BUITINK, J., VAN LAMMEREN, A.A.M. & HILHORST, H.W.M. 2005. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. Journal of Experimental Botany. 56: 2119-2130.

- FARRANT, J.M., BAILLY, C., LEYMARIE, J., HAMMAN, B., CÔME, D. & CORBINEAU, F. 2004. Wheat seedlings as a model to understand desiccation tolerance and sensitivity. *Physiologia Plantarum*. 120: 563-574.
- GARCIA, I.S., SOUZA, A., BARBEDO, C.J., DIETRICH, S.M.C., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L., 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology*. 66(2B):739-745.
- GÓRECKI, R.J., PIOTROWICZ-CIESLAK, A.I., LAHUTA, L.B., OBENDORF, R.L. 1997. Soluble carbohydrates in desiccation tolerance of yellow lupin seeds during maturation and germination. *Seed Sci. Res.* Vol 7:107-115.
- HAN, B., BERJAK, P., PAMMENTER, N., FARRANT, J., KERMODE, A. R. 1997. The recalcitrant plant species, *Castanospermum austral* and *Trichilia dregeana*, differ in their ability to produce dehydrin-related polypeptides during seed maturation and in response to ABA or water-deficit-related stresses. *Journal of Experimental Botany* 314: 1717-17.
- HELLMANN, M.E., MELLO, J.I.O., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. & BARBEDO, C.J. 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 93-101.
- HITZ, W.D., CARLSON, T.J., KERR, P.S., SEBASTIAN, S.A. 2002. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiol* 128: 650–660
- HORBOWICZ, M., OBENDORF, R.L. 1994. Seed desiccation tolerance and storability: dependence of flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols. *Review and survey. Seed Sci Res* 4: 385–405.
- HORBOWICZ, M., BRENAC, P. & OBENDORF, R. L. 1998. Fagopyritol B1, O- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-*chiro*- inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta*. 205: 1-11.
- HOEKSTRA, F.A., GOLOVINA, E.A. & BUITINK, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*. 6: 431-438.
- ISTA. International Seed Testing Association. 1996. *Seed Science and Technology* 24 (supplement): 1-335.
- KERMODE, A.R. & FINCH-SAVAGE, B.E. 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *In* *Desiccation and survival in plants: drying without dying* (M. Black & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing. New York. 149-184.
- KOSTER, K.L. 1991. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology*. 88: 829-832.
- KUO, T.M., DOEHLERT, D.C., CRAWFORD, C.G. 1990. Sugar Metabolism in Germinating Soybean Seeds: Evidence for the Sorbitol Pathway in Soybean Axes. *Plant Physiol*. Vol. 93, pag. 1514-1520.

- LAMARCA, E.V., LEDUC, S.N.M., BARBEDO, C.J. Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil – Leguminosae) pelo teste de tetrazólio. Revista Brasileira de Botânica. V.32, n.4, p.793-803. 2009.
- LE, T.N. & McQUEEN-MASON, S.J. 2006. Desiccation-tolerant plants in dryenvironments. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 5: 269-279.
- LEDUC, S.N.M. 2007. Indução de tolerância à dessecação e variação de carboidratos solúveis em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) durante a maturação. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- LEHNINGER, A. L. 1983. Ciclo do ácido tricarboxílico e via do fosfogluconato. In: *Bioquímica, Catabolismo e a Produção da energia das ligações de fosfato*. vol. 2, cap. 17. pag 317-339. Editora Edgard Blücher, São Paulo.
- LIU, J.J., ODEGARD, W., de LUMEN, B.O. 1995. Galactinol synthase from kidney bean cotyledon and zucchini leaf. *Plant Physiol* 109: 505–511.
- MAGUIRE, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence vigor. *Crop Science*, 2(2): 176-7.
- MICHEL, B.E. & KAUFMANN, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51: 914-916.
- MEDEIROS, A.C. de S. 2006. Preparo e uso de soluções salinas saturadas para a caracterização fisiológica de sementes florestais. Embrapa Florestas, Colombo. Circular técnica 125. 6p.
- MELLO, J.I.O. 2008. Compostos de reserva de sementes e suas relações com diferentes níveis de sensibilidade à dessecação e ao congelamento. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- MELLO, J.I.O. & BARBEDO, C.J. 2007. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae - Caesalpinioideae). *Revista Árvore* 31(4): 645-655.
- NISHIZAWA, A., YABUTA, Y., SHIGEOKA, S. 2008. Galactinol and raffinose as a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology Preview*.
- OBENDORF, R.L. 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7: 63-74.
- OLIVEIRA, J.M. 2009. Tolerância à dessecação em sementes de *Leucaena leucocephala* durante a germinação. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais.
- PAMMENTER, N.W., GREGGAINS, V., KIOKO, J.I., WESLEY-SMITH, J., BERJAK, P., FINCH-SAVAGE, W.E. . Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrants seeds of *Ekerbergia capensis*. *Seed Science Research*. V.8, p.463-471, 1998.
- PETERBAUER, T. & RICHTER, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science. Research* 11: 185-197.

- PINHEIRO, C.P., RODRIGUES, A.P., CARVALHO, I.S., CHAVES, M.M., RICARDO, C.P. 2005. Sugar metabolism in developing lupin seeds is affected by a short-term water deficit. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 420, pp. 2705–2712.
- PRIDHAM, J.B., HASSID, W.Z. 1965. Biosynthesis of raffinose. *Plant Physiol* 40: 984–986.
- RICHTER, A.A., THONKE, B., POPP, M. 1990. 1D-1-O-methyl-muco-inositol in *Viscum album* and members of the Rhizophoraceae. *Phytochemistry* 29:1785-1786.
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science & Technology* 1:499-514.
- ROCHA, Y.T. 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SARAVITZ, D.M., PHARR, D.M., CARTER, T.E. 1987. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. *Plant Physiol* 83: 185–189
- SMITH, P.T., KUO, T.M., CRAWFORD, C.G. 1991. Purification and characterization of galactinol synthase from mature zucchini squash leaves. *Plant Physiol* 96: 693–698
- STEADMAN, K.J., PRITCHARD, H.W., DEY, P.M. 1996. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany* 77: 667–674.
- STEADMAN, K.J., BURGOON, M.S., SCHUSTER, R.L., LEWIS, B.A., EDWARDSON, S.E. & OBENDORF, R.L. 2000. Fagopyritols, *D-chiro*-inositol and other soluble carbohydrates in buckwheat seed milling fractions. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2843-2847.
- STONE, S. L.; GIFFORD, D. J. 1999. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth. II. Storage triacylglycerols and carbohydrates. *International Journal of Plant Sciences*, Chicago, v.160, n. 4, p. 663-671.
- TARQUIS, A.M. & BRADFORD, K.J. 1992. Prehydration and priming treatments that advance germination also increase the rate of deterioration of lettuce seeds. *Journal of Experimental Botany*. 43: 307-317.
- TETTEROO, F.A.A., BOMAL, C., HOEKSTRA, F.A. & KARSSSEN, C.M. 1994. Effect of abscisic acid and slow drying on soluble carbohydrate content in developing embryoids of carrot (*Daucus carota* L.) and alfafa (*Medicago sativa* L.). *Seed Science Research*. 4: 203-210.
- THIND, S. K.; MALIK, C. P. 1995. Carbohydrate metabolism in okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench) seeds during germination. *Acta Physiologiae Plantarum*, Warsaw, Polônia, v. 17, n. 4, p. 321-326.
- VICRÉ, M., FARRANT, J.M. & DRIOUICH, A. 2004. Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant, Cell and Environment* 27: 1329-1340.
- ZHAO, T.Y., MARTINA, D., MEELEYB, R.B., DOWNIEA, B. 2004. Expression of the maize GALACTINOL SYNTHASE gene family: (II) Kernel abscission, environmental stress and myo-inositol influences accumulation of transcript in developing seeds and callus cells *Physiologia Plantarum* 121:647-655.

- WALKER-SIMMONS, M. 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiology*. 84: 61-66.
- WALTERS, C. 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research* 8: 223–244.
- WALTERS, C. 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12 (edição especial): 7-21.
- WALTERS, C., FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P. 2002. Desiccation and Damage. *In*: Black M, Pritchard HW (eds.). *Desiccation and Survival in Plants. Drying Without Dying*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 263–291.
- XU, N., COULTER, K.M. & BEWLEY, J.D. 1990. Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfalfa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. *Planta*. 182: 382-390.

5. CAPÍTULO 3

AQUISIÇÃO E PERDA DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE *Caesalpinia peltophoroides* BENTH (SIBIPIRUNA)

JOÃO PAULO NALDI SILVA, DANILO DA CRUZ CENTENO, MARÍLIA GASPAR,
CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

(Nas normas da Revista Brasileira de Sementes)

RESUMO – O comportamento de tolerância à dessecação pode ser considerado um *continuum* onde mesmo sementes ortodoxas poderiam não ser igualmente tolerantes à dessecação. Objetivou-se fornecer metodologias de secagem e regulação osmótica, avaliando a aquisição e perda de tolerância à dessecação em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth (sibipiruna), comparados as sementes de pau-brasil. Foi determinado o tempo de secagem das sementes até 10% de teor de água utilizando soluções de K_2CO_3 e estufa, além do tempo de equilíbrio em solução osmótica de PEG a -3 MPa. A semente imatura de sibipiruna é capaz de germinar ainda úmida, e já estava tolerante à dessecação até 7,5% de água. Apresentam proporções elevadas de ciclitóis e de sacarose, com apenas traços de rafinose e estaquiose. Na secagem há redução com poucas variações dos carboidratos solúveis, sem perda de viabilidade. Sementes maduras germinantes de sibipiruna perdem a tolerância à dessecação logo após a protrusão da raiz primária. Tais resultados demonstram comportamentos fisiológicos diferentes entre as sementes das duas espécies, questionamentos sobre essas diferenças são levantados.

Termos para indexação: tolerância à dessecação, maturação, germinação, carboidratos, semente

ABSTRACT - The behavior of desiccation tolerance can be considered a continuum where even orthodox seeds might not be equally desiccation tolerant. The objective was to provide methods for drying and osmotic regulation, assessing the acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds of *Caesalpinia peltophoroides* (Caesalpinaceae), compared with *C. echinata* (brazil-wood). It was determined the time of drying seeds to 10% water content solutions using K_2CO_3 and stove, and the equilibrium time in osmotic solution of PEG to -3 MPa. The immature seed is able to germinate still moist, and was tolerant to desiccation to 7.5% water content. Have high proportions of cyclitols and sucrose, with only traces of raffinose and stachyose. Drying reduced with a few variations of soluble carbohydrates, without loss of viability. Mature seeds from germinating seeds lose desiccation tolerance soon after radicle protrusion. These results demonstrate different physiological parameters between the seeds of two species, questions about these differences are raised.

Index terms: desiccation tolerance, maturation, germination, carbohydrates, seed

INTRODUÇÃO

A aquisição da tolerância à dessecação pelas sementes ortodoxas ocorre durante a formação e maturação da semente (Berjak & Pammenter, 2001), logo após a fase de expansão celular e de deposição de reservas nas células e antes do início do processo natural de secagem (Bewley & Black, 1994). Por outro lado, a sensibilidade à dessecação aumenta notoriamente com o início do processo de germinação, mesmo em sementes ortodoxas, e geralmente está associada à protrusão da raiz primária (De Castro et al., 2004b). O estágio exato da perda do processo de tolerância à dessecação nas sementes ortodoxas pode variar entre as espécies (Farrant et al., 2004). Nas sementes recalcitrantes, se há algum processo ativo, ele é perdido logo que se inicia a protrusão da raiz primária.

Trabalhos com sementes ortodoxas têm demonstrado que as mesmas podem readquirir a tolerância à dessecação, perdida durante a germinação, quando submetidas a estresses hídricos em soluções osmóticas (Bruggink & Toorn, 1995; Faria et al., 2005; Oliveira, 2009). A tolerância à dessecação também vem sendo estudada durante a maturação das sementes, procurando induzir o embrião imaturo a tolerar a secagem (Leduc, 2007); essa indução foi obtida, por exemplo, incubando-se as sementes imaturas de *C. echinata* em soluções de polietilenoglicol (PEG) em potencial hídrico ligeiramente inferior ao do embrião.

Entre outros mecanismos que podem estar envolvidos no processo de tolerância à dessecação (Berjak & Pammenter, 2008), o acúmulo de carboidratos não estruturais no período de maturação foi bastante investigado, evidenciando o papel da sacarose e de certos oligossacarídeos da série rafinose, como a rafinose e estaquiase (Steadman et al., 1996; Black et al., 1999; Buitink et al., 2003; Leduc, 2007). Esses açúcares teriam um papel dinâmico de impedir a aproximação das membranas umas às outras, substituindo fisicamente a água quando esta é removida e, dessa forma, mantendo a integridade das membranas (Hoekstra et al., 2001). Os carboidratos solúveis podem estar associados, ainda, a um sistema antioxidante bastante eficiente (Walters et al., 2002).

Outros açúcares como os ciclitóis livres e galactosil ciclitóis também se acumulam em algumas sementes e parecem contribuir para a estabilidade estrutural de organelas e de outras macromoléculas de maneira semelhante aos oligossacarídeos da série da rafinose (Obendorf, 1997; Peterbauer & Richter, 2001), quando estes não estão evidenciados (Horbowicz et al., 1998; Steadman et al., 2000; Borges et al., 2006). Além disso, açúcares como *myo*-inositol e o galactinol estão associados à formação de rafinose e estaquiase durante a maturação

(Pridham & Hassid, 1965; Saravitz et al., 1987; Smith et al., 1991), com o *myo*-inositol sendo componente base das reações de síntese, e aparente regulador da via biossintética (Hitz et al., 2002; Zhao et al., 2004).

Caesalpinia peltophoroides Benth (sibipiruna), é também pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, com distribuição principalmente na região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro, sul da Bahia e no Pantanal Mato-Grossense (Lorenzi, 1992), e devido a sua grande utilização na ornamentação urbana, é facilmente encontrada em São Paulo. Das poucas informações encontradas sobre essas sementes, a semente madura de sibipiruna apresenta cerca de 50% de lipídios, 32% de carboidratos solúveis, 7,7% de amido e 6,8% de proteínas solúveis (Corte et al., 2006), podem ser armazenadas por até 360 dias em câmara fria, porém em ambiente natural, perdem sua capacidade germinativa em 240 dias de armazenamento (Figliolia et al., 2001). São visualmente parecidas com as sementes de pau-brasil, com o mesmo tom amarronzado nas sementes maduras, porém maiores em comprimento e largura. As sementes imaturas apresentam tegumento fino e transparente, com cotilédones verdes e eixo embrionário bem definido.

Devido às semelhanças morfológicas e a proximidade taxonômica frente às diferenças fisiológicas, especialmente as relacionadas à longevidade, encontradas entre as sementes de sibipiruna e pau-brasil, o objetivo deste trabalho foi determinar a aquisição e perda da tolerância à dessecação das sementes imaturas e maduras de *C. peltophoroides*, associando-os com os obtidos nas sementes de pau-brasil e nas modificações na composição de carboidratos solúveis e na análise de ciclitóis.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Para a obtenção de sementes de *C. peltophoroides*, foram coletados frutos verdes, maduros e sementes recém-dispersas de 15 matrizes, sem marcação prévia de flores, estas abertas entre setembro e outubro de 2008, no *Campus* Universitário de Rubião Júnior (UNESP-Botucatu/SP), em abril e outubro de 2009.

As sementes obtidas do beneficiamento foram separadas em lotes homogêneos, sendo analisadas características como coloração da casca e rigidez, coloração do tegumento das sementes, além de características físicas e fisiológicas como teor de água, matéria seca, potencial hídrico e germinação.

Os experimentos com as sementes imaturas (e provavelmente intolerantes à dessecação) foram prontamente instalados após o beneficiamento, sendo o material armazenado a 8°C por no máximo 15 dias. As sementes obtidas de frutos maduros e as sementes recém dispersas foram armazenadas em envelopes de papel Kraft também a 8°C.

Determinação das fases de tolerância e intolerância à dessecação das sementes

Sementes coletadas de frutos verdes de *C. peltophoroides* foram submetidas a dois tipos de tratamentos, secagem direta e secagem após prévio condicionamento osmótico das sementes. O condicionamento osmótico foi realizado com solução de PEG com potencial hídrico de -3,0 MPa, a 8°C por 20 h em câmara de refrigeração. A secagem foi realizada em estufa a 40 °C com circulação forçada de ar, durante 8 horas, até atingirem cerca de 20% e 10% no teor de água, como proposto por Leduc (2007) para as sementes de *C. echinata*.

Para os experimentos com sementes maduras germinantes, foi utilizada secagem com atmosfera controlada, em caixas plásticas (75 cm de comprimento x 60 cm de largura x 40 cm de altura) contendo solução saturada de K₂CO₃ com umidade relativa de 43% a 20°C, para reduzir o teor de água de sementes imaturas abaixo de 10%, secando as sementes sem qualquer contato com a solução salina. Esta secagem diferencia-se por ser rápida e faz com que as sementes atinjam cerca de 10% de umidade, que a caracteriza como tolerante a dessecação (Faria et al.,2005; Alpert, 2005). Após incubação do material, o ambiente interno da caixa entra em equilíbrio em menos de 24 horas, com as sementes armazenadas por um período total de 3 dias, para garantir a secagem e manutenção no estado seco.

Para determinar a retomada do metabolismo da semente madura de *C. peltophoroides*, atingindo a fase dois da embebição (Bewley & Black, 1994), sementes foram embebidas em água por períodos progressivos e calculados o teor de água e o potencial hídrico.

Para determinar a perda de tolerância à dessecação pela semente germinante, sementes foram colocadas para germinar e tomadas as medidas das raízes primárias formando o grupo, de 0; 3; 5; 7 e 8; 10 a 16 milímetros. Após obtenção dos comprimentos de raiz primária, as sementes foram secas conforme descrito anteriormente.

Testes de Germinação

Os testes de germinação foram realizados em germinadores Marconi tipo MA400 com circulação interna de água, a 25±1°C, com fotoperíodo de 12 horas e 100% UR (Brasil, 2009). As sementes foram colocadas em rolo de papel para germinação (Germitest), umedecidos previamente com água de torneira, em três repetições de 15 sementes para as sementes imaturas, e três repetições de 10 sementes para as sementes maduras. Foram feitas

leituras diárias, registrando-se as sementes germinadas (protrusão da raiz primária de, no mínimo, 2 cm) e o desenvolvimento de plântulas normais. Foi calculado o Índice de Velocidade de Germinação (IVG), através da adaptação da fórmula de Índice de Velocidade de Emergência (Maguire, 1962).

No experimento envolvendo comprimentos de raiz primária, além do índice de germinação (G) e plântulas normais (PN) da testemunha, foi determinada a taxa de sobrevivência das sementes após serem secas (Tx), sendo considerada sobrevivente a semente com raiz primária protruída e que após secagem e nova hidratação, manteve seu desenvolvimento. O valor da taxa de sobrevivência se refere apenas as sementes que germinaram, e por isso pode alcançar valores maiores que o índice de germinação da testemunha.

Determinação do teor de água, matéria seca e potencial hídrico das sementes

O teor de água (expresso em porcentagem, com base na massa úmida) e o conteúdo de matéria seca das sementes (mg.semente^{-1}) foram determinados gravimetricamente pelo método de estufa a $103 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, por 17 horas (Brasil, 2009). O potencial hídrico das sementes foi obtido através de psicrômetro, baseando-se no ponto de orvalho, modelo WP4 Dewpoint Potentiometer, da Decagon (USA), utilizando três repetições de 5 sementes cada.

A aferição da relação entre potencial hídrico medido e potencial hídrico de equilíbrio foi realizada por meio de isotermas de sorção de água, em soluções de potencial osmótico conhecido, com polietileno glicol (PEG), segundo Michel & Kauffmann (1973) bem como por meio de equilíbrio em atmosfera com umidade relativa controlada e pré-estabelecida, utilizando-se sais específicos (Medeiros, 2006).

Determinação da resistência a hipóxia das sementes

Com o objetivo de verificar possíveis efeitos de hipóxia do tratamento osmótico, sementes imaturas foram incubadas submersas em água destilada, cobertas com papel de germinação em gerbox, pelos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 30 dias, em geladeira a 8°C . Após estes períodos, foram determinados o teor de água, a matéria seca e o potencial hídrico das sementes, além da porcentagem e velocidade de germinação e desenvolvimento de plântulas normais, conforme descritos anteriormente.

Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas a partir de radículas das sementes imaturas coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C , em duas repetições com cerca de 250

a 300 radículas, com posterior pulverização do material vegetal em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo.

Extração e análise de carboidratos não estruturais e osmólitos

A extração dos carboidratos solúveis foi realizada segundo metodologia adaptada por Garcia et al. (2006), a partir de 100 mg de material liofilizado. Como as radículas foram coletadas em nitrogênio líquido, não foi necessária a etapa de inativação de enzimas. A extração dos carboidratos foi realizada com etanol 80% na proporção de 1:10 (p:v), a 80°C por 15 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm em temperatura ambiente por 15 min. Ao término da centrifugação, retirou-se o sobrenadante, armazenando-o em frascos apropriados, devidamente identificados. O procedimento completo foi repetido mais duas vezes, para que fossem extraídos todos os açúcares solúveis.

Os resíduos da extração etanólica foram lavados com água deionizada, agitados em vortex com posterior retirada de água (que foi adicionada a parte aquosa da extração etanólica) e liofilizados por 48 horas, pesados e reservados para quantificação de amido.

Os sobrenadantes das amostras tiveram seu volume igualado e foram, então, utilizados para a quantificação dos açúcares através do método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), sendo utilizada uma solução de glucose ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 490 nm, em triplicatas para cada amostra. Após a quantificação dos açúcares totais pelo método do fenol-sulfúrico, separou-se 1 mL de cada amostra e estas foram então deionizadas em colunas contendo resinas de troca catiônica e aniônica Dowex, sendo eluídas com 10 volumes de água deionizada. O material eluído teve seu pH neutralizado com hidróxido de amônio. Os eluatos foram concentrados até secagem completa e retomados em 1 mL de água deionizada, sendo novamente quantificados e, um volume contendo 400 μg de açúcar, de cada repetição, foi analisado através de cromatografia líquida de alta resolução em cromatógrafo DIONEX, modelo ICS3000, em coluna CarboPac PA-1. O sistema de eluição foi o isocrático com 250 mM de hidróxido de sódio (eluente B) em água (eluente A), com fluxo de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, por meio da seguinte programação: 0-2 min, 7% eluente B; 2,1-25 min, 4% eluente B; 25,1-30 min, 80% eluente B; 30,1-35 min, 7% eluente B (Garcia et al., 2006).

Quantificação de amido

Após liofilização, foram pesados 10 mg do resíduo da extração de carboidratos solúveis, para quantificação de amido, por meio de método enzimático, realizando-se digestões com alfa-amilase e amiloglicosidase como descrito por Amaral et al. (2007). A

quantificação dos produtos da hidrólise enzimática foi realizada utilizando-se as enzimas glucose-oxidase e peroxidase (GOD-POD) e os reagentes 4-aminoantipirina e fenol em microplaca de Elisa para a leitura a 490 nm. A curva padrão foi construída a partir de quantidades crescentes de glucose na concentração de 1 mg mL⁻¹.

Análises de ciclitóis

Para a análise de ciclitóis, utilizou-se o extrato etanólico obtido na extração de açúcares solúveis totais, sendo evaporado e sililado utilizando piridina e BSTFA, e caracterizado por aparelho de cromatografia gasosa e espectrometria de massas CG / EM (Richter et al.,1990 modificado). A identificação de cada ciclitol foi realizada através da biblioteca de compostos do aparelho e na comparação dos Índices de Kovats obtidos na literatura, sendo este índice calculado através do Índice de Retenção (IR) de cada composto quando comparados com padrão de alcanos de cadeias progressivamente maiores.

Após a identificação e calculadas as áreas referentes a cada ciclitol, os valores foram normalizados e as frequências relativas foram obtidas ao comparar as áreas normalizadas de cada açúcar, às áreas obtidas na testemunha, que foram consideradas de valor igual a 1.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos compondo o experimento com a semente imatura, e 5 tratamentos compondo o experimento para a semente madura, os resultados foram submetidos à análise de variância (teste F), e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para realização das análises estatísticas, os valores de porcentagem, quando necessário para ajuste da normalidade, serão transformados para arc sen (%)^{0,5}.

RESULTADOS

Características físicas e morfofisiológicas

As sementes coletadas de frutos verdes apresentaram o tegumento fino e transparente, com cotilédones verdes e com eixo embrionário bem definido. As coletadas de frutos maduros e recém dispersas continham o tegumento rígido e amarronzado, geralmente com manchas marrons escuras e verdes escuras, com cotilédones esverdeados e poucos de coloração bege (Figura 1).

O lote de sementes imaturas apresentou teor de água elevado (65,9%), e conteúdo de matéria seca baixo (0,14 g.semente⁻¹), quando comparados as sementes coletadas de frutos

maduros e recém dispersas, (9,1% e 0,259 g.semente⁻¹, respectivamente). Além disso, as sementes imaturas germinaram ainda úmidas e desenvolveram plântulas normais, porém os índices de germinação, desenvolvimento de plântulas normais e de IVG das sementes maduras foram mais elevados quando comparados os dois lotes (33 e 73 % de germinação, 22 e 63 % de plântulas normais e 1,06 e 1,83 de IVG, respectivamente para sementes imaturas e maduras).



FIGURA 1. Frutos e sementes de *C. Pelthoroides* coletados em diferentes épocas. **A e C**, coleta abril/09; **B e D**, coleta outubro/09.

Osmoregulação e aferição correta do potencial hídrico

Os testes de osmoregulação das sementes imaturas de *C. pelthoroides* mostram que as sementes apresentando rápida regulação da umidade e do potencial hídrico pelas diversas soluções de PEG em até 24 horas de incubação. Outra característica notada é o potencial hídrico do eixo embrionário estar cada vez menor, enquanto a semente apresenta menor umidade (dados não apresentados).

Diferenças nos valores dos potenciais hídricos do eixo embrionário de *C. pelthoroides* também foram encontradas durante a secagem da semente (dados não apresentados). A semente imatura de *C. pelthoroides* levou cerca de 7 horas para atingir umidade em torno de 15%, perdendo água de forma relativamente rápida quando muito

úmida, mas há dificuldade de se obter valores abaixo de 10%, quando secas em estufa com circulação de ar à 40°C (Figura 2).

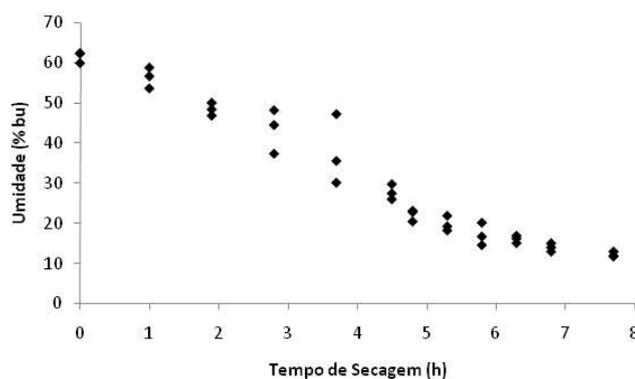


FIGURA 2. Umidade (% em base úmida) de sementes de *C. peltophoroides* após secagem (56 / 48 / 40 / 32 / 24 / 20 / 16 / 12 / 10 / 8 / 6 % em base úmida) por períodos progressivos.

Resistência à hipóxia

As sementes imaturas submersas em água e armazenadas a 8°C ganharam umidade no decorrer do tempo de incubação, ficando muito hidratadas com potenciais hídricos maior que -1 MPa, a partir de 14 dias submersas (dados não apresentados). Entretanto, os valores de germinação e de formação de plântulas normais foram semelhantes aos da testemunha, com diferença apenas no IVG, a partir do 7° dia de incubação (dados não apresentados).

Indução de tolerância à dessecação em sementes imaturas

As sementes imaturas já apresentavam germinação e desenvolvimento de plântulas normais (Tabela 1 e Figura 3). Os tratamentos de secagem até 20% e 10% não apresentaram diferenças quando comparadas a testemunha, exceto queda no IVG (Figura 3). Com relação ao tratamento de estresse osmótico, houve a redução de cerca de 10 pontos percentuais do valor de umidade após incubação (Tabela 1), sem alterações dos outros parâmetros, exceto no IVG. Já para os tratamentos de estresse osmótico após secagem subsequente até 20 e 10% de umidade, se reduziu apenas até 27,7% de umidade no primeiro, e acima de 10% de umidade no segundo (Tabela 1), porém, os índices de germinação e de plântulas normais foram em média, mais elevados que o da testemunha, com IVG igual ao da testemunha (Figura 3).

Procurando obter sementes secas abaixo de 10%, sementes imaturas de *C. peltophoroides* desse mesmo lote foram incubadas em atmosfera controlada com UR de 42% contendo solução de K₂CO₃, por 6 dias (dados não apresentados). Dessa forma foi possível

atingir valores de teor de água de 7,5%, e potenciais hídricos muito reduzidos (-96,3 MPa). As sementes imaturas ainda germinaram após esta secagem, além disso, os índices de germinação e de plântulas normais encontrados foram o mesmo para os tratamentos de secagens anteriores (31 e 20%, respectivamente), e semelhantes ao da testemunha (Figura 3).

TABELA 1. Teor de água, Potencial hídrico e Matéria Seca de sementes imaturas de *C. peltophoroides*, após estresse osmótico e/ou com secagem, coletadas em Botucatu (abr/09).

Tratamento	Teor de água (% bu)	Potencial hídrico (-MPa)		Matéria seca (g.semente ⁻¹)
		Ψ_w eb	Ψ_w ex	
Testemunha	65,9 a	-1,4 c	-3,3 d	0,140
Estresse osmótico	53,6 b	-2,1 c	-3,3 d	0,193
Secagem 20%	21,1 cd	-19,5 b	-22,6 c	0,149
Secagem 10%	13,5 e	-43,4 a	-62,6 a	0,157
Estresse e Secagem 20%	27,7 c	-10,8 b	-10,2 cd	0,138
Estresse e Secagem 10%	15,1 de	-34,9 a	-40,5 b	0,146
C.V (%)	7,26	18,09	21,47	

Letras comparam tratamentos entre si, pelo teste de Tukey, a 5%.

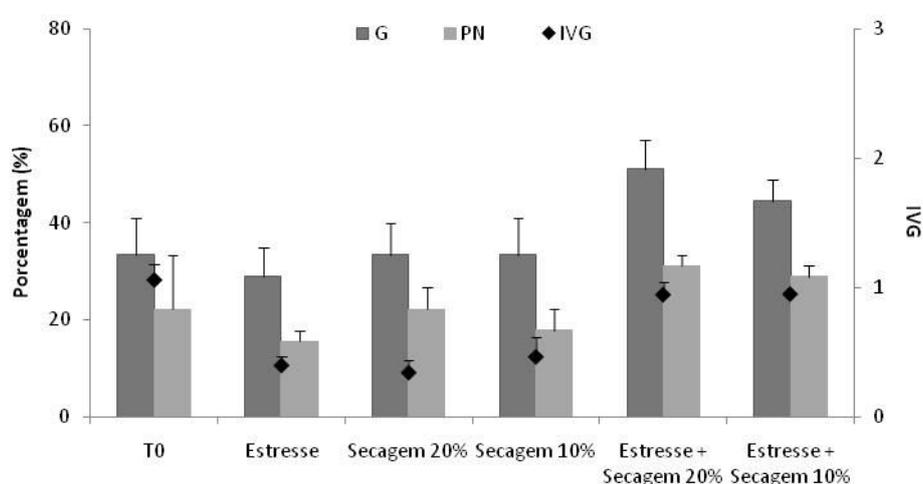


FIGURA 3. Germinação (G), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Plântulas Normais (PN) de sementes imaturas de *C. peltophoroides*, após estresse osmótico e/ou após secagem, coletadas em Botucatu. As médias dos tratamentos não tiveram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Análises bioquímicas

As análises bioquímicas nas radículas das sementes imaturas foram realizadas apenas nas sementes ainda úmidas e após secagem até 20 e 10% de água, e são apresentadas abaixo.

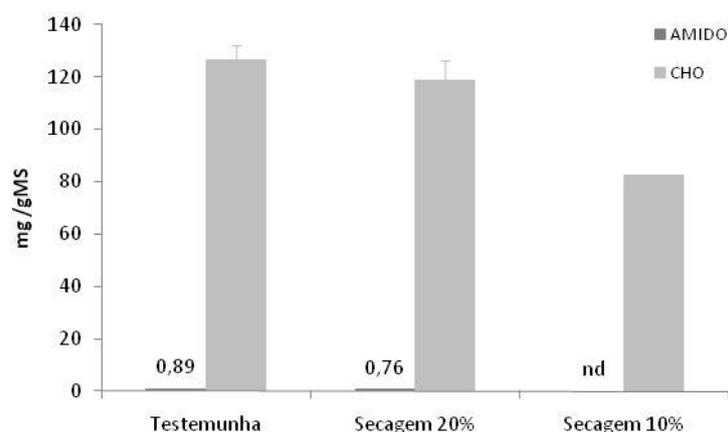


FIGURA 4. Quantificação de amido e de carboidratos solúveis totais de radículas de sementes imaturas de *C. peltophoroides* após os seguintes tratamentos: Testemunha; secagem até 20% (Secagem 20%); secagem até 10% (Secagem 10%).

Nestes resultados é possível observar quantidades muito baixas de amido, sendo que no tratamento de secagem a 10%, não foi possível detectar amido pela técnica utilizada. Já os valores de açúcares solúveis totais se mostram semelhantes entre a testemunha e nas sementes secas até 20%, porém, se mostram reduzidos quando a semente é seca até teor de água de 13% (Figura 4).

Analisando o perfil dos açúcares solúveis através de cromatografia líquida com pulso amperométrico - HPLC-PAD (Tabela 2), é observado nas radículas das sementes imaturas grandes proporções de açúcares alcoóis da família dos ciclitóis, além da sacarose, com baixa proporção de glucose e valores ainda menores para frutose. Além disso, foram detectadas baixas proporções de oligossacarídeos da série da rafinose, com maior proporção de estaquiose do que rafinose (Tabela 2). É também observada leve alteração na composição desses açúcares quando as sementes foram secas, com redução nos ciclitóis e aumento de sacarose, além de leve aumento nos níveis de estaquiose (Tabela 2).

TABELA 2. Variações na composição de carboidratos solúveis em radículas de sementes imaturas de *C. peltophoroides*, após secagem, coletadas em Botucatu.

Tratamento	Ciclitóis (%)	Glucose (%)	Frutose (%)	Sacarose (%)	Rafinose (%)	Estaquiose (%)
Testemunha	57,1	4,1	0,2	36,0	0,3	2,2
Secagem 20%	55,2	4,0	0,1	37,6	0,4	2,6
Secagem 10%	52,5	4,4	0,1	39,8	0,4	2,8

A análise de ciclitolis por GC-MS permitiu identificar alguns açúcares deste grupo que estavam presentes nas radículas das sementes, como o pinitol, *chiro*-inositol e *myo*-inositol, e com prováveis chances de também terem sido encontrados galactopinitol A e B e galactinol (Figura 5).

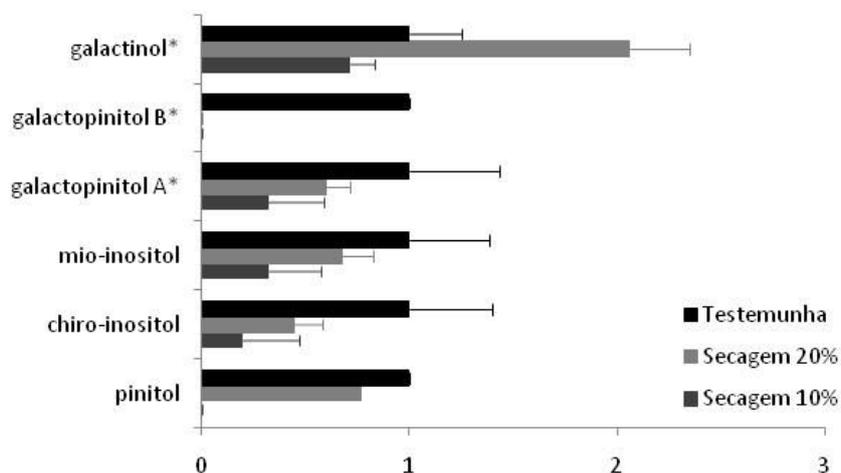


FIGURA 5. Quantidade relativa de alguns ciclitolis (pinitol, *chiro*-inositol, *myo*-inositol, galactopinitol A e B e galactinol), em radículas de sementes imaturas de *C. peltophoroides* após os seguintes tratamentos: Testemunha; secagem até 20% (Secagem 20%); secagem até 10% (Secagem 10%), coletadas em Botucatu. Os dados foram normalizados a partir da resposta calculada da testemunha (=1). *Os valores encontrados provavelmente são de Galactopinitol A e B e galactinol.

Nesta análise, nota-se diminuição na quantidade relativa de praticamente todos os açúcares alcoóis identificados, exceto pelo galactinol nas radículas das sementes seca a 20%. Também nota-se que os níveis de galactopinitol B e pinitol não foram identificados em todos os tratamentos (Figura 5).

Perda de tolerância à dessecação na semente madura

Com o objetivo de obter informações sobre o tempo de embebição, ativação do metabolismo da semente e do início do processo de germinação, sementes maduras de *C. peltophoroides* foram embebidas por períodos progressivos e calculados o teor de água e o seu potencial hídrico (do embrião e do eixo embrionário), mostrados na Figura 6.

Estes resultados mostram que a semente ganha umidade de forma relativamente rápida, triplicando seu valor inicial após 4 horas de embebição (Figura 6, B), aumentando progressivamente até atingir valores acima de 50% após 24 horas de embebição. Padrão semelhante é visto no potencial hídrico, que diminui rapidamente nas primeiras horas de embebição, e tende a ser menor quanto maior o tempo de embebição (dados não

apresentados). Entretanto, a curva de hidratação obtida está incompleta, sem tendência característica da fase 3 da embebição, onde ocorreria um novo aumento no teor de água das sementes (Figura 5, A).

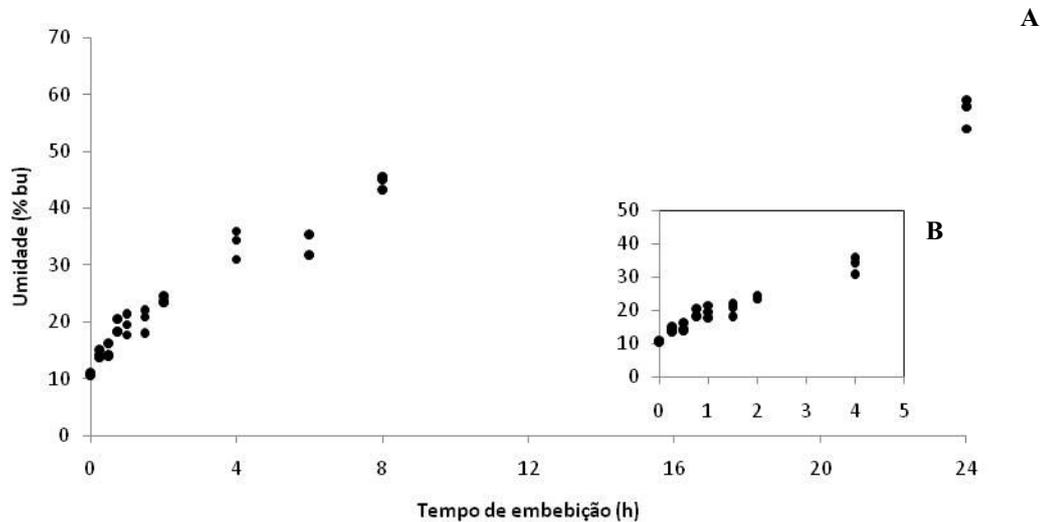


FIGURA 6. Teor de água de sementes maduras de *C. peltophoroides*, após períodos progressivos de embebição. A; Tendência de teor de água das sementes até 24 horas de embebição. B; Detalhe da mesma tendência nas primeiras 4 horas de embebição.

Com o objetivo de obter sementes que já tivessem perdido o processo de tolerância à dessecação, sementes maduras de *C. peltophoroides* foram colocadas para germinar e tiveram suas raízes primárias medidas para formar tratamentos que seriam secos até atingir teor de água próximo da semente madura intacta (Figura 7).

A secagem das sementes germinantes em atmosfera controlada foi obtida de acordo com o esperado, com todos os tratamentos atingindo valores de teor de água abaixo de 10%, assim como obtidos potenciais hídricos extremamente baixos (dados não apresentados). Entretanto, mesmo sementes com apenas 3 milímetros de raiz primária não resistiram a secagem, com todos os tratamentos obtendo zero nos parâmetros avaliados (Figura 7).

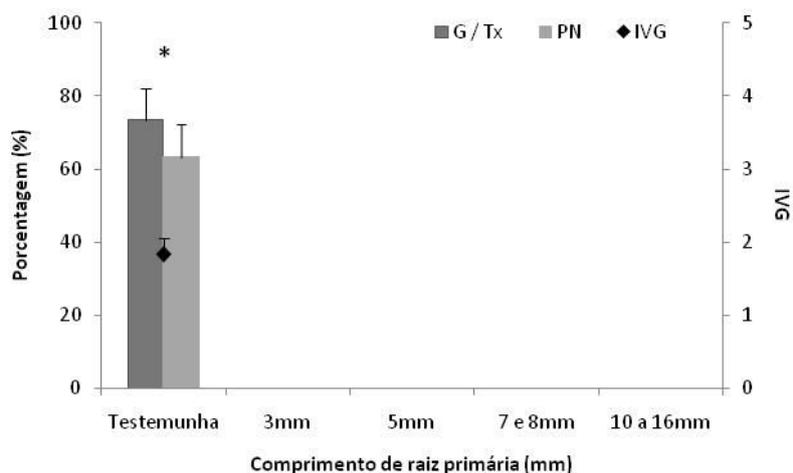


FIGURA 7. Germinação (G), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Plântulas Normais (PN) e Taxa de sobrevivência (Tx) de *C. peltophoroides*, após embebição e comprimento de raiz primária de 3, 5, 7 e 8, 10 a 16 milímetros, com posterior secagem em atmosfera controlada, por 3 dias. Germinação se refere apenas a testemunha. As médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

DISCUSSÃO

As sementes de *C. peltophoroides* coletadas de frutos verdes apresentam características típicas de sementes imaturas, teor de água elevado e baixo conteúdo de matéria seca (Tabela 1). Efeitos do tempo de maturação sobre as sementes são vistos quando se compara os dois lotes de sementes coletados, quando observado o ganho de matéria seca, com conseqüente elevação dos índices de germinação, desenvolvimento de plântulas normais e IVG, nas sementes coletadas de frutos maduros e recém dispersas (Figuras 3 e 7, ver testemunhas). A diminuição do teor de água visto nas sementes maduras mostra que as sementes de sibipiruna passam por uma etapa de secagem, uma característica da maturação de sementes ortodoxas (De Castro et al., 2004a), com teor de água abaixo de 10% (Figuras 3 e 7, ver testemunhas).

Além disso, as sementes imaturas de *C. peltophoroides* adquirem a capacidade de germinar ainda úmidas (Figura 3), antes mesmo de passarem pela etapa de secagem na maturação, um fator considerado necessário para aquisição deste processo nas sementes ortodoxas (Marcos Filho, 2005), mas que também é observado nas sementes imaturas de *C. echinata* (Borges et al., 2005; Leduc 2007). Essa grande variação no conteúdo de água das sementes pode explicar também a redução nas dimensões, principalmente no comprimento e na largura das sementes, encontrados entre os dois lotes (dados não apresentados).

A semente imatura de *C. peltophoroides* precisa de 7 horas de secagem para atingir umidade em torno de 15%, perde água de forma relativamente rápida quando muito úmida,

mas há dificuldade de se ter valores abaixo de 10%, quando secas em estufa com circulação de ar à 40°C (Figura 2), evidenciando alguma forma de resistência a perda de água pela semente quando estes valores são críticos.

As sementes imaturas já se apresentavam tolerantes à dessecação no momento da coleta, germinando após os tratamentos de secagem até 20% e 10%, em valores semelhantes ao obtido pela testemunha (Figura 3). O tratamento de estresse osmótico obteve resultados desejados, como a redução de cerca de 10 pontos percentuais no valor de umidade e sem alterações de outros parâmetros, exceto pelo IVG. Já a etapa de secagem não foi suficiente nos tratamentos de estresse osmótico com secagem subsequente (Tabela 1), dificuldade já discutida anteriormente utilizando método de estufa.

Quando secas até 7,5% de umidade, as sementes imaturas ainda germinaram após secagem, se mostrando altamente tolerantes à dessecação, como já evidenciado anteriormente, além disso, os índices de germinação e de plântulas normais encontrados foram o mesmo para os tratamentos de secagens anteriores (Tabela 1), e semelhantes ao da testemunha, indicando que a redução da umidade abaixo de 10% não influenciou a tolerância à dessecação dessas sementes (dados não apresentados).

As sementes imaturas recém coletadas, e as secas até 20% e 10% foram estudadas bioquimicamente, analisando as radículas coletadas desses experimentos. Esta região do eixo embrionário é a principal área que precisa ser preservada no processo de secagem natural das sementes e onde estariam importantes mudanças físicas e fisiológicas necessárias para a aquisição do processo de tolerância à dessecação (Faria et al., 2005).

As dosagens de amido mostram que a semente de sibipiruna não utiliza esse polissacarídeo como principal composto de reserva (Figura 4), diferente do encontrado nas sementes de pau-brasil (Borges et al., 2005; Garcia et al., 2006), e os valores mínimos encontrados desse açúcar devem ter relação com o fato da semente não ter completado todo o seu processo de maturação, pois na semente madura é relatado até 7% de amido entre todas as reservas da semente, como lipídeos (50%) e proteínas (cerca de 7%) (Corte et al., 2006), e em concordância com o mesmo trabalho, a quantidade de açúcares solúveis encontrada foi baixa (Figura 4). Entretanto, é um valor muito maior quando comparadas a uma semente imatura de pau-brasil (47,7 mg.glu / g.MS), que também foi capaz de tolerar secagem até 10% de água (Anexo 1, Tabela 4).

A redução na quantidade de açúcares totais observada quando as sementes foram secas até 13% de umidade não era esperada, já que a diminuição desses compostos levaria a

concentrações osmóticas intercelulares menores com consequente redução do potencial hídrico das células, facilitando a uma maior perda de água para o meio externo, o que não ocorre nessas sementes (dados não apresentados). Além disso, esses açúcares são citados como osmoprotetores intracelulares - principalmente com papel da sacarose - quando os tecidos vegetais são desidratados com aumento de suas concentrações nessas situações (Obendorf, 1997; Hoekstra et al., 2001; Berjak et al., 2007). Entretanto os índices de germinação e de plântulas normais obtidos foram semelhantes à testemunha (Figura 3), dessa forma, essa redução nos açúcares totais nas radículas não teve efeito sobre a resistência à dessecação dessas sementes, podendo estar atuando na manutenção de outros processos fisiológicos no estado seco. Na semente imatura seca de pau-brasil a redução ocorreu nos níveis de amido (Anexo 1, Figura 8), porém, não houve variações nos níveis de carboidratos solúveis, e mesmo tendo suportado a secagem até 10% de água, não favoreceu a viabilidade das sementes (Anexo 1, Tabela 4). Tal resultado leva a suposições se essas sementes possuem estratégias diferentes para a manutenção dos processos fisiológicos no estado seco e se tal comportamento estaria relacionado com as reservas que acumulam.

Observando os resultados na análise dos açúcares solúveis totais por cromatografia líquida de alta resolução (Tabela 2), é encontrada na semente imatura de sibipiruna perfil semelhante ao da semente de pau-brasil (Borges et al., 2005; Garcia et al., 2006; Leduc, 2007), sendo os açúcares majoritários os ciclitóis e a sacarose, e com menores proporções de glucose, frutose, rafinose e estaquiase. Esses dois últimos são pertencentes à família de oligossacarídeos da série da rafinose (ROS) e juntos com a sacarose (Buitink et al., 2003; Berjak et al., 2007) são comumente relacionados com a tolerância à dessecação em sementes, desempenhando papel na manutenção de membranas no estado seco de mesma forma que a sacarose (Koster, 1991; Obendorf, 1997; Peterbauer & Richter, 2001). Assim como na semente de pau-brasil, esses açúcares não devem ter atuado nesse processo nas sementes de sibipiruna, sendo substituídos pelos ciclitóis, considerados responsáveis por esse papel quando os ROS não estão evidenciados (Obendorf, 1997; Borges et al., 2006).

Mudanças nas proporções desses açúcares são observadas quando a semente é seca (Tabela 2), havendo pequeno acréscimo nas proporções de sacarose quanto maior a desidratação da semente, comportamento esperado na desidratação de tecidos vegetais como discutido anteriormente, porém, neste caso, as variações foram sutis e não tiveram efeito aparente sobre a sobrevivência da semente. A secagem também mostra tendência de decréscimo nas proporções de ciclitóis e com conseguinte aumento nas proporções de

estaquiose. Essa relação entre as mudanças dos níveis desses açúcares pode estar ligada ao fato de que alguns ciclitóis são precursores naturais desse oligossacarídeo (Peterbauer & Richter, 2001). Baixas proporções de rafinose e estaquiose também são observadas nas sementes de pau-brasil, com variações semelhantes (mas de maiores amplitudes) nas proporções de ciclitóis e sacarose (Anexo 1, Tabela 5).

A análise de ciclitóis por GC-MS permitiu identificar alguns açúcares deste grupo que estavam presentes nas radículas das sementes, como o pinitol, *chiro*-inositol e *myo*-inositol, e com prováveis chances de também terem sido encontrados galactopinitol A e B e galactinol (Figura 5). Esses açúcares estão presentes na maturação de algumas sementes e estariam contribuindo na tolerância à dessecação de maneira semelhante aos oligossacarídeos da série da rafinose (Obendorf, 1997; Borges et al., 2006). A dificuldade de detecção de pinitol e galactopinitol B provavelmente se deve as pequenas quantidades desses açúcares nas amostras. Além disso, a tendência de redução dos níveis de quase todos os ciclitóis analisados nas sementes que foram secas pode estar ligada à redução nas proporções de ciclitóis observadas nas análises de HPLC (Tabela 2), mas também sem efeito aparente sobre a viabilidade dessas sementes, que já se apresentavam tolerantes após a secagem (Figura 3).

Acúmulo de ciclitóis, como o galactinol, é observado durante o desenvolvimento de sementes e após estresse hídrico (Horbowicz & Obendorf, 1994; Pinheiro et al., 2005), com o galactinol tendo função de ser substrato para a formação de rafinose (Saravitz et al., 1987; Liu et al., 1995) e, recentemente, também atuaria na proteção contra estresse oxidativo em plantas (Nishizawa et al., 2008). Entretanto, a maior proporção de galactinol observada quando a semente foi seca até 20%, não alterou os níveis de rafinose (Figura 5 e Tabela 2), tampouco os índices de germinação. Situação semelhante foi observada em embriões de milho que após estresse hídrico, aumentaram as concentrações de galactinol e de transcritos de rafinose sintase, mas o acúmulo de rafinose ocorreu apenas quando havia baixas concentrações de *myo*-inositol (Zhao et al., 2004), responsável pela síntese de galactinol e aparente regulador dessa via biossintética (Hitz et al., 2002). Dessa maneira, a diminuição dos níveis de *myo*-inositol durante a secagem pode não ter sido suficiente para estimular a produção de rafinose nas sementes de sibipiruna. Aumento de galactinol também foi visto nas sementes imaturas tolerantes de pau-brasil, porém nessas sementes, esse aumento ocorreu independente do tratamento que estas sementes sofreram, aparentemente sem relação com a viabilidade dessas sementes (Capítulo 2).

Os resultados envolvendo as sementes maduras de *C. peltophoroides* mostram que o processo de embebição da semente é relativamente rápido triplicando a umidade da semente em apenas 4 horas de embebição, porém, não é tão expressiva quanto a semente de *C. echinata* (Lamarca et al., 2009). Entretanto, nota-se na Figura 6 que o tempo de análise foi insuficiente para determinar todas as fases do processo de embebição da semente, necessitando de nova implementação para determinar a fase 3, relacionada com a perda de tolerância à dessecação pela semente madura.

A perda de tolerância à dessecação pela semente germinante ocorreu de forma relativamente rápida com a semente com apenas 3 mm de comprimento não resistindo a secagem até umidade em torno de 10% (Figura 7), diferente do observado nas sementes de pau-brasil, mesmo essas não terem sido armazenadas por longos períodos (ver Capítulo 1), embora seja variável o estágio exato da perda do processo de tolerância à dessecação nas sementes ortodoxas. Por exemplo, já se mostram sensíveis a dessecação com 2 mm de raiz primária, tomates (Lin et al., 1998) e *M. truncatula* (Buitink et al., 2003), e apenas com 1 mm em quiabo (Lin et al., 1998).

O comportamento de tolerância à dessecação apresentado pelas sementes imaturas e maduras de *C. peltophoroides* apresentadas neste trabalho se mostra muito interessante quando comparado com as sementes de *C. echinata*, que apesar da proximidade taxonômica, apresentam diferenças fisiológicas marcantes (Tabela 3). Por exemplo, o tempo de maturação das sementes de pau-brasil é de 60-65 dias após a antese (Borges et al., 2005), enquanto que as sementes de sibipiruna levam cerca de 12 meses para dispersar as sementes maduras, questionando se os prováveis efeitos do ambiente variando ano a ano sobre a aquisição de tolerância à dessecação, como parece ocorrer com as sementes de pau-brasil (Capítulo 2), ocorre com a mesma intensidade em sementes que estão sob as variações ambientais de todas as estações do ano.

TABELA 3. Comparações do tempo de maturação, e da manutenção de viabilidade após armazenamento de sementes maduras de *C. echinata* e *C. peltophoroides*. Autores: 1- Figliolia et al., 2001, 2- Barbedo et al., 2002, 3- Borges et al., 2005, 4- Hellman et al., 2006, 5- observação pessoal.

	<i>C. echinata</i>	<i>C. peltophoroides</i>
Tempo de maturação	2 meses ³	±12 meses ⁵
Armazenamento a 20-25°C	1 mes ²	8 meses ¹
Armazenamento a 5-8°C	18 meses ⁴	12 meses ¹

Além disso, há enorme diferença da viabilidade dessas sementes dependendo da temperatura de armazenamento (Tabela 3). Sementes de sibipiruna se mantêm viáveis por até 8 meses de armazenamento a temperatura ambiente (Figliolia et al., 2001), enquanto que as de pau-brasil morrem em 30 dias (Barbedo et al., 2002). Essas diferenças poderiam estar relacionadas à resistência do tegumento das sementes à dessecação, através de camadas de osteosclereídes, bem como macrosclereídes e fibras, relatadas por Teixeira et al. (2004) como provável fator responsável pelo comportamento diferenciado da viabilidade a temperatura ambiente de *Caesalpinia ferrea* (pau-ferro) e *C. echinata*, que não apresenta osteosclereídes no tegumento, mas estômatos, enquanto o tegumento de *C. ferrea* é impermeável a água. Por outro lado, quando armazenadas em baixas temperaturas o comportamento no armazenamento se inverte (Tabela 3), com maior tempo de viabilidade para sementes de pau-brasil, apesar de não existir registros de maiores períodos de armazenamento para sibipiruna.

Esse comportamento diferenciado no armazenamento pode estar relacionado com as reservas energéticas de cada semente (Mello, 2008), e também ser um dos fatores que mostram as diferenças no processo de tolerância à dessecação dessas sementes, como a manutenção da tolerância à dessecação nas sementes germinantes. Enquanto sementes germinantes de 3 mm de raiz primária de sibipiruna já estavam totalmente sensíveis a dessecação, sementes germinantes de pau-brasil com 9 mm foram capazes de resistir a secagem até 10% (Capítulo 1).

CONCLUSÃO

Sementes imaturas de *C. peltophoroides* adquirem a capacidade de germinar ainda úmidas, mesmo antes de passar pela etapa de dessecação na maturação da semente. Além disso, após cerca de 7 meses de desenvolvimento essas sementes já se mostram tolerantes a dessecação até níveis de umidade abaixo de 10%, com baixas proporções de rafinose e estaquiose, mas com elevadas proporções de sacarose e de ciclitóis. Já a perda de tolerância à dessecação ocorre logo no início do processo de germinação, concomitante a protrusão da raiz primária.

O uso de solução salina de K_2CO_3 para a secagem de sementes de *C. peltophoroides* é de fácil utilização e se mostra mais eficiente e proporcionando menor variabilidade do que a secagem em estufa com circulação de ar a 40°C.

ANEXO 1

TABELA 4. Características físicas e fisiológicas de sementes imaturas (43 DAA) de *C. echinata*, coletadas em 2007, em Mogi-Guaçu/SP. G, germinação; PN, plântulas normais; MS, matéria seca.

Tratamento	Umidade (% bu)	Potencial Hídrico (-MPa)	G (%)	PN (%)	IVG	MS (g.s ⁻¹)
Testemunha	67,7 a	-1,3	97 a	53 ab	2,9 a	0,170
Estresse	57,9 b	-2,8	87 a	75 a	3,5 a	0,135
Secagem	11,8 c	-95,2	53 b	42 b	1,6 b	0,168
Estresse + Secagem	7,4 d	-	7 c	3 c	0,2 c	0,172
C.V (%)	2,81	-	11,44	33,83	19,60	-

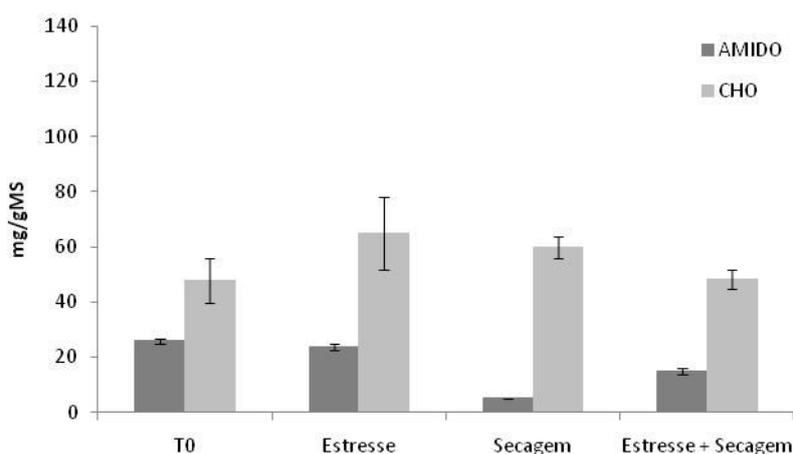


FIGURA 8. Quantificação de amido e de carboidratos solúveis totais de radículas de sementes imaturas (43 DAA) de *C. echinata* coletadas em 2007. Testemunha (T0); estresse osmótico (Estresse); secagem (Sec); secagem após estresse osmótico (Estresse + Sec).

TABELA 5. Variações na composição de carboidratos solúveis em radículas de sementes (43 DAA) de *C. echinata*, após estresse osmótico e/ou após secagem em atmosfera controlada (cerca de 10% em base úmida), por 3 dias, lote 2007.

Tratamento	Ciclitóis (%)	Glucose (%)	Frutose (%)	Sacarose (%)	Rafinose (%)	Estaquiiose (%)
Testemunha	69,6	4,5	1,7	21,5	1,1	1,5
Estresse osmótico	68,2	4,1	1,6	23,7	0,9	1,5
Secagem	53,7	5,3	2,6	35,0	1,5	1,9
Estresse e Secagem	55,1	6,2	3,0	30,6	2,3	2,9

REFERÊNCIAS

- ACKERSON, R.C. Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. **Journal of Experimental Botany**, v. 35, p. 403-413, 1984a.
- ACKERSON, R.C. Abscisic acid and precocious germination in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, v. 35, p. 414-421, 1984b.
- ALPERT, P. Sharing the secrets of life without water. *In: Drying without dying: The comparative mechanisms and evolution of desiccation tolerance in animals, microbes, and plants.* **Integr. Comp. Biol.**, v. 45, p. 683-684, 2005.
- AMARAL, L.I.V.; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2007.
- BARBEDO, C.J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasílica**, v. 12, p. 145-164, 1998.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Seed recalcitrance - current perspectives. **South African Journal of Botany**, v. 67, p. 79-89, 2001.
- BERJAK, P.; FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W. Seed desiccation tolerance mechanisms. *In: Jenks M, ed., Plant desiccation tolerance.* Ames, IO: Blackwell Publishing, in press, 2007.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Review: From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in Perspective. **Annals of Botany**, v. 101, p. 213-228, 2008.
- BARRUETO CID, L.P.; OLIVA, M.A.; CARDOSO, A.A. Efeito do potencial hídrico sobre a embebição, a respiração e a germinação da leguminosa *Cratylia floribunda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 16, p. 883-890, 1981.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds. Physiology of development and germination, 2nd edn. New York: Plenum Press, 1994.
- BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GEE, H.; CÔME, D. Water content, raffinose and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. **Plant Physiology**, v. 120, p. 463-471, 1999.
- BORGES, I.F.; GIUDICE, J.D.; BILIA, D.A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; BARBEDO, C.J. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered Leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 851-861, 2005.
- BORGES, I.F.; BARBEDO, C.J.; RICHTER, A.A.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Variation in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae). **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 4, p. 475-482, 2006.
- BRADFORD, K.J.; CHANDLER, P.M. Expression of 'dehydrin-like' proteins in embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza sativa* during dehydration. **Plant Physiology**, v. 99, p. 488-494, 1992.

- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. SNDA/DNDV/CLAV, Brasília, p.365, 1992.
- BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1035–1040, 1993.
- BRUGGINK, G.T.; TOORN, P.V.T. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, v. 9, n. 1, p. 49-53, 1995.
- BUITINK, J.; VU, B.L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, v. 13, p. 273-286, 2003.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4a ed. Funep, Jaboticabal. 2000.
- CHANDLER, P.M.; ROBERTSON, M. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 113-41, 1994.
- CHEN, K.; MILLER, A.N.; PATTERSON, G.W.; COHEN, J.D. A rapid and simple procedure for purification of indole-3-acetic acid prior to GC-SIM-MS analysis. **Plant Physiology**, v.86, p.822-825, 1988.
- CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.A.; VENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A.A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, v.30, n.6, p.941-949, 2006.
- DE CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. **In:** Germinação, do básico ao aplicado. Orgs: Ferreira, A.G., Borguetti, F. Editora Artmed, Porto Alegre, 2004a.
- DE CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. **In:** Germinação, do básico ao aplicado. Orgs: Ferreira, A.G., Borguetti, F. Editora Artmed, Porto Alegre, 2004b.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- FARIA, J.M.R.; BUITINK, J.; VAN LAMMEREN, A.A.M.; HILHORST, H.W.M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 2119-2130, 2005.
- FARRANT, J.M.; BAILLY, C.; LEYMARIE, J.; HAMMAN, B.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Wheat seedlings as a model to understand desiccation tolerance and sensitivity. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 563-574, 2004.
- FIGLIOLIA, M.B.; SILVA, A.; AGUIAR, I.B.; PERECIN, D. Efeito do acondicionamento e do ambiente de armazenamento na conservação de sementes de sibipiruna. **Revista Brasileira Horticultura Ornamental**, v.7, n.1, p.57-62, 2001.
- GARCIA, I.S.; SOUZA, A.; BARBEDO, C.J.; DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam.

- (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2B, p.739-745, 2006.
- HAN, B.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.; FARRANT, J.; KERMODE, A. R. The recalcitrant plant species, *Castanospermum australe* and *Trichilia dregeana*, differ in their ability to produce dehydrin-related polypeptides during seed maturation and in response to ABA or water-deficit-related stresses. **Journal of Experimental Botany**, v. 314, p. 1717-17, 1997.
- HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; HANDA, S.; HANDA, A.K. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. **HortScience**, v. 19, p. 371-377, 1984.
- HITZ, W.D.; CARLSON, T.J.; KERR, P.S.; SEBASTIAN, S.A. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. **Plant Physiol**, v. 128, p. 650-660, 2002.
- HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R.L. Seed desiccation tolerance and storability: dependence of flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols. Review and survey. **Seed Science Res**, v. 4, p. 385-405, 1994.
- HORBOWICZ, M.; BRENAC, P.; OBENDORF, R. L. Fagopyritol B1, O- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-*chiro*- inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. **Planta**, v. 205, p. 1-11, 1998.
- HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 431-438, 2001.
- ISTA. International Seed Testing Association. **Seed Science and Technology**, v. 24 (supplement), p. 1-335, 1996.
- KERMODE, A.R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 9, p. 155-195, 1990.
- LAMARCA, E.V., LEDUC, S.N.M., BARBEDO, C.J. **Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil – Leguminosae) pelo teste de tetrazólio**. Revista Brasileira de Botânica. V.32, n.4, p.793-803. 2009.
- LE, T.N.; McQUEEN-MASON, S.J. Desiccation-tolerant plants in dry environments. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v. 5, p. 269-279, 2006.
- LEDUC, S.N.M. 2007. **Indução de tolerância à dessecação e variação de carboidratos solúveis em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) durante a maturação**. Instituto de Botânica, São Paulo, 110p. (Dissertação de Mestrado)
- LIN, T.P.; YEN, W.L.; CHIEN, C.T. Disappearance of desiccation tolerance of imbibed crop seeds is not associated with the decline of oligosaccharides. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 1203-1212, 1998.
- LIU, J.J.; ODEGARD, W.; de LUMEN, B.O. Galactinol synthase from kidney bean cotyledon and zucchini leaf. **Plant Physiol**, v. 109, p. 505-511, 1995.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Plantarum, Nova Odessa, 1992.

- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p. 176-7, 1962.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Fealq, Piracicaba, 495p. 2005.
- MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, v. 51, p. 914-916, 1973.
- MEDEIROS, A.C. de S. **Preparo e uso de soluções salinas saturadas para a caracterização fisiológica de sementes florestais**. Embrapa Florestas, Colombo. Circular técnica 125. 6p, 2006.
- NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose as a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiology Preview**, v. X, p. X, 2008.
- OBENDORF, R.L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. **Seed Science Research**, v. 7, p. 63-74, 1997.
- OLIVEIRA, J.M. **Tolerância à dessecação em sementes de *Leucaena leucocephala* durante a germinação**. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, número de páginas, 2009. (Dissertação de Mestrado).
- PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, v. 11, p. 185-197, 2001.
- PINHEIRO, C.P.; RODRIGUES, A.P.; CARVALHO, I.S.; CHAVES, M.M.; RICARDO, C.P. Sugar metabolism in developing lupin seeds is affected by a short-term water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 420, p. 2705–2712, 2005.
- PRIDHAM, J.B.; HASSID, W.Z. Biosynthesis of raffinose. **Plant Physiol**, v. 40, p. 984–986, 1965.
- RICHTER, A.A.; THONKE, B.; POPP, M. 1D-1-O-methyl-muco-inositol in *Viscum album* and members of the Rhizophoraceae. **Phytochemistry**, v. 29, p.1785-1786, 1990.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science & Technology**, v. 1, p. 499-514, 1973.
- SARAVITZ, D.M.; PHARR, D.M.; CARTER, T.E. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiol**, v. 83, p. 185–189, 1987.
- SMITH, P.T.; KUO, T.M.; CRAWFORD, C.G. Purification and characterization of galactinol synthase from mature zucchini squash leaves. **Plant Physiol**, v. 96, p. 693–698, 1991.
- STEADMAN, K.J.; PRITCHARD, H.W.; DEY, P.M. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. **Annals of Botany**, v. 77, p. 667–674, 1996.
- STEADMAN, K.J.; BURGOON, M.S.; SCHUSTER, R.L.; LEWIS, B.A.; EDWARDSON, S.E.; OBENDORF, R.L. Fagopyritols, *D-chiro*-inositol and other soluble carbohydrates in buckwheat seed milling fractions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 2843-2847, 2000.
- TARQUIS, A.M.; BRADFORD, K.J. Prehydration and priming treatments that advance germination also increase the rate of deterioration of lettuce seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 307-317, 1992.

- TEIXEIRA, S.P.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M.; MACHADO, S.R. Fruit and seed ontogeny related to the seed behaviour of two tropical species of *Caesalpinia* (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 146, p. 57–70, 2004.
- TETTEROO, F.A.A.; BOMAL, C.; HOEKSTRA, F.A.; KARSSSEN, C.M. Effect of abscisic acid and slow drying on soluble carbohydrate content in developing embryoids of carrot (*Daucus carota* L.) and alfafa (*Medicago sativa* L.). **Seed Science Research**, v. 4, p. 203-210, 1994.
- VICRÉ, M.; FARRANT, J.M.; DRIOUICH, A. Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 1329-1340, 2004.
- ZHAO, T.Y.; MARTINA, D.; MEELEYB, R.B.; DOWNIEA, B. Expression of the maize GALACTINOL SYNTHASE gene family: (II) Kernel abscission, environmental stress and myo-inositol influences accumulation of transcript in developing seeds and callus cells **Physiologia Plantarum**, v. 121, p. 647-655, 2004.
- WALKER-SIMMONS, M. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. **Plant Physiology**, v. 84, p. 61-66, 1987.
- WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Research**, v. 8, p. 223–244, 1998.
- WALTERS, C.; FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Desiccation and Damage. **In:** Black M, Pritchard HW (eds.). *Desiccation and Survival in Plants. Drying Without Dying*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 263–291, 2002.
- XU, N.; COULTER, K.M.; BEWLEY, J.D. Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfafa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. **Planta**, v. 182, p. 382-390, 1990.

6. CAPÍTULO 4

ANÁLISE COMPARATIVA DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM DUAS *Caesalpinia*

RESUMO – O ácido abscísico tem papel crucial na formação da semente, inibindo a germinação precoce, influenciando a deposição de reservas de armazenamento e pode estar envolvido na tolerância à dessecação de sementes. As aquaporinas constituem canais que facilitam o transporte de água através das membranas, cuja participação no processo de tolerância à dessecação de sementes ainda não foi elucidada. Objetivou-se quantificar os níveis de ABA endógeno e a expressão de aquaporinas nas radículas de sementes após secagem e estresse osmótico, avaliando a aquisição e perda de tolerância à dessecação em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam e *Caesalpinia peltophoroides* Benth. A dosagem de ABA endógeno não foi eficiente, não encontrando em todas as amostras picos de ABA marcado ou endógeno na análise por cromatografia gasosa. A extração de RNA se mostrou bastante eficiente, fornecendo altas concentrações de RNA total com qualidade aceitável. São necessárias adaptações da metodologia de dosagem de ABA, utilizando menor quantidade de material vegetal. Há a necessidade de verificar possíveis contaminantes nas extrações de RNA, mas o método se mostra muito eficiente utilizando pouco material para extração.

Termos para indexação: tolerância à dessecação, ácido abscísico, aquaporinas, RNA, semente.

COMPARATIVE ANALYSES OF DESICCATION TOLERANCE IN TWO *Caesalpinia* SEEDS

ABSTRACT - Abscisic acid plays a crucial role in the seed development, inhibiting precocious germination, influencing the deposition of storage reserves and may be involved in seed desiccation tolerance. Aquaporins are channels that facilitate water transport across membranes, whose participation in the seeds desiccation tolerance has not been elucidated. The objective of this work was to quantify the levels of endogenous ABA and expression of aquaporins in seeds radicles after drying and osmotic stress, during the acquisition and loss of desiccation tolerance in *Caesalpinia echinata* Lam and *Caesalpinia peltophoroides* seeds. Measurement of endogenous ABA was not efficient, not finding in all samples peaks of endogenous or marked ABA in the analysis by gas chromatography. RNA extraction proved quite efficient, providing high concentrations of total RNA with acceptable quality. Adjustments in measurement method of ABA are necessary, using a smaller amount of plant material. Its necessary to verify possible contaminants in the RNA extraction, but the method proves very efficient using small amount for extraction.

Index terms: desiccation tolerance, abscisic acid, aquaporin, RNA, seed.

INTRODUÇÃO

Processos e mecanismos de proteção relacionados com a tolerância à dessecação em sementes vêm sendo identificados sobre diversos aspectos, embora o modo como operam e sua interação ainda não estejam muito bem compreendidos (Berjak et al., 2007).

Entre outros compostos, o ácido abscísico (ABA) pode estar envolvido na aquisição da tolerância à dessecação (Chandler & Robertson, 1994; Bradford & Chandler, 1992; Han et al., 1997; Vicré et al., 2004; Le & McQueen-Mason, 2006). Durante a formação da semente o ABA tem papel crucial sobre eventos tais como a deposição das reservas de armazenamento, inibição da germinação precoce, a indução de dormência primária em algumas sementes e a aquisição de tolerância à dessecação (Bewley & Black, 1994; Kermode, 2005).

As concentrações de ABA são baixas durante os estágios iniciais do desenvolvimento das sementes, aumentando de maneira acentuada e geralmente concomitante ao máximo peso fresco, tendo seus níveis reduzidos à medida que se inicia a etapa de secagem da maturação (Kermode, 2005). Essa redução também poderia sinalizar a diminuição da sensibilidade da semente ao seu efeito (Ackerson, 1984 a,b). Os picos de ABA durante a maturação poderiam estar relacionados com a aquisição da tolerância, preparando a semente para a etapa de secagem (Tetteroo et al., 1994), ou seriam apenas uma constante do desenvolvimento sem relação direta com a aquisição de tolerância à dessecação (Kalemba et al., 2009).

Apesar da relação do ABA com a tolerância à dessecação não ter sido, ainda, confirmada (Xu et al., 1990; Tarquis & Bradford, 1992; Bochicchio et al., 1994), evidências de sua ação impedindo a germinação ou influenciando o conteúdo de carboidratos solúveis e a regulação de transcrição do gene *lea* (Bray, 1993; Tetteroo et al., 1994) ainda o colocam como fator ligado à aquisição da tolerância à dessecação.

Algumas classes de proteínas específicas estão fortemente relacionadas com o processo de tolerância à dessecação em sementes, como por exemplo, as Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEAs), entre outras (Barbedo & Marcos-Filho, 1998). As aquaporinas constituem outro grupo de proteínas, cuja participação no processo de tolerância à dessecação de sementes ainda não foi elucidada. Estas proteínas constituem canais que facilitam o transporte de água através das membranas. São proteínas bastante conservadas entre as espécies, sendo descritas em diversos grupos de procariotos e eucariotos (Park & Saier, 1996; Kozono et al., 2003).

As aquaporinas são classificadas segundo sua seqüência e localização (Kaldenhoff & Fischer, 2006). Nas plantas superiores encontramos as proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs), proteínas do tipo nodulina 26 (NIPs), proteínas intrínsecas básicas (SIPs) (Johanson &

Gustavsson, 2002) e as proteínas intrínsecas de membrana plásmática (PIPs) (Kaldenhoff & Fischer, 2006). As TIPs contribuem nos fluxos de água e de pequenos solutos que atravessam a membrana dos vacúolos, tendo papel na regulação de turgor celular, além de atuar no equilíbrio das concentrações de uréia entre compartimentos celulares diferentes. As PIPs representam a subfamília com o maior número de membros (13 em *Arabidopsis* e milho) e a maioria está localizada na membrana plasmática (Kaldenhoff & Fischer, 2006). A expressão de aquaporinas é regulada principalmente durante a expansão celular, em situação de estresse hídrico e salino e pelo aumento nos níveis de ABA (Luu & Maurel, 2005).

Poucos trabalhos sobre as aquaporinas durante o desenvolvimento de sementes são encontrados na literatura, tendo as pesquisas como principal alvo os processos de embebição e germinação (Willigen et al., 2006). Considerando-se que a tolerância à dessecação, naturalmente ou artificialmente adquirida, envolve fluxos de água pela semente (Faria et al., 2005; Leduc, 2007), o estudo de expressão de aquaporinas é necessário para complementar as evidências do modo de operação desse mecanismo.

Trabalhos recentes com sementes ortodoxas têm demonstrado que as mesmas podem readquirir a tolerância à dessecação, perdida durante a germinação, quando submetidas a estresses hídricos em soluções osmóticas (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005; Massetto et al., 2008). Mais recentemente, a tolerância à dessecação também vem sendo estudada durante a maturação das sementes, procurando induzir o embrião imaturo a tolerar a secagem (Leduc, 2007); essa indução foi obtida, por exemplo, incubando-se as sementes imaturas de *C. echinata* em soluções de polietilenoglicol (PEG) em potencial hídrico ligeiramente inferior ao do embrião.

Estresses hídricos, portanto, podem ser importantes ferramentas para estimular processos que levem à tolerância à dessecação, dentre os quais pode estar a ativação de genes. A ativação de diversos genes por estresse hídrico é reportada na literatura (Le & McQueen-Mason, 2006), mas pouco se sabe sobre a ativação de genes ligados à tolerância à dessecação. Em sementes intolerantes à dessecação esse conhecimento assume importância ainda maior, visto que não se sabe a fonte dessa intolerância: a ausência dos genes ou sua não-atividade.

Caesalpinia echinata Lam (pau-brasil), é pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae. Essas sementes toleram secagem até atingirem níveis abaixo de 8% de água (Barbedo et al., 2002) e vêm se mostrando de grande interesse para estudos de tolerância à dessecação, acumulando amido como principal polissacarídeo de reserva, seguido de alguns ciclitóis como o pinitol e ciceritol (Borges et al., 2006; Garcia et al., 2006), com apenas traços de rafinose e estaquiose (Borges et al., 2006; Garcia et al., 2006). Perdem

a viabilidade rapidamente, mesmo quando secas, se armazenadas em temperaturas acima de 20°C (Barbedo et al., 2002), mas mantêm a viabilidade por mais de 2 anos se armazenadas em temperaturas negativas (Hellmann et al., 2006).

Caesalpinia peltophoroides Benth (sibipiruna), é também pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae. Das poucas informações encontradas sobre essas sementes, a semente madura de sibipiruna apresenta cerca de 50% de lipídios, 32% de carboidratos solúveis, 7,7% de amido e 6,8% de proteínas solúveis (Corte et al., 2006), podem ser armazenadas por até 360 dias em câmara fria, porém em ambiente natural, perdem sua capacidade germinativa em 240 dias de armazenamento (Figliolia et al., 2001). São visualmente parecidas com as sementes de pau-brasil, com o mesmo tom amarronzado nas sementes maduras, porém maiores em comprimento e largura. As sementes imaturas apresentam tegumento fino e transparente, com cotilédones verdes e eixo embrionário bem definido.

Devido ao comportamento diferenciado observado no processo de tolerância à dessecação em sementes de sibipiruna e pau-brasil, este trabalho objetivou quantificar os níveis de ABA endógeno e a análise de expressão de aquaporinas nas radículas dessas sementes, procurando fornecer maior compreensão dos mecanismos que estão envolvidos na aquisição e perda da tolerância à dessecação, e sua provável relação com o estresse hídrico nessas sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram coletados frutos verdes, maduros e sementes recém dispersas com marcação prévia de flores (*C. echinata*) ou não (*C. peltophoroides*) nos seguintes locais:

- Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, no município de Moji-Guaçu, São Paulo. De 15 matrizes de *C. echinata*, nos anos de 2007 e 2008, aos 43, 50-55 e 59-60 dias após a antese (DAA).

- *Campus* Universitário de Rubião Júnior (UNESP), no município de Botucatu, São Paulo. De 15 matrizes de *C. peltophoroides*, em abril e outubro de 2009.

As sementes obtidas do beneficiamento dos frutos foram separadas em lotes homogêneos, sendo analisadas características como coloração da casca, rigidez e cor de acúleos, coloração do tegumento das sementes e características fisiológicas como teor de água, matéria seca, potencial hídrico e germinação.

Os experimentos com as sementes imaturas (intolerantes à dessecação) foram prontamente instalados após o beneficiamento, sendo o material armazenado a 8°C por no máximo 15 dias. As sementes maduras (tolerantes à dessecação) de *C. echinata* foram armazenadas em envelopes de papel Kraft a -18°C, as sementes maduras de *C. peltophoroides* foram armazenadas em envelopes de papel Kraft a 8°C.

Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas a partir de radículas das sementes coletadas dos experimentos de indução de tolerância à dessecação nas sementes imaturas de *C. echinata* (Capítulo 2) e *C. peltophoroides* (Capítulo 3) e do restabelecimento de tolerância à dessecação em sementes maduras de *C. echinata* (Capítulo 2). As radículas foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, em três repetições com cerca de 100 a 150 radículas para *C. echinata*, e em duas repetições com cerca de 250 a 300 radículas para *C. peltophoroides*, com posterior pulverização do material vegetal em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. Devido a pouca quantidade de material vegetal nas sementes imaturas de *C. echinata*, as repetições foram reunidas em apenas uma para análise.

Extração e dosagem de ácido abscísico (ABA)

A metodologia para análise de ABA está sendo implementada no laboratório com colaboração do Dr. Eduardo Purgatto da Universidade de São Paulo (USP/SP) utilizando protocolo adaptado de Chen *et al* (1988). Foram utilizadas 70-100 mg de massa seca de amostras liofilizadas por 2 dias. Na etapa de extração foi adicionado em cada amostra padrão interno de ABA marcado [0,01 µg/µL] e solução extratora (metanol 80% + BHT 40 mg/L), e agitados em vortex por cerca de 1 minuto. Após esse procedimento, as amostras ficaram sob agitação constante, a 4°C, durante a noite, e protegido da luz. Após esse período, as amostras foram purificadas ao serem transferidas para seringas com lã de vidro contendo a resina C-18, sendo recolhidas e armazenadas a -20°C.

Para a etapa de dosagem, as amostras foram evaporadas até secagem completa em *speed vac* e derivatizadas com 1 mL de diazometano em éter, por 30 minutos a temperatura ambiente. O extrato resultante foi seco em fluxo de N₂ e ressuspendido em 20 e 100 µL de acetato de etila, e analisados em GC-MS-SIM com o seguinte método: Coluna HP1701, 150°C por 3 min, seguido de 150°C a 200°C a 4°C por min, por ultimo 200°C a 300°C a 10°C por min. Injetor a 280°C, com marcação dos íons 130, 136, 189 e 195; gás carreador: Hélio.

Extração de RNA

O material vegetal teve o RNA total extraído com reagente Trizol (Invitrogen), a partir de amostras de 200 e 100 mg de massa fresca, de acordo com instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram dosadas e preparadas para corrida de gel em eletroforese para certificação da qualidade do RNA extraído.

RESULTADOS

Para as dosagens de ABA endógeno, foram utilizados 70 a 100 mg de material seco coletado, ao invés de 1 g preconizado pelo protocolo, devido a pouca quantidade de material vegetal obtido (Tabela 1).

Nas sementes maduras, só foi possível detectar picos de ABA nas amostras da testemunha e no tratamento de estresse nas sementes com 5 mm de raiz primária, após utilizar de entre 70 e 100 mg, e diluição de apenas 20 μ L da amostra. Nas outras amostras desses experimentos, não foi possível detectar nem mesmo o pico do padrão de ABA (Tabela 1).

Não foi possível detectar qualquer pico na análise de ABA (endógeno e marcado) nas sementes imaturas de *C. echinata*, utilizando 100 mg de material vegetal liofilizado e 100 μ L na diluição da amostra. Nas sementes imaturas de *C. peltophoroides*, só foi possível detectar pico na análise de ABA endógeno no tratamento de Secagem até 20%, utilizando 20 μ L na diluição da amostra.

A extração de RNA utilizando o método do Trizol só não foi realizada com amostras de sementes imaturas de *C. echinata*, pois não houve material suficiente para análise. Foram obtidos valores altos nas concentrações de RNA total, pela quantidade de massa fresca utilizada (Tabela 2), as razões obtidas mostram que a qualidade da extração está aceitável, entretanto, quando se observa o gel de eletroforese, há a formação de um rastro acima das bandas.

TABELA 1. Quantificação de ABA endógeno em radículas de sementes de *C. echinata* e *C. peltophoroides*, coletadas dos experimentos de indução e restabelecimento de tolerância à dessecação (Capítulos 2 e 3).

Espécie	Lote	Tratamento	Massa Seca (g)	Diluição (µL)	ug ABA / g.MS
<i>C. echinata</i>	45 DAA 2007	Testemunha	0,105	100	-
		Estresse	0,100	100	-
		Secagem	0,102	100	-
		Estresse + Secagem	0,100	100	-
	45 DAA 2008	Testemunha	0,101	100	-
		Estresse	0,105	100	-
		Secagem	0,094	100	-
		Estresse + Secagem	0,103	100	-
	50-55 DAA 2008	Testemunha	0,100	100	-
		Estresse	0,104	100	-
		Secagem	0,108	100	-
		Estresse + Secagem	0,101	100	-
	59 DAA 2007	Testemunha	0,103	20	0,001
		3 mm	0,095	20	-
		5 mm	0,079	20	-
3 mm Secagem		0,107	20	-	
5 mm Secagem		0,100	20	-	
5 mm Est + Secagem		0,106	20	-	
	5 mm Estresse	0,077	20	0,0006	
<i>C. peltophoroides</i>	Imatura	Testemunha	0,107	20	-
		Sec 20%	0,106	20	0,001
		Sec 10%	0,109	20	-

TABELA 2. Quantidade de RNA em radículas de sementes de *C. echinata* e *C. peltophoroides*, coletadas dos experimentos de indução e restabelecimento de tolerância à dessecação.

Lote	Tratamento	Massa fresca (mg)	Razão (260/280 nm)	[RNA] ug/mL
PBr 59 DAA 2007	Testemunha	100	2,18	3758
	3mm	200	2,00	3235
	5mm	200	1,95	2898
	3mm Secagem	100	2,08	3340
	5mm Secagem	100	2,04	1603
	5mm Est + Secagem	100	2,16	2633
	5mm Estresse	200	2,01	3730
Sibip Imatura	Testemunha	200	2,13	3964
	Sec 20%	100	2,15	4210
	Sec 10%	100	2,20	2435

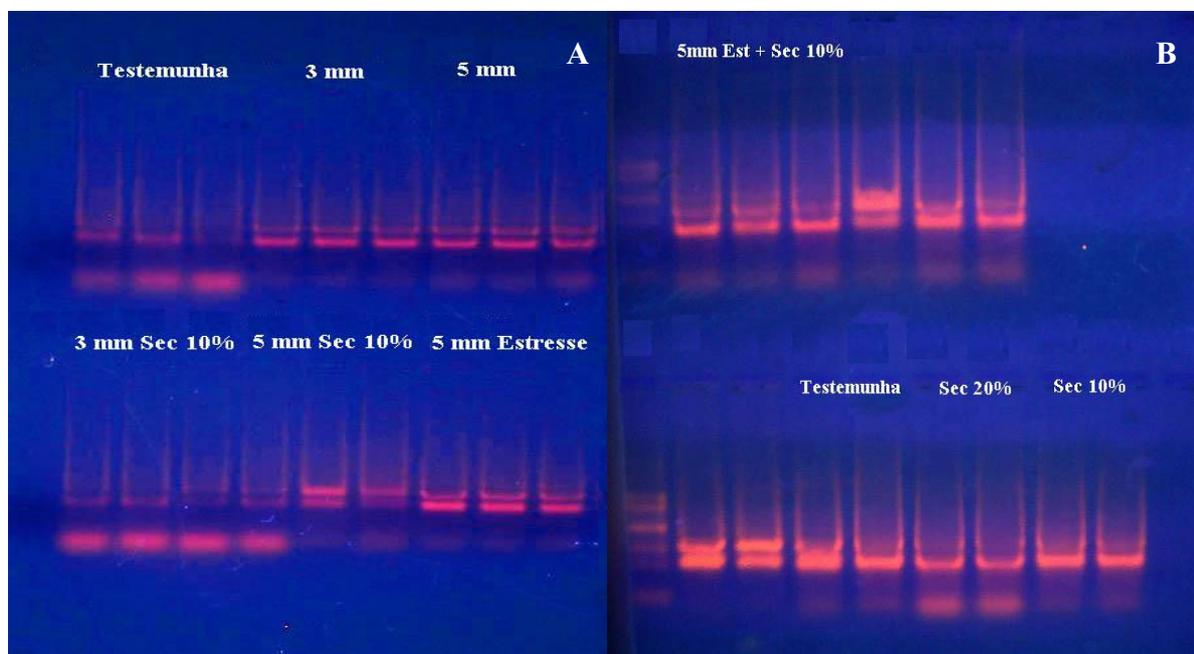


FIGURA 1. Eletroforese em gel de RNAs total extraídos de radículas das sementes de *C. echinata* e *C. peltophoroides* coletadas dos experimentos de indução e restabelecimento de tolerância à dessecação. **A**, amostras de *C. echinata*. **B**, amostras de *C. echinata* (5 mm Est + Sec 10%) e de *C. peltophoroides*, (Testemunha, Sec 20% e Sec 10%).

DISCUSSÃO

As dosagens de ABA endógeno foram imprecisas (Tabela 1), não sendo possível detectar ABA endógeno quanto o padrão de ABA marcado em todos os tratamentos. A não detecção de ABA endógeno pode estar ligada à quantidade insuficiente da amostra de partida (70-100 mg de massa seca, ao invés de 1g como preconiza o protocolo), e as prováveis perdas por degradação durante o preparo da amostra. Entretanto foram coletadas ao menos 100

radículas por repetição, fornecendo cerca de 500 mg de material seco, dificultando a obtenção de maior quantidade de material vegetal para a realização de análises e experimentos futuros.

Além disso, as sementes podiam conter desde o início níveis já muito baixos de ABA, dificultando assim sua detecção. Apesar de não ser observada a germinação dessas sementes dentro do fruto, evidenciando algum controle da germinação, talvez pelos níveis de ABA na semente. Foi realizada também uma menor diluição (20 μ L) da amostra após a metilação com diazometano, procurando concentrar os níveis de ABA, nestes casos foi possível detectar em poucos tratamentos, porém, ainda com valores mínimos (Tabela 1).

Entretanto, mesmo em algumas dessas amostras o padrão interno de ABA marcado não pode ser detectado, evidenciando que também houve perdas durante o preparo da amostra, ou ainda, a etapa de derivatização com diazometano não foi eficiente. A etapa de derivatização é uma das mais críticas de todo o protocolo, e necessária para preparar a amostra para ser injetada na coluna de cromatografia gasosa (CG), perdas nesse processo são esperadas em qualquer tipo de análise em CG. Porém, neste caso é improvável alguma falha séria nessa etapa, por terem sido preparadas amostras apenas com padrão interno toda vez que uma solução de diazometano era pronta, e sempre foi possível detectar o padrão.

Existem na literatura outros protocolos para a dosagem de ABA, utilizando cromatografia líquida - HPLC (Sweetser & Vatvars, 1976; Ciha et al., 1977; Dobrev et al., 2005), ou métodos imunoenzimáticos - ELISA (Maldiney et al., 1986; Walker-Simmons et al., 2000). Em termos de sensibilidade e exatidão a técnica por GC-MS com padrão interno marcado isotopicamente é mais eficiente comparado com os métodos tradicionais de HPLC, através de detecção por UV (Dr. E. Purgatto, USP, em comunicação pessoal). Há novos protocolos que utilizam HPLC-MS (cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas) e, nesse caso, trata-se de uma técnica superior ao GC-MS, por serem mais simples e com maior sensibilidade, exatidão e precisão, porém, com custos elevados para aquisição e manutenção do aparelho (Dr. E. Purgatto, USP, em comunicação pessoal).

Os métodos de dosagem de ABA por ELISA apresentam vantagem quando se objetiva realizar triagem de amostras, porém, é bastante criticado quando há necessidade de uma quantificação confiável de ABA, por causa da especificidade do anticorpo, e já não é muito utilizado (Dr. E. Purgatto, USP, Dr. M.A. Tiné, IBt, em comunicação pessoal).

Já o uso de Trizol para a extração de RNA nas radículas das sementes de *C. echinata* e *C. peltophoroides* se mostra muito eficiente (Tabela 2), obtendo altas concentrações de RNA com pouco material utilizado. As razões obtidas foram aceitáveis (o ideal é que ficassem

entre 1,8 e 2) indicando que algumas amostras podem estar contaminadas com fenol ou clorofórmio. A corrida do gel em eletroforese evidencia um rastro sobre as amostras que pode ser alguma contaminação do material, mas sem relação com os reagentes da extração (Figura 1). Algumas amostras parecem degradadas, porém esse rastro pode estar mascarando algumas bandas, levando a uma imprecisão da análise. Novas análises são requeridas para avaliar a qualidade do material extraído.

CONCLUSÃO

A metodologia de análise de ABA endógeno em radículas de sementes necessita de adaptações, principalmente na quantidade de material de partida, com maior cuidado na etapa de derivatização e procurando obter amostras bastante concentradas.

A extração de RNA se mostra bastante eficiente, possibilitando obter concentrações elevadas de RNA com pouco material vegetal extraído, sendo apenas necessário analisar possíveis contaminantes que podem estar atrapalhando a análise.

REFERÊNCIAS

- ACKERSON, R.C. 1984a. Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*. 35: 403-413.
- ACKERSON, R.C. 1984b. Abscisic acid and precocious germination in soybeans. *Journal of Experimental Botany*. 35: 414-421.
- BERJAK, P., FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W. 2007. Seed desiccation tolerance mechanisms. In: Jenks M, ed., *Plant desiccation tolerance*. Ames, IO: Blackwell Publishing, in press.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botanica Brasílica* 12: 145-164.
- BARBEDO, C.J., BILIA, D.A.C. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica*. 25: 431-439.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*, 2nd edn. New York: Plenum Press.
- BOCHICCHIO, A., RIZZI, E., BALCONI, C., VERNIERI, P. & VAZZANA, C. 1994. Sucrose and raffinose contents and acquisition of desiccation tolerance in immature maize embryos. *Seed Science Research*. 4: 123-126.
- BORGES, I.F., GIUDICE, J.D., BILIA, D.A.C., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. & BARBEDO, C.J. 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered

- Leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 851-861.
- BORGES, I.F., BARBEDO, C.J., RICHTER, A.A. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2006. Variation in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 18(4): 475-482.
- BRADFORD, K.J. & CHANDLER, P.M. 1992. Expression of 'dehydrin-like' proteins in embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza saliva* during dehydration. *Plant Physiology* 99, 488-94.
- BRAY, E.A., 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103: 1035–1040.
- CHANDLER, P.M. & ROBERTSON, M. 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 45: 113-41.
- CHEN, K., MILLER, A.N., PATTERSON, G.W., COHEN, J.D. 1988. A rapid and simple procedure for purification of indole-3-acetic acid prior to GC-SIM-MS analysis. *Plant Physiology*, v.86, p.822-825.
- CIHA, A.J., BRENNER, M. BRUN, W.A. 1977. Rapid Separation and Quantification of Abscisic Acid from Plant Tissues Using High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiology* 59:821-826.
- CORTE, V.B., BORGES, E.E.L., PONTES, C.A., LEITE, I.T.A., VENTRELLA, M.C., MATHIAS, A.A. 2006. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Revista Árvore, Viçosa, Minas Gerais*, v.30, n.6, p.941-949.
- DOBREV, P.I., HAVLICEK, L., VAGNER, M., MALBECK, J., KAMINEK, M. 2005. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. Volume 1075, Issues 1-2, 20, Pages 159-166.
- FARIA, J.M.R., BUITINK, J., VAN LAMMEREN, A.A.M. & HILHORST, H.W.M. 2005. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *Journal of Experimental Botany*. 56: 2119-2130.
- FIGLIOLIA, M.B., SILVA, A., AGUIAR, I.B., PERECIN, D. 2001. Efeito do acondicionamento e do ambiente de armazenamento na conservação de sementes de sibipiruna. *Revista Brasileira Horticultura Ornamental*, v.7, n.1, p.57-62.
- GARCIA, I.S., SOUZA, A., BARBEDO, C.J., DIETRICH, S.M.C., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L., 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology*. 66(2B):739-745.
- GÓRECKI, R.J., PIOTROWICZ-CIESLAK, A.I., LAHUTA, L.B., OBENDORF, R.L. 1997. Soluble carbohydrates in desiccation tolerance of yellow lupin seeds during maturation and germination. *Seed Sci. Res.* Vol 7:107-115.

- HAN, B., BERJAK, P., PAMMENTER, N., FARRANT, J., KERMODE, A. R. 1997. The recalcitrant plant species, *Castanospermum austral* and *Trichilia dregeana*, differ in their ability to produce dehydrin-related polypeptides during seed maturation and in response to ABA or water-deficit-related stresses. *Journal of Experimental Botany* 314: 1717-17.
- HELLMANN, M.E., MELLO, J.I.O., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. & BARBEDO, C.J. 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 93-101.
- JOHANSON, U. & GUSTAVSSON, S. 2002. A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Mol Biol Evol.* 19: 456–461.
- KALEMBA, E.M., JANOWIAK, F., PUKACKA, S. 2009. Desiccation tolerance acquisition in developing beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds: the contribution of dehydrin-like protein. *Trees*. vol 23: pg. 305–315
- KALDENHOFF, R. & FISCHER, M. 2006. Review: Aquaporins in plants. *Acta Physiol.* 187: 169–176.
- KERMODE, A.R. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of plant growth and regulation*. Vol. 24 pg. 319–344.
- KOZONO, D., DING, X., IWASAKI, I., MENG, X., KAMAGATA, Y., AGRE, P. & KITAGAWA, Y. 2003. Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin. AqpM from *Methanothermobacter marburgensis*. *J Biol Chem.* 278: 10649–10656.
- LE, T.N. & McQUEEN-MASON, S.J. 2006. Desiccation-tolerant plants in dry environments. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5: 269-279.
- LEDUC, S.N.M. 2007. Indução de tolerância à dessecação e variação de carboidratos solúveis em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) durante a maturação. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- LUU, D.T. & MAUREL, C. 2005. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell and Environment.* 28: 85-96.
- MALDINEY, R., LEROUX, B., SABBAGH, I., SOTTA, B., SOSSOUNTZOV, L. MIGINAC, E. 1986. A biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones: auxin, abscisic acid and zeatin-riboside. *Journal of Immunological Methods.* Vol 90, Issue 2, Pages 151-158.
- PARK, J.H. & SAIER, M.H. Jr. 1996. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol.* 153: 171–180.
- SWEETSER, P.B., VATVARS, A. 1976. High-performance liquid chromatographic analysis of abscisic acid in plant extracts. *Analytical Biochemistry* Volume 71, Issue 1, Pages 68-78.
- TARQUIS, A.M. & BRADFORD, K.J. 1992. Prehydration and priming treatments that advance germination also increase the rate of deterioration of lettuce seeds. *Journal of Experimental Botany.* 43: 307-317.

- TETTEROO, F.A.A., BOMAL, C., HOEKSTRA, F.A. & KARSSSEN, C.M. 1994. Effect of abscisic acid and slow drying on soluble carbohydrate content in developing embryoids of carrot (*Daucus carota* L.) and alfafa (*Medicago sativa* L.). *Seed Science Research*. 4: 203-210.
- VICRÉ, M., FARRANT, J.M. & DRIOUICH, A. 2004. Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant, Cell and Environment* 27: 1329-1340.
- WALKER-SIMMONS, M. K., ROSE, P.A, LAWRENCE R.H., ABRAMS, S.R. 2000. Abscisic Acid: ABA Immunoassay and Gas Chromatography/Mass Spectrometry Verification. In: *Plant Hormone Protocols*. Edited by: Tucker, G.A., Roberts, J. A. pag 33-49.
- WILLIGEN, C.V., POSTAIRE, O., TOURNAIRE-ROUX, C., BOURSIAC, Y., MAUREL, C. 2006. Expression and Inhibition of Aquaporins in Germinating *Arabidopsis* Seeds. *Plant Cell Physiology*. 47(9): 1241-1250.
- XU, N., COULTER, K.M. & BEWLEY, J.D. 1990. Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfafa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. *Planta*. 182: 382-390.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados neste trabalho mostram que os mecanismos do processo de tolerância à dessecação nas sementes de *C. echinata* parecem divergir quando comparadas sementes imaturas e maduras tolerantes a dessecação. Bioquimicamente, esse comportamento é caracterizado pelo aumento das proporções de sacarose durante a secagem, utilizando para isso as reservas de amido e de ciclitóis, com provável preferência da utilização da reserva dependendo da maturidade da semente. Além disso, a via biossintética de ciclitóis e dos oligossacarídeos da série da rafinose parecem relacionadas com o processo de tolerância à dessecação nas sementes de pau-brasil, atuando na osmoproteção das membranas no estado seco, ou ainda disponibilizando energia para a manutenção de outros processos metabólicos durante a secagem das sementes.

A aquisição de tolerância à dessecação nas sementes de pau-brasil parece ser influenciada pelo ambiente em que as matrizes estão submetidas, encontrando variações deste processo em sementes de mesma idade, formadas pelas mesmas matrizes, expostas apenas as variações ambientais de um ano a outro. Essa característica já foi evidenciada por Daws *et al* (2004), em sementes de *A. hippocastanum*, porém as diferentes respostas de tolerância à dessecação estavam quando se alterou as latitudes onde as sementes foram formadas. Esse resultado aumenta inclusive a abrangência do conceito de *continnum* (Walters 1998), com sementes categorizadas ortodoxas não sendo igualmente tolerantes à dessecação, mas também diferentes dentro da mesma espécie, na mesma matriz e dependente do ambiente.

A sensibilidade a dessecação das sementes maduras de pau-brasil após a reidratação parece ligada ao avanço do processo de germinação, em etapas onde mesmo o aumento de sacarose não é suficientemente capaz de proteger a semente, evidenciando que outros mecanismos devem estar envolvidos. Além disso, a manutenção da tolerância à dessecação pelas sementes maduras foi diminuindo concomitante ao maior tempo de armazenamento, dessa forma, apresentando relação com o grau de deterioração que se encontra a semente. Assim um lote de sementes de pau-brasil de maior qualidade fisiológica seria capaz de resistir a fortes desidratações mesmo após estar com o processo de germinação avançado.

Dentro do conceito de *continnum*, é interessante notar que no mesmo gênero, o comportamento de tolerância à dessecação pode apresentar diferenças marcantes. Sementes de *C. peltophoroides* toleram ser secas a níveis abaixo de 10% de água, e suportam armazenamento a temperatura ambiente por períodos bem maiores que *C. echinata* (Figliolia

et al., 2001, Barbedo et al., 2002), porém ainda reduzidos quando comparados a outras sementes de comportamento ortodoxo. A semente madura de sibipiruna perde a tolerância à dessecação logo no início do processo de germinação, concomitante a protrusão da raiz primária, enquanto sementes maduras de pau-brasil com 9 mm de raiz primária ainda resistiam a secagem até 10% de água. Entre diferenças claras encontradas no tempo de maturação e nas reservas predominantes em cada espécie, o perfil dos carboidratos solúveis é semelhante, encontrando nas radículas e raízes primárias dessas sementes baixas proporções de rafinose e estaquiose com proporções majoritárias de sacarose e de ciclitóis.

O fato do tratamento de estresse osmótico não ter conseguido induzir ou restabelecer a tolerância à dessecação nas sementes intolerantes indica a necessidade de estudos que caracterizem as modificações que o estresse é capaz de realizar nas sementes e se existe período ideal e preciso para ser feito. Além disso, a análise de outros compostos como o ácido abscísico e o estudo da expressão de genes nas sementes necessitam de otimização de metodologia, principalmente na quantidade de material vegetal a ser utilizado.

São necessários estudos que complementam de maneira mais abrangente o comportamento de tolerância à dessecação dessas espécies, procurando estabelecer relação com os tipos de reservas energéticas que são acumuladas, e como elas são utilizadas para a manutenção deste processo.

REFERÊNCIAS

- ACKERSON, R.C. 1984a. Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*. 35: 403-413.
- ACKERSON, R.C. 1984b. Abscisic acid and precocious germination in soybeans. *Journal of Experimental Botany*. 35: 414-421.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botanica Brasílica* 12: 145-164.
- BARBEDO, C.J., BILIA, D.A.C. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica*. 25: 431-439.
- BERJAK, P. & PAMMENTER, N.W. 2004. Recalcitrant seeds. In: Benech-Arnold RL, Sa'nchez RA, eds. *Handbook of seed physiology: applications to agriculture*. New York: Haworth Press, 305–345.
- BERJAK, P. 2006. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. *Seed Science Research* 16: 1–15.

- BERJAK, P., FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W. 1989. The basis of recalcitrant seed behaviour. In: Taylorson RB, ed. Recent advances in the development and germination of seeds. New York: Plenum Press, 89–108.
- BERJAK, P., FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W. 2007. Seed desiccation tolerance mechanisms. In: Jenks M, ed., Plant desiccation tolerance. Ames, IO: Blackwell Publishing, in press.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Review: From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. *Annals of Botany*, v. 101, p. 213-228, 2008.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Seed recalcitrance - current perspectives. *South African Journal of Botany*, v. 67, p. 79-89, 2001.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds. Physiology of development and germination, 2nd edn. New York: Plenum Press, 1994.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVEMBRE, A.D.C.L. 1999. Desiccation tolerance and seed storability of *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Seed Science and Technology* 27: 77-89.
- BLACK, M. & PRICHARD, H.W. 2002. Desiccation and survival in plants: drying without dying. CABI Publishing, Wallingford.
- BLACK, M., CORBINEAU, F., GEE, H. & CÔME, D. 1999. Water content, raffinose and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology*. 120: 463-471.
- BOCHICCHIO, A., RIZZI, E., BALCONI, C., VERNIERI, P. & VAZZANA, C. 1994. Sucrose and raffinose contents and acquisition of desiccation tolerance in immature maize embryos. *Seed Science Research*. 4: 123-126.
- BONJOVANI, M.R. & BARBEDO, C.J. 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. *Revista Brasileira de Botânica*. v.32, n.2, p.345-356.
- BORGES, I.F., BARBEDO, C.J., RICHTER, A.A. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2006. Variation in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 18(4): 475-482.
- BORGES, I.F.; GIUDICE, J.D.; BILIA, D.A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; BARBEDO, C.J. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered Leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 851-861, 2005.
- BOTANIC GARDENS CONSERVATION INTERNATIONAL. 2001. Normas internacionais de conservação para jardins botânicos. Rio de Janeiro: Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede brasileira de Jardins Botânicos/Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC.
- BRADFORD, K.J. & CHANDLER, P.M. 1992. Expression of 'dehydrin-like' proteins in embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza saliva* during dehydration. *Plant Physiology* 99, 488-94.

- BRAY, E.A., 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103: 1035–1040.
- BRYANT, G., KOSTER, K.L., WOLFE, J. 2001. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Science Research* 11: 17–25.
- BUITINK, J., HOEKSTRA, F.A., LEPRINCE, O. 2002. Biochemistry and biophysics of tolerance systems. In: Black M, Pritchard HW, eds. *Desiccation and survival in plants. Drying without dying*. Wallingford, Oxon: CABI Publishing, 293–318.
- BUITINK, J.; VU, B.L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. *Seed Science Research*, v. 13, p. 273-286, 2003.
- CASTRO, Y.G.P. & KRUG, H.P. 1951. Experiências sobre germinação e conservação de sementes de *Inga edulis*, espécie usada em sombreamento em cafeeiros. *Ciência e Cultura* 3: 263-264.
- CHANDLER, P.M. & ROBERTSON, M. 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 45: 113-41.
- CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.A.; VENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A.A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Revista Árvore*, v.30, n.6, p.941-949, 2006.
- CUMING, A.C. 1999. LEA proteins. In: Shewry PR, Casey R, eds. *Seed proteins*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 753–779.
- CUNHA, M.W.; LIMA, H.C. Viagem a terra do pau-brasil. Agência Brasileira de Cultura, Rio de Janeiro, 1992.
- DAWS, M.I., CLELAND, H., CHMIELARZ, P., GORIAN, F., LEPRINCE, O., MULLINS, C.E. 2006. Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? *Functional Plant Biology* 33: 59–66.
- DAWS, M.I., CRABTREE, L.M., DALLING, J.W., MULLINS, C.E., BURSLEM, D.F.R.P. 2008. Germination Responses to Water Potential in Neotropical Pioneers Suggest Large-seeded Species Take More Risks. *Annals of Botany*. pg 1-7.
- DAWS, M.I., LYDALL, E., CHMIELARZ, P., LEPRINCE, O., MATTHEWS, S., THANOS, C.A., PRITCHARD, H.W. 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157–166.
- DEAN, W. A ferro e fogo: a história e a devastação da mata atlântica brasileira. Companhia das Letras, São Paulo, 484p, 1996.
- DUSSERT, S., CHABRILLANGE, N., ENGELMANN, F., ANTHONY, F., LOUARN, J., HAMON, S. 2000. Relationship between seed desiccation sensitivity, seed water content at maturity and climatic characteristics of native environments on nine *Coffea* species. *Seed Science Research* 10: 293–300.
- ELLIS, R.H.; MAI-HONG, T.; HONG, T.D.; TAN, T.T.; XUAN-CHUONG, N.D.; HUNG, L.Q.; NGOC-TAM, B.; LE-TAM, V.T. Comparative analysis by protocol and key of seed storage

- behaviour of sixty Vietnamese tree species. *Seed Science and Technology*, vol. 35, n. 2, p. 460-476, 2007.
- FARIA, J.M.R., BUITINK, J., VAN LAMMEREN, A.A.M. & HILHORST, H.W.M. 2005. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *Journal of Experimental Botany*. 56: 2119-2130.
- FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W., BERJAK, P. 1986. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. *Physiologia Plantarum* 67: 291–298.
- FARRANT, J.M.; BAILLY, C.; LEYMARIE, J.; HAMMAN, B.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Wheat seedlings as a model to understand desiccation tolerance and sensitivity. *Physiologia Plantarum*, v. 120, p. 563-574, 2004.
- FIGLIOLIA, M.B.; SILVA, A.; AGUIAR, I.B.; PERECIN, D. Efeito do acondicionamento e do ambiente de armazenamento na conservação de sementes de sibipiruna. *Revista Brasileira Horticultura Ornamental*, v.7, n.1, p.57-62, 2001.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE (Instituto nacional de pesquisas espaciais). Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995–2000. Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, São Paulo, 2001.
- GARCIA, I.S., SOUZA, A., BARBEDO, C.J., DIETRICH, S.M.C., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L., 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology*. 66(2B):739-745.
- GASPAR, M., BOUSSER, A., SISOEF, I., ROCHE, O., HOARAU, J., MAHÉ, A. 2003. Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporin transporting water and urea. *Plant Science* 165: 21-31.
- HALPERIN, S.J., KOSTER, K.L. 2006. Sugar effects on membrane damage during desiccation of pea embryo protoplasts. *Journal of Experimental Botany* 57: 2303–2311.
- HAN, B., BERJAK, P., PAMMENTER, N., FARRANT, J., KERMODE, A. R. 1997. The recalcitrant plant species, *Castanospermum australe* and *Trichilia dregeana*, differ in their ability to produce dehydrin-related polypeptides during seed maturation and in response to ABA or water-deficit-related stresses. *Journal of Experimental Botany* 314: 1717-17.
- HELLMANN, M.E., MELLO, J.I.O., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. & BARBEDO, C.J. 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 93-101.
- HOEKSTRA, F.A., GOLOVINA, E.A. & BUITINK, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*. 6: 431-438.
- HONG, T.D. & ELLIS, R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. Rome, IPGRI. 62p. (Technical Bulletin, 1).
- HONG, T.D., ELLIS, R.H. 1990. A comparison of maturation drying, germination and desiccation tolerance between developing seeds of *Acer pseudoplatanus* L. and *Acer platanoides* L. *New Phytologist* 116:589–596.

- HORBOWICZ, M., BRENAC, P. & OBENDORF, R. L. 1998. Fagopyritol B1, O- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-*chiro*- inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta*. 205: 1-11.
- JOHANSON, U. & GUSTAVSSON, S. 2002. A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Mol Biol Evol*. 19: 456–461.
- KALDENHOFF, R. & FISCHER, M. 2006. Review: Aquaporins in plants. *Acta Physiol*. 187: 169–176.
- KALEMBA, E.M.; JANOWIAK, F.; PUKACKA, S. Desiccation tolerance acquisition in developing beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds: the contribution of dehydrin-like protein. *Trees*, v 23, p. 305–315, 2009.
- KERMODE, A.R. & FINCH-SAVAGE, B.E. 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *In* Desiccation and survival in plants: drying without dying (M. Black & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing. New York. 149-184.
- KERMODE, A.R. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of plant growth and regulation*, v. 24, p. 319–344, 2005.
- KIDD, F. 1914. The controlling influence of carbon dioxide in the maturation, dormancy and germination of seeds. *Proc.R.Soc., London*, v.7, n.1, pt.1, p.408-421.
- KOSTER, K.L., BRYANT, G. 2005. Dehydration in model membranes and protoplasts: contrasting effects at low, intermediate and high hydrations. *In*: Chen THH, Uemura M, Fujikawa S, eds. Cold hardiness in plants: molecular genetics, cell biology and physiology. Wallingford, UK: CAB International, 219–234.
- KOZONO, D., DING, X., IWASAKI, I., MENG, X., KAMAGATA, Y., AGRE, P. & KITAGAWA, Y. 2003. Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin. AqpM from *Methanothermobacter marburgensis*. *J Biol Chem*. 278: 10649–10656.
- LE, T.N. & McQUEEN-MASON, S.J. 2006. Desiccation-tolerant plants in dryenvironments. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*. 5: 269-279.
- LEDUC, S.N.M. 2007. Indução de tolerância à dessecação e variação de carboidratos solúveis em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) durante a maturação. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- LEWIS, G.P. 1998. *Caesalpinia*. A Revision of the Poincianella-Erythrostemon group. Royal Botanic Gardens, Kew.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa, 1992.
- LUU., D.T. & MAUREL, C. 2005. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell and Environment*. 28: 85-96.
- MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba, 495p. 2005.
- OBENDORF, R.L. 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7: 63-74.

- PARK, J.H. & SAIER, M.H. Jr. 1996. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol.* 153: 171–180.
- PETERBAUER, T. & RICHTER, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science. Research* 11: 185-197.
- PRITCHARD, H.W.; DAWS, M.I.; FLETCHER, B.J.; GAMENE, C.S.; MSANGA, H.P.; OMONDI, W. Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees. *American Journal of Botany*, v. 91, n. 6, p. 863–870, 2004.
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science & Technology* 1:499-514.
- ROCHA, Y.T. 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SANTANA, J.R.F.S., SANTOS, G.M.M. Arborização do Campus da UEFS: exemplo a ser seguido ou um grande equívoco. *Sitientibus, Feira de Santana, Bahia* v. 20, p. 103-107, 1999.
- STEADMAN, K.J., BURGOON, M.S., SCHUSTER, R.L., LEWIS, B.A., EDWARDSON, S.E. & OBENDORF, R.L. 2000. Fagopyritols, *D-chiro*-inositol and other soluble carbohydrates in buckwheat seed milling fractions. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2843-2847.
- STEADMAN, K.J., PRITCHARD, H.W., DEY, P.M. 1996. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany* 77: 667–674.
- TARQUIS, A.M. & BRADFORD, K.J. 1992. Prehydration and priming treatments that advance germination also increase the rate of deterioration of lettuce seeds. *Journal of Experimental Botany.* 43: 307-317.
- TETTEROO, F.A.A., BOMAL, C., HOEKSTRA, F.A. & KARSSSEN, C.M. 1994. Effect of abscisic acid and slow drying on soluble carbohydrate content in developing embryoids of carrot (*Daucus carota* L.) and alfafa (*Medicago sativa* L.). *Seed Science Research.* 4: 203-210.
- UEHLEIN, N., LOVISOLO, C., SIEFRITZ, F. & KALDENHOFF, R. 2003. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature.* 425: 734–737.
- VICRÉ, M., FARRANT, J.M. & DRIOUICH, A. 2004. Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant, Cell and Environment* 27: 1329-1340.
- WALTERS, C. 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12 (edição especial): 7-21.
- WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research*, v. 8, p. 223–244, 1998.
- WALTERS, C.; FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Desiccation and Damage. *In*: Black M, Pritchard HW (eds.). *Desiccation and Survival in Plants. Drying Without Dying.* CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 263–291, 2002.

- WILLIGEN, C.V., POSTAIRE, O., TOURNAIRE-ROUX, C., BOURSIAC, Y., MAUREL, C. 2006. Expression and Inhibition of Aquaporins in Germinating *Arabidopsis* Seeds. *Plant Cell Physiology*. 47(9): 1241-1250.
- XU, N.; COULTER, K.M.; BEWLEY, J.D. Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfafa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. *Planta*, v. 182, p. 382-390, 1990.
- ZINK, E. & ROCHELLE, L.A. 1964. Estudos sobre a conservação de sementes. XI - Cacau. *Bragantia* 23: 111-116.