



unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



METABOLISMO DE SEMENTES DE *Annona emarginata* (Schltdl.)

H. Rainer DURANTE TRATAMENTOS DE IMERSÃO EM
SOLUÇÕES AQUOSAS

JULIANA IASSIA GIMENEZ

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, UNESP, *Campus* de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas (Botânica),
AC: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU - SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

METABOLISMO DE SEMENTES DE *Annona emarginata*
(Schltdl.) H. Rainer DURANTE TRATAMENTOS DE
IMERSÃO EM SOLUÇÕES AQUOSAS

JULIANA IASSIA GIMENEZ

PROF^a DR^a GISELA FERREIRA
ORIENTADORA

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, UNESP, *Campus* de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas (Botânica),
AC: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU - SP

2016

JULIANA IASSIA GIMENEZ

**METABOLISMO DE SEMENTES DE *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer
DURANTE TRATAMENTOS DE IMERSÃO EM SOLUÇÕES AQUOSAS**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, UNESP, *Campus* de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas (Botânica),
AC: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

Aprovado em: 26/02/2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dr^a Gisela Ferreira

Prof. Dr. Massanori Takaki

Profa Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira

Prof. Dr. Iván de La Cruz Chacón

Prof. Dr. Edvaldo Ap. Amaral da Silva

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gimenez, Juliana Iassia.

Metabolismo de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.)
H. Rainer durante tratamentos de imersão em soluções
aquosas / Juliana Iassia Gimenez. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Gisela Ferreira

Capes: 20303009

1. Anonácea. 2. Sementes - Desenvolvimento. 3. Métodos
de embebição. 4. Ácido abscísico. 5. Botânica -
Embriologia. 6. Germinação.

Palavras-chave: Ácido abscísico; Annonaceae; Degradação de
reservas; Embebição; Respiração; Sistema antioxidante.

*“Vá firme na direção das suas metas,
porque o pensamento cria, o desejo atrai e a fé realiza”*

Lauro Trevisan

*Dedico aos meus pais, Maria de Lourdes e José,
por amparar, confiar e cativar.*

Agradecimentos

Agradeço à Deus pela vida e oportunidades de crescimento, pela minha família e meus amigos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Doutorado (Processo 2012/24013-1).

À minha orientadora Profa Dra Gisela Ferreira, a quem sou muito grata pela amizade, ensinamentos e confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Norberto da Silva, pela acolhida, incentivo e apoio no começo desta jornada.

À Profa Dra Carmen Silvia Fernandes Boaro (Depto Botânica), Prof. Dr. Iván de La Cruz Chacón (UNICACH, México), Prof. Dr. Raoul Henry (Depto Zoologia), Prof. Dr. Fernando Broetto e Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha (Depto Química) pelo auxílio e contribuições para o desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Alaor Almeida (CEATOX), Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini (NUPAM), Profa Dra Wilma de Grava Kempinas (Depto Morfologia), Profa Dra Tatiane Maria Rodrigues (Laboratório de Anatomia – Depto Botânica), Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida (Laboratório de Ecofisiologia – Depto Botânica), Profa Dra Elza Guimarães (Laboratório de Ecologia – Depto Botânica), Prof. Dr. João Domingos Rodrigues e Profa Dra Elizabeth Orika Ono (Laboratório de Enzimas – Depto Botânica) por gentilmente cederem laboratórios e/ou equipamentos.

À Profa Dra Denise Maria Trombert de Oliveira e à Profa Dra Silvia Rodrigues Machado pelo auxílio e orientações na realização das análises ultraestruturais.

Ao Thiago Gianeti (NUPAM), Fábio Iachel (CEATOX), Claudete Tardivo e Carolina Massucci (Centro de Microscopia Eletrônica), José Eduardo Bozano (Depto Morfologia) e Nathália Arias Galastri (FATEC) pela ajuda e dedicação na realização de análises.

À Metrohm, por intermédio de Marcelo Giglioti, por disponibilizar prontamente equipamentos para a realização das análises de perfil de açúcares.

À Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) de São Bento do Sapucaí – SP, especialmente à Dra. Silvana Catarina Sales Bueno e o Eng. Agrônomo Amélio José Berti, pelo fornecimento de frutos.

À Universidade Estadual Paulista – UNESP pela oportunidade de realizar esta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação por todo o auxílio no decorrer do curso.

Às funcionárias da biblioteca, Márcia, Niva, Rosângela e Rose por toda a ajuda prestada, com muita dedicação e paciência.

Aos funcionários do Departamento de Botânica, especialmente à Inara, José Eduardo e Maria Helena.

À Amanda, Magnum e Samanta pela disponibilidade e dedicação em laboratório, além do aprendizado, das muitas risadas e da amizade construída.

A todos estagiários que colaboraram com as diversas etapas deste trabalho, em especial à Ana Clara, Andressa, Luana, Lucas, Mayumi, Rafaella, Talita e Vinicius.

Aos amigos da Pós-Graduação que colaboraram com este trabalho, compartilharam sonhos e momentos de descontração: Ana Claudia, Angélica, Angelo, Bruno, Camila Braga, Camila Vaz, Daniel, Danilo, Fabio, Felipe, Jane, Jennifer, João Paulo, Juliana Lima, Luís Paulo, Marcela, Natália, Ricardo, Roberto, Rubiana, Sérgio e Thayssa.

À minha família, meu porto seguro! Agradeço aos meus pais Maria de Lourdes e José Gimenez, pelos valores de caráter transmitidos, confiança, apoio e incentivo em todos os momentos. Aos meus irmãos Valdir e Wando, e minhas cunhadas Izabel e Silvia, pelo apoio, amizade e carinho. Às minhas sobrinhas que são meu sopro de ânimo e perseverança. Amo vocês!

Às minhas irmãs de coração, Jana e Rita, pelo apoio, cumplicidade e amizade incondicional.

Aos amigos Ana Claudia Guimarães, Cristiane Martinez, Eliete Silva, Érica Serrano, Flávia Vieira, Gisele de Oliveira, Paula Martins, Rodrigo Gonçalves, Ronaldo Felitti, Susiane Moura, e também meus primos, Ana, Michel, Rita e Fabio, os quais sempre enviaram boas energias e vibraram com cada conquista.

Quanto mais a gente agradece, mais coisas boas acontecem!

Gratidão

Sumário

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Família Annonaceae	5
2.1.1. A espécie <i>Annona emarginata</i> (Schltdl.) H. Rainer	6
2.2. Germinação: aquisição de água e metabolismo	7
2.3. Tratamentos pré-germinativos	10
2.4. Disponibilidade de oxigênio durante o processo germinativo.....	12
3. CAPÍTULO I – Redução da disponibilidade de oxigênio durante a embebição de sementes de <i>Annona emarginata</i> (Schltdl.) H. Rainer: metabolismo e germinação.....	19
Resumo	20
Introdução	21
Material e Métodos	23
Resultados	28
Discussão	31
Referências	36
Tabelas e Figuras	42
4. CAPÍTULO II – Embebição lenta causa danos ultraestruturais e alterações no metabolismo de sementes de <i>Annona emarginata</i> (Schltdl.) H. Rainer?	51
Resumo	52
Introdução	53
Material e Métodos	55
Resultados	58

Discussão	60
Referências	64
Tabelas e Figuras	69
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

GIMENEZ, J.I. **METABOLISMO DE SEMENTES DE *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer DURANTE TRATAMENTOS DE IMERSÃO EM SOLUÇÕES AQUOSAS.** 2016. 86p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Botânica) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO – O presente estudo objetivou avaliar como a imersão de sementes até atingirem determinados teores de água durante a embebição altera o metabolismo e a germinabilidade. Sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer inicialmente com 10% de água foram submetidas à embebição entre papel umedecido com água ou sob imersão em Ψ_w 0 MPa ou em Ψ_w -1,2 MPa até atingirem os teores de 15%, 20% e 35% de água. Durante os tratamentos foram monitorados o teor de água, produção de etanol e a atividade respiratória das sementes. À medida que as sementes atingiram os teores de água foram retiradas dos tratamentos para as análises: teste de germinação, análise anatômica e ultraestrutural do embrião, quantificação de açúcares solúveis totais e perfil (glicose, frutose e sacarose), amido, proteínas solúveis totais e perfil (albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas), lipídeos totais e hormônios vegetais (ABA e IAA), atividade de enzimas antioxidantes (Superóxido Dismutase, Catalase e Peroxidase) e peroxidação de lipídeos. À medida que os teores de água foram alcançados ao longo do tempo de imersão até completar a embebição (final da fase I) ocorreu a redução na disponibilidade de oxigênio (hipoxia) cujos níveis críticos provocaram danos metabólicos (alterações na atividade respiratória, no perfil hormonal (ABA/IAA), na degradação de reservas e no sistema antioxidante) e ultraestruturais, que resultaram em decréscimo da germinabilidade demonstrando intolerância à hipoxia pelas sementes de *A. emarginata*. Conclui-se que o fator limitante durante a embebição de sementes em soluções aquosas e que pode auxiliar a definir o tempo de imersão é a determinação do nível crítico de disponibilidade de oxigênio, a fim de evitar danos irreversíveis que resultem em redução da germinabilidade.

Palavras-chave: Ácido Abscísico, Annonaceae, Degradação de reservas, Embebição, Respiração, Sistema Antioxidante.

GIMENEZ, J.I. **METABOLISM OF *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer SEEDS DURING IMMERSION TREATMENTS IN AQUEOUS SOLUTIONS.** 2016. 86p. Thesis (Doctor degree in Biological Sciences/Botany) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ABSTRACT – The present study aimed to assess how seed immersion until they reach different water contents during the imbibition phase changes its metabolism and germination. Seeds of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer initially with 10% of water content were imbibed on moistened paper or immersed in Ψ_w 0 MPa or in Ψ_w -1.2 MPa until they reach 15%, 20% and 35% threshold of water content. Seed water content, ethanol production and respiration were monitored during treatments. When achieved each water content threshold, seeds were removed and the following analysis carried on: germination test, embryo anatomy and ultrastructure, quantification of total soluble sugars and profile (albumin, globulin, glutelin and prolamin), total lipids and plant hormones (ABA and IAA), antioxidant enzymes activity (Superoxide dismutase, Catalase and Peroxidase) and lipid peroxidation. Oxygen availability was reduced (hypoxia) as water content thresholds were achieved throughout immersion time until complete imbibition (end of phase I), these critical levels caused metabolic (changes in respiratory activity, hormone profile (ABA/IAA), reserve degradation and antioxidant system) and ultrastructural damages, which resulted in germination decrease demonstrating that *A. emarginata* seeds are hypoxia intolerant. It can be concluded that the limiting factor during imbibition in aqueous solutions is the assessment of critical level of oxygen availability, which might help to define the limit for immersion time in order to avoid irreversible damage that results in decreased germinability.

Key words: Absciscic acid, Annonaceae, Antioxidant system, Degradation of reserves, Imbibition, Respiration.

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse pela produção de mudas de espécies nativas para fins medicinais, indústria alimentícia e para programas de reflorestamento tem aumentado a demanda de informações a respeito da fisiologia da germinação e cultivo destas espécies (ATAÍDE et al., 2013). Deste modo, técnicas que envolvem a imersão das sementes em soluções aquosas como o tratamento com reguladores vegetais (BRAGA et al., 2010; SOCOLOWSKI; CICERO, 2011) e o condicionamento osmótico (SOUZA et al., 2011; SHARMA et al., 2014) têm sido amplamente utilizadas para a promoção e sincronização da germinação.

No entanto, em muitos trabalhos a determinação do tempo de imersão das sementes nas soluções é realizada de modo aleatório ou com base no tempo necessário para a mudança da fase I para a fase II da curva de aquisição de água. Deste modo, por não se considerar as características dos processos metabólicos que são ativados durante a embebição, diferentes respostas germinativas são obtidas e podem estar relacionadas com os teores de água atingidos pelas sementes. Enquanto a imersão por curtos períodos pode não hidratar os tecidos de modo suficiente para a reativação metabólica (BEWLEY et al., 2013), por outro lado, a imersão por longos períodos pode submeter as sementes a menor disponibilidade de oxigênio (BAILEY-SERRES et al., 2012), ambas as situações resultando em baixa germinabilidade. A redução na disponibilidade de oxigênio no meio pode provocar alterações na atividade respiratória (BANTI et al., 2013), nos níveis de hormônios como o ABA (MILLAR et al., 2006) e no estresse oxidativo (JALEEL et al., 2007).

A espécie utilizada neste estudo foi a *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, conhecida popularmente como araticum-de-terra-fria, a qual apresenta elevada importância para a recuperação de áreas degradadas e como porta-enxerto para espécies comerciais do gênero *Annona*, como a fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.), a atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) e a graviola (*Annona muricata* L.) (TOKUNAGA, 2000 apud

SCALOPPI JR; MARTINS, 2014). No entanto, as sementes desta espécie possuem germinação lenta e desuniforme (COSTA et al., 2011) e quando imersas até o fim da fase de embebição, apresentam redução da germinabilidade (GIMENEZ et al., 2014).

Deste modo, considerando a ampla utilização de tratamentos pré-germinativos de imersão de sementes em soluções aquosas e o fato do tempo de imersão ser quase sempre determinado sem considerar o metabolismo das sementes, este trabalho teve como objetivo avaliar como a imersão de sementes até atingirem determinados teores de água, durante a embebição, altera o metabolismo e a germinabilidade de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Annonaceae

A família Annonaceae Juss. junto às famílias Magnoliaceae Juss., Myristicaceae R. Br., Degeneriaceae I.W. Bailey e A.C. Sm., Eupomatiaceae Orb. e Himantandraceae Diels compõe a ordem Magnoliales Juss. ex Bercht. e J. Presl, pertencente ao clado das Magnoliídeas, grupo basal das Angiospermas (APG III, 2009). Esta família tem distribuição predominantemente tropical, com aproximadamente 110 gêneros e 2400 espécies (RAINER; CHATROU, 2006 apud CHATROU et al., 2012).

No território brasileiro estão registrados 29 gêneros e aproximadamente 392 espécies, com ocorrência em praticamente todas as formações naturais (MAAS et al., 2016a). No Brasil, destacam-se as espécies do gênero *Annona* que são cultivadas comercialmente, tais como a *Annona squamosa* L. (fruta-do-conde) e o híbrido *Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L. (atemoia) cujos frutos são comercializados para consumo *in natura* e a *Annona muricata* L. (graviola) que é utilizada na produção de polpa industrializada (SCALOPPI JR; MARTINS, 2014). Dentre as espécies nativas destaca-se a *Annona crassiflora* Mart. encontrada principalmente em áreas de cerrado, cujos frutos são consumidos *in natura* devido à polpa doce e saborosa, também utilizada no preparo de licores, doces, sorvetes, entre outros (SILVA et al., 2001).

O interesse em Annonaceae vem se expandindo em função da grande diversidade de substâncias sintetizadas em seu metabolismo secundário, tais como acetogeninas (RAGASA et al., 2012), alcalóides (DE LA CRUZ-CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012) e óleos essenciais (CAMPOS et al., 2014). Desta forma, muitos são os estudos desenvolvidos demonstrando a atividade biológica destas substâncias, tais como o potencial alelopático em *A. glabra* (MATSUMOTO et al., 2010), atividade citotóxica e antimicrobiana em *A.*

vepretorum (ALMEIDA et al., 2014) e atividade antioxidante em *A. crassiflora* (LUZIA; JORGE, 2013).

O crescente interesse em Annonaceae demanda a produção de mudas de qualidade e, neste contexto, os porta-enxertos para espécies comerciais assim como as mudas utilizadas em programas de reflorestamento são comumente obtidos por meio de sementes. No entanto, a família Annonaceae apresenta espécies com sementes de baixo índice germinativo, muitas vezes devido à presença de dormência (VIEIRA; IRBER, 1996).

Os principais relatos de dormência na família Annonaceae se referem à dormência fisiológica ou morfofisiológica. Para a espécie *Annona crassiflora* Mart., Rizzini (1973) relata que a baixa porcentagem de germinação é consequência da presença de embrião imaturo (dormência morfológica), ao passo que Silva et al. (2007) afirmam que a dormência é do tipo morfofisiológica, ou seja, além da imaturidade do embrião a dormência é causada pelo balanço hormonal entre promotores e inibidores da germinação. Nas espécies *Annona diversifolia* Saff. e *Annona purpurea* Moc. e Sessé ex Dunal, Ferreira et al. (2014) afirmam que a dormência ocorre em função do balanço hormonal entre promotores e inibidores da germinação, semelhante ao observado para a espécie *A. crassiflora*.

2.1.1. A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer

A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, sinonímia de *Rollinia* sp (RAINER, 2007) e conhecida popularmente como araticum-de-terra-fria, é nativa do território brasileiro sendo encontrada desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, com ocorrência natural em altitudes de 950 metros, em vegetações de cerrado (*lato sensu*), floresta ombrófila (pluvial) e restinga (MAAS et al., 2016b). Apresenta folhas lanceoladas e lisas com bastante brilho na parte superior, flores em forma de hélice, perfumadas, de coloração creme, e florescimento entre os meses de setembro e dezembro. O período de frutificação ocorre entre

os meses de dezembro e março, sendo os frutos cordiformes e lisos com grande variação no tamanho, apresentando em média 4 cm de diâmetro, 3 cm de altura, 50 gramas e, aproximadamente, 40 sementes (MAAS et al., 2001; LORENZI, 2009).

Esta espécie tem sido indicada como alternativa de porta-enxerto para as espécies comerciais do gênero *Annona* (TOKUNAGA, 2000; SCALOPPI JR; MARTINS, 2014). O interesse como porta-enxerto reside na tolerância às podridões de raízes e colo (*Phytophthora nicotianae* var. parasítica e *Pythium* sp.), coleobrocas (*Cratosomus bombina*) e fungos presentes no solo, comportando-se bem em solos secos ou encharcados (BONAVENTURE, 1999). Além disso, apresenta boa compatibilidade na enxertia com a copa atemoia (*Annona cherimola* x *A.squamosa*) e cherimoia (*Annona cherimola* Mill), promovendo maiores índices de sobrevivência, comprimento de ramos e número de folhas (ALMEIDA et al., 2010). Apesar das vantagens no emprego desta espécie como porta-enxerto, problemas com a formação de mudas ocorrem em função da baixa porcentagem e desuniformidade de germinação (COSTA et al., 2011).

2.2. Germinação: aquisição de água e metabolismo

A germinação compreende os eventos que se iniciam com a reativação do metabolismo de sementes quiescentes ortodoxas que havia sido reduzido nas fases finais do desenvolvimento. Este processo de reativação do metabolismo é inicialmente determinado pela aquisição de água, o qual leva ao desenvolvimento e/ou alongamento do eixo embrionário e, conseqüentemente, à protrusão da radícula (WEITBRECHT et al., 2011). Vale ressaltar que, a atividade metabólica da semente está diretamente relacionada ao seu teor de água, visto que a captação de quantidade considerável de água é imprescindível para o reinício das atividades metabólicas da semente após a maturação. Neste contexto, de modo geral, o processo de aquisição de água segue um padrão trifásico (BEWLEY et al., 2013).

A fase I, ou fase de embebição, é dirigida pelo gradiente de potencial hídrico (Ψ_w) entre a semente e o seu ambiente, considerando que a água movimenta-se sempre do maior para o menor potencial hídrico (WEITBRECHT et al., 2011). Dentre os componentes do potencial hídrico que atuam nesta fase, o potencial matricial (Ψ_m) é o de maior importância, por estar relacionado com a capacidade de adsorção da água. Desta forma, esta fase pode ocorrer em qualquer material, vivo ou morto, que contenha sítios de ligação ou de afinidade pela água (KRISHNAN et al., 2014).

Esta fase é a mais crítica do processo germinativo, pois o elevado gradiente de potencial hídrico entre a semente e o ambiente causa a rápida entrada de água na semente, não havendo tempo suficiente para que ocorra a transição da membrana do ‘estado de gel’ (menos fluido) para o ‘estado cristalino líquido’ (mais fluido) (CASTRO; HILHORST., 2004; CORBINEAU, 2012). O realinhamento incompleto e/ou incorreto da bicamada de fosfolípidos, causa danos na membrana tais como obstruções (HOEKSTRA et al., 1999), que permitem a lixiviação de conteúdos celulares, afetando posteriormente a germinação. Estes danos causados à membrana celular são denominados na literatura como “dano de embebição”.

Na fase I se inicia a degradação de substâncias de reserva, sendo estas, quebradas em substâncias de menor tamanho, facilitando o transporte (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). A atividade respiratória aumenta rapidamente com a embebição, a partir de teores de água em torno de 20% (PATANÈ et al., 2006). O acúmulo de ATPs segue a atividade respiratória aeróbica, sendo requerido para processos que exigem energia associados ao crescimento do embrião. Além disso, a síntese de proteínas e ácidos nucleicos é iniciada, utilizando RNAs mensageiros recém-sintetizados (CASTRO; HILHORST., 2004).

A duração desta fase pode variar em função das reservas da semente, da natureza e composição do tegumento, bem como do ambiente no qual a semente está situada (SORIANO

et al., 2011). As variações na duração da fase I são observadas até mesmo entre espécies de mesmo gênero, como é o caso de *Annona*. Em sementes de *A. cherimola* x *A. squamosa* a mudança entre as fases I e II ocorre após 27 horas de embebição em água (FERREIRA et al., 2006), enquanto em *A. squamosa* a mudança entre as fases I e II ocorre com menor tempo de embebição, 5 horas (FERREIRA et al., 1997). Em outras espécies a fase I pode ser ainda mais lenta, como nas espécies *A. diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc. & Sessé Ex Dunal, nas quais Ferreira et al. (2014) observaram o término da fase I após 50 e 70 horas de imersão em água, respectivamente. Em *A. emarginata*, Costa et al. (2011) observaram o fim da fase I após 60 horas de imersão em água, utilizando sementes com teor inicial de água em torno de 23%. Por outro lado, Gimenez et al. (2014) observaram nesta mesma espécie, que a mudança entre as fases I e II ocorreu após 109 horas de imersão em água, momento no qual as sementes atingiram teor de água em torno de 35,2%. Vale salientar que estes autores utilizaram sementes com teor de água inicial de 10%, e não 23% como Costa et al. (2011), o que fez com que as sementes levassem mais tempo para atingir a fase II.

A fase II se inicia quando ocorre a estabilização da entrada de água na semente, a qual se mantém relativamente constante ou aumentando pouco e lentamente (CASTRO; HILHORST., 2004). Nesta fase é observada a síntese de novos mRNAs e proteínas (BEWLEY et al., 1997 apud GIMENO-GILLES et al., 2009), enquanto as substâncias quebradas na fase I são transportadas do tecido de reserva para o tecido meristemático (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; BEWLEY et al., 2013). Ao fim desta fase a semente se prepara para iniciar o crescimento do embrião, o qual em espécies como *Arabidopsis thaliana*, *Brassica oleracea* e *Medicago truncatula* envolve apenas o alongamento celular, enquanto em outras espécies também ocorrem divisões celulares (SLIWINSKA et al., 2009; WEITBRECHT et al., 2011).

Na fase III as substâncias que foram transportadas na fase II são reorganizadas em substâncias complexas para formar o protoplasma e paredes celulares, promovendo o crescimento do eixo embrionário (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; BEWLEY et al., 2013). Esta fase é marcada por um novo aumento no conteúdo de água da semente, o qual acontece devido à absorção associada com o início do crescimento do embrião (CASTRO; HILHORST, 2004). Portanto, atingindo a fase III tem fim o processo germinativo, com a emissão da raiz primária e o início do desenvolvimento da plântula (HADAS, 1976).

2.3. Tratamentos pré-germinativos

Em decorrência da dormência e baixa taxa germinativa de várias espécies, estudos são realizados buscando tratamentos eficazes a fim de promover o aumento da germinabilidade. Neste contexto, técnicas como a imersão das sementes em reguladores vegetais (AMARO et al., 2009; BRAGA et al., 2010; SOCOLOWSKI; CICERO, 2011) ou em soluções osmóticas (VARIER et al., 2010; ANESE et al., 2011; SOUZA et al., 2011) têm sido amplamente utilizadas.

Os relatos de dormência na família Annonaceae sustentam trabalhos com o emprego de reguladores vegetais, tais como o ácido giberélico (GA_3) em sementes de *Annona diversifolia* (CAMPBELL; POPENOE, 1968), *Annona squamosa* (FERREIRA et al., 2002; STENZEL et al., 2003; SOUSA et al., 2008), *Annona reticulata* (VALENZUELA; OSÓRIO, 1998), *Annona cherimola* (JUBES et al., 1975; SMET et al., 1999), *Annona crassiflora* (BERNARDES et al., 2007; CAVALCANTE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009), *Annona cherimola* x *A. squamosa* (OLIVEIRA et al., 2010) e *Annona mucosa* (SANTOS et al., 2009). Ou ainda, a combinação de reguladores GA_{4+7} + N-(fenilmetil)-aminopurina (Promalin®) em sementes de *Xylopia aromatica* (SOCOLOWSKI; CICERO, 2011), *Annona diversifolia* Saff. e *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal (FERREIRA, 2011).

Em sementes de *Annona cherimola* x *A.squamosa*, Braga et al. (2010) obtiveram as maiores porcentagens de germinação após a imersão das sementes por 36 horas em solução de 520 mg L⁻¹ de GA₃ ou em 330 mg L⁻¹ de GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-aminopurina (89,44% e 95,45%, respectivamente). Silva et al. (2007) observaram as maiores porcentagens de germinação em *Annona crassiflora* após realizarem a imersão por 6 dias em 500 µM de GA₄₊₇. Nestes trabalhos, o tempo de imersão das sementes nas soluções aquosas é determinado com base no tempo necessário para que ocorra a mudança da fase I para a fase II da curva de aquisição de água. No entanto, a variação do tempo de imersão das sementes altera os índices germinativos, o que torna imprescindível avaliar se a duração dos tratamentos de imersão deve ser definida considerando o teor de água atingido pelas sementes ou o tempo necessário para a mudança da fase I para a fase II do processo germinativo.

Em sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), Elkoca et al. (2007) observaram que o condicionamento osmótico pelo período de 12 horas resultou nas maiores porcentagens e velocidade de germinação, enquanto o período de 48 horas causou a redução dos índices germinativos. Sguarezi et al. (2001) observaram que as maiores porcentagens de germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) ocorreram quando o condicionamento osmótico foi realizado por 4 dias, ao passo que o período de 12 dias causou a redução da porcentagem de germinação. Da mesma forma, em sementes de *A. emarginata*, Gimenez et al. (2014) observaram que a imersão das sementes pelo tempo necessário para ao término da fase I (109 horas) resultou nas menores porcentagens de germinação, enquanto as maiores porcentagens foram obtidas quando as sementes permaneceram imersas até a obtenção de menores teores de água (15% e 20%). Neste contexto, os maiores períodos de imersão das sementes nestes trabalhos, pode se assemelhar ao excesso de chuva logo após a semeadura, o qual submete as sementes à baixa disponibilidade de oxigênio (BAILEY-SERRES et al., 2012) comprometendo o processo germinativo.

2.4. Disponibilidade de oxigênio durante o processo germinativo

A respiração consiste em uma reação aeróbica/anaeróbica, na qual a célula libera energia conservada principalmente na forma de ATP, por meio da oxidação de substratos orgânicos (açúcares, lipídeos, etc). O início deste processo ocorre com a glicólise, a qual não depende da presença de oxigênio e onde são produzidas 2 moléculas de piruvato e liberadas 2 moléculas de ATP (adenosina trifosfato) e 2 moléculas de NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) (ZABALZA et al., 2009)

Quando em condições normais de oxigenação (normoxia), o piruvato é transportado para a mitocôndria, onde é oxidado a CO_2 através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, também denominado ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs, onde ocorre a produção de NADH e FADH_2 (flavina adenina dinucleotídeo), os quais são oxidados na cadeia transportadora de elétrons. Quando as duas moléculas de piruvato (a partir de uma molécula de glicose) são oxidadas e os elétrons são transferidos ao O_2 via fosforilação oxidativa, ocorre a produção de 32 unidades de ATP (GUPTA et al., 2009; NELSON; COX, 2014).

Por outro lado, sob condições de menor disponibilidade de oxigênio (hipoxia) a atividade mitocondrial é reduzida, devido à falta do oxigênio para atuar comoceptor final de elétrons na fosforilação oxidativa durante a respiração aeróbica. A não re-oxidação do NADH (regeneração do NAD^+) em condição de hipoxia pode bloquear a glicólise, logo após a condição de baixa oxigenação ter sido estabelecida. Assim, a fermentação é ativada como um mecanismo alternativo de re-oxidação do NADH, sendo observado em alguns casos o “efeito Pasteur”, o qual acelera o consumo de carboidratos e aumenta o fluxo glicolítico de 2 a 3 vezes, visando o aumento da produção de ATPs via glicólise (GUPTA et al., 2009; ZABALZA et al., 2009; BANTI et al., 2013)

O processo de fermentação (degradação anaeróbia da glicose) ocorre por meio da ativação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase (fermentação alcoólica)

e lactato desidrogenase (fermentação láctica), as quais utilizam como substrato o piruvato, levando à produção de compostos parcialmente oxidados como o lactato e o etanol (FELLE, 2005; DONGEN; LICAUSI, 2015).

Neste contexto, a fermentação alcóolica consiste na principal via fermentativa sob hipoxia (KOMATSU et al., 2010), visto que cerca de 92% do piruvato produzido por meio da glicólise é direcionado para a produção de etanol (KATO-NOGUCHI, 2006). Sob a ação da enzima piruvato descarboxilase o piruvato é convertido a acetaldeído com a liberação de uma molécula de CO₂, e posteriormente, sob ação da enzima álcool desidrogenase este acetaldeído é convertido a etanol (TOUGOU et al., 2012). No entanto, o etanol quando acumulado em altas concentrações é tóxico às células, causando danos no sistema de membranas e consequente perda de solutos celulares (KOKUBUN, 2013), ou ainda, a deterioração da semente (GREGGAINS et al., 2000; KODDE et al., 2012).

Além disso, na via fermentativa a produção de energia é reduzida para apenas 2 unidades de ATP (glicólise) em comparação às 32 unidades de ATP por unidade de hexose produzidas via fosforilação oxidativa (BANTI et al., 2013; DONGEN; LICAUSI, 2015). Deste modo, quando em hipoxia, a produção de ATP via fermentação se torna abaixo da demanda celular, o que representa menor quantidade de energia para o processo germinativo (GUPTA et al., 2009).

Vale salientar que existem certas espécies que toleram a hipoxia desde a germinação até a fase vegetativa, com destaque para variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). As principais características associadas com a tolerância à hipoxia e até mesmo à anoxia durante o processo germinativo destas variedades, incluem a capacidade de quebrar e utilizar o amido como substrato e também a elevada respiração anaeróbica para evitar o déficit de energia. Nestas variedades, também tem sido investigada a possível capacidade diferencial de eliminação de

radicais livres e outras toxinas durante a hipoxia, o que colabora com a prevenção da ocorrência de maiores danos (MIRO; ISMAIL, 2013).

Antes mesmo da degradação de reservas ter início a partir da sinalização de hormônios promotores da germinação, um dos primeiros processos bioquímicos que ocorre com a embebição é a grande e rápida liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pré-existentes em diferentes células (BOVERIS et al., 1984; CHIU et al., 2005). Em sementes hidratadas todos os compartimentos metabolicamente ativos são fontes de EROs, tais como os glioxissomos (catabolismo de lipídeos), peroxissomos (catabolismo de purinas – bases nitrogenadas), mitocôndrias (atividade respiratória), cloroplastos (transferência de elétrons nos fotossistemas) e membranas plasmáticas (NADPH oxidase) (BAILLY, 2004; GOMES; GARCIA, 2013).

As EROs, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-), quando em altas concentrações reagem com vários componentes biológicos, como o DNA, RNA, carboidratos, proteínas (SILVA et al., 2010) e lipídeos (GARG; MANCHANDA, 2009), causando graves danos celulares. A interação entre as EROS e os lipídeos pode resultar na peroxidação de lipídeos, degradação de membranas e até mesmo a morte celular (BAILLY et al., 2008; MUNNÉ-BOSCH et al., 2011). Vale lembrar que, o processo de peroxidação lipídica leva à produção do malondialdeído (MDA), cuja quantificação tem sido utilizada como indicativo do grau de estresse oxidativo em amostras biológicas (LIMA; ABDALLA, 2001).

A interação das EROs com proteínas mitocondriais pode levar à desintegração da matriz mitocondrial (BARTOLI et al., 2004), além de alterações nas suas membranas, reduzindo a atividade desta organela e, conseqüentemente, a produção de energia (YIN et al., 2009). Deste modo, a interação entre a elevada quantidade de EROs produzidas sob hipoxia (JALEEL et al., 2007) com as proteínas mitocondriais afeta diretamente o processo

germinativo, pois mesmo que as sementes sejam transferidas para condição de normoxia, os danos causados às mitocôndrias resultam em menor produção de energia para a manutenção do metabolismo e conclusão do processo germinativo. Cabe salientar que, as respostas metabólicas à falta de oxigênio, como a produção de EROs, podem variar significativamente em função da concentração de oxigênio do meio em que a semente está situada e da espécie considerada (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010).

Neste sentido, para evitar o efeito tóxico das altas concentrações de EROs, as espécies vegetais desenvolveram um sistema de defesa antioxidante que inclui substâncias de baixo peso molecular e enzimas antioxidativas, tais como a Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e Peroxidase (SOD, EC 1.11.1.7), as quais reduzem a ocorrência de danos por meio da remoção das EROs (MITTLER, 2002; FOYER; NOCTOR, 2005).

A SOD representa a primeira linha de defesa do sistema antioxidativo das plantas, catalisando a dismutação do superóxido (O_2^-) para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BOWLER et al., 1992; GREGGAINS et al., 2000), o qual é degradado a H_2O e O_2 pela ação da CAT e da POD (RESENDE et al., 2003). Os componentes antioxidativos apresentam diferentes padrões de funcionamento num mesmo estágio de desenvolvimento da planta. Desta forma, enquanto a CAT apresenta maior atividade em sementes dormentes e em sementes em processo de germinação, a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) não é detectada (TULLIO; ARRIGONI, 2003).

Deste modo, verifica-se a necessidade de um sistema antioxidativo eficiente, com ação sincronizada dos componentes antioxidativos, para controlar as concentrações de EROs, visto que desde o início do desenvolvimento da semente até a germinação visível ocorre grande variação no teor de água e no metabolismo, causando elevada produção de EROs e, conseqüentemente, danos celulares (DIAZ-VIVANCOS et al., 2013).

Além das alterações na atividade respiratória das sementes e no estresse oxidativo, a redução na disponibilidade de oxigênio durante a embebição pode interferir nos níveis hormonais. Em sementes de milho (*Zea mays* L.) foi demonstrado que a hipoxia reduz a atividade da enzima ABA 8'-hidroxilase, responsável pela degradação do ácido abscísico (ABA) (KROCHKO et al., 1998). Deste modo, considerando que o oxigênio é utilizado como substrato para esta enzima, a redução em sua disponibilidade permite indiretamente o aumento e/ou manutenção dos níveis de ABA (MILLAR et al., 2006).

Além das questões relacionadas aos níveis de ABA, Benech-Arnold et al. (2006) observaram que em embriões de cevada (*Hordeum vulgare* L.) houve o aumento da sensibilidade ao ABA quando as sementes foram submetidas à hipoxia. Neste sentido, os trabalhos de Liu et al. (2007) e Miransari e Smith (2014) demonstraram que o aumento da sensibilidade ao ABA em sementes e plântulas ocorre em função de maiores níveis do ácido indolilacético (IAA). Portanto, quando sementes são submetidas à hipoxia, o balanço hormonal pode inibir a germinação pelo aumento dos níveis de ABA, pelo aumento da sensibilidade ao ABA causado pelo aumento dos níveis de IAA, ou ainda, pela combinação de ambos fatores.

Os efeitos do ABA nas sementes são baseados na expressão de fatores de transcrição para a inibição dos hormônios promotores da germinação. Deste modo, enquanto hormônios como as giberelinas promovem a quebra de reservas para o fornecimento de energia e o enfraquecimento do endosperma para a protrusão da radícula, o ABA inibe tais processos impedindo, conseqüentemente, a germinação (GRAEBER et al., 2010; NAMBARA et al., 2010).

Em resumo, verifica-se que o tempo de imersão pode causar alterações no metabolismo das sementes capazes de influenciar no processo germinativo, e que o nível do dano causado por estas alterações depende das adaptações às adversidades do meio, em cada

espécie. Deste modo, é de suma importância o estudo dos mecanismos que ocorrem quando as sementes são submetidas a imersão, seja por condições de estresse ambiental como o alagamento, ou pelo estresse causado durante tratamentos pré-germinativos.

Conforme estabelecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), os resultados obtidos foram reunidos em capítulos redigidos na forma de artigos segundo as normas da revista *Journal of Experimental Botany*

Capítulo I: Redução da disponibilidade de oxigênio durante a embebição de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer: metabolismo e germinação

Capítulo II: Embebição lenta causa danos ultraestruturais e alterações no metabolismo de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer?

3. CAPÍTULO I

Redução da disponibilidade de oxigênio durante a embebição de sementes de
Annona emarginata (Schltdl.) H. Rainer: metabolismo e germinação

Resumo

As sementes concluem a embebição (fase I do processo germinativo) quando se estabiliza temporariamente a entrada de água, o que em sementes endospermáticas ocorre quando atingem teores de água de aproximadamente 35%. Este tempo necessário para a conclusão da embebição é utilizado como referência para a determinação do período de imersão em tratamentos pré-germinativos. No entanto, nem sempre a imersão durante todo o período de embebição resulta em aumento da germinabilidade, o que sugere melhor compreensão dos mecanismos que ocorrem nas sementes durante esta fase. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar como o tempo de imersão até atingir diferentes teores de água altera os mecanismos envolvidos no processo germinativo de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. Sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer com 10% de água foram imersas em Ψ_w 0 MPa até atingirem 15%, 20% e 35% de água e em meio com Ψ_w -1,2 MPa com o objetivo de aumentar o tempo de imersão para a aquisição destes mesmos teores de água. Ao alcançar 35% de água (122 horas) houve menor disponibilidade de oxigênio nas soluções, mesmo com aeração artificial, resultando em alteração da via respiratória para fermentativa, aumento das concentrações de ABA e IAA, inibição da degradação de reservas e menor germinabilidade. Estas respostas foram intensificadas com o aumento do tempo (317 horas) para atingir 35% de água. No entanto, quando o teor de 35% foi alcançado em normoxia a germinação não foi alterada. Conclui-se que a redução do oxigênio até níveis críticos durante a imersão é o fator responsável pela variação metabólica que causa decréscimo na germinabilidade, e não os teores de água atingidos durante a embebição.

Termos para indexação: Ácido abscísico, Ácido indolilacético, Annonaceae, Degradação de reservas, Fermentação, Respiração.

Introdução

A curva de aquisição de água em sementes segue um padrão trifásico, sendo a fase I (fase de embebição) geralmente rápida e concluída quando ocorre a estabilização da entrada de água, com teores em torno de 35% em sementes endospermáticas (Bewley *et al.*, 2013). Para algumas espécies, como as pertencentes à família Annonaceae, essa fase é naturalmente longa, podendo ser de 36 horas em sementes de *Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L. (Ferreira *et al.*, 2006) e até 144 horas em sementes de *Annona crassiflora* Mart. (Silva *et al.*, 2007). Nesta fase acontece a reativação do metabolismo, sendo observado o aumento da atividade respiratória, o início da degradação de substâncias de reserva e a síntese de ácidos nucléicos e proteínas a partir de ATP e NADPH gerados na respiração (Weitbrecht *et al.*, 2011).

Deste modo, por ser a fase na qual as sementes adquirem a maior quantidade de água e o metabolismo é reativado, tem sido utilizada como referência para a determinação da duração de tratamentos que envolvem a imersão das sementes em soluções aquosas como o *priming* (Paparella *et al.*, 2015) ou aplicação de reguladores vegetais (Oliveira *et al.*, 2010; Gimenez *et al.*, 2014a). O *priming* consiste em reduzir a velocidade de entrada de água nas sementes durante a embebição com o objetivo de minimizar a ocorrência de danos à membrana como irregularidades causadas pelo realinhamento incompleto ou incorreto das proteínas da bicamada lipídica, os quais seriam causados pela rápida entrada de água, além de promover a sincronização da germinação (Paparella *et al.*, 2015), enquanto os tratamentos hormonais visam superar dormência e/ou aumentar a germinabilidade.

No entanto, em vários trabalhos o tempo de imersão das sementes é definido sem considerar os possíveis danos aos processos reativados em função do teor de água atingido pelas sementes durante a embebição (Sharma *et al.*, 2014; Ouhibi *et al.*, 2014), o que justifica a obtenção de diferentes respostas germinativas. Porém, mesmo entre trabalhos que utilizam a

imersão das sementes até o fim da fase I, ocorrem respostas controversas. Enquanto com *Annona cherimola* Mill x *A. squamosa* L. a imersão das sementes até o fim da fase de embebição (36 horas) resultou em aumento significativo da germinação (Braga *et al.*, 2010), em *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer a manutenção das sementes imersas até o fim da fase de embebição (109 horas) ocasionou redução da germinabilidade (Gimenez *et al.*, 2014b).

Quando a imersão das sementes é realizada em meios aquosos, a disponibilidade de oxigênio é menor em relação à atmosfera, devido à menor difusão do oxigênio na água, o que pode levar a estresse semelhante a condição de alagamento em campo (Bailey-Serres e Voesenek, 2008). Neste contexto, é demonstrado que espécies como *Phaseolus vulgaris* L. não toleram o declínio na disponibilidade de oxigênio (hipoxia) durante o processo germinativo (Rajashekar e Baek, 2014), enquanto outras espécies toleram até mesmo a ausência de oxigênio (anoxia) mantendo a germinabilidade elevada, como *Copaifera lucens* Dwyer (Vidal *et al.*, 2014).

As variações nas respostas germinativas frente à redução da disponibilidade de oxigênio podem estar relacionadas a diversos fatores, como alterações na atividade respiratória das sementes (Pérez-Ramos e Marañón, 2009), ou alterações nos níveis de ABA (Millar *et al.*, 2006) e/ou IAA (Benech-Arnold *et al.*, 2006), os quais podem afetar o processo de degradação de reservas (Miransari e Smith, 2014). Desta forma, compreender a modulação do metabolismo das sementes em imersão durante a fase de embebição pode auxiliar a definir se a duração dos tratamentos de imersão deve ser determinada com base no teor de água atingido pelas sementes ou pelo tempo necessário para a conclusão da fase I.

Neste trabalho se utilizou como modelo a espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer por apresentar a fase I naturalmente extensa (109 horas) e pelas observações de que as sementes quando mantidas sob imersão até o fim da fase I apresentam redução na

germinabilidade (Gimenez *et al.*, 2014b). Esta espécie nativa do território brasileiro apresenta importância como porta-enxerto para espécies comerciais do gênero *Annona*, como a atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) e a fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) por apresentar rusticidade, ser tolerante a patógenos presentes no solo e tolerar tanto solos secos como solos encharcados (Tokunaga 2000 apud Scaloppi Jr. e Martins, 2014). Assim como outras espécies pertencentes à família Annonaceae, a *A. emarginata* apresenta importância econômica para fins medicinais e em programas de recuperação de áreas degradadas (Chatrou *et al.*, 2012)

Deste modo, este trabalho objetivou avaliar como o tempo de imersão até atingir diferentes teores de água altera os mecanismos envolvidos no processo germinativo de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer.

Material e Métodos

Tratamentos durante a embebição

As sementes com teor de água inicial de 10% foram submetidas à embebição entre papel umedecido com água (normoxia), à embebição sob imersão em água (Ψ_w 0 MPa) ou em solução de polietilenoglicol (PEG 6000) com Ψ_w -1,2 Mpa até atingirem os teores de 15%, 20% e 35% de água. O tempo necessário para as sementes atingirem estes teores entre papel foi de 4 horas, 14 horas e 246 horas, sob imersão em água de 4 horas, 9 horas e 122 horas, e sob imersão no Ψ_w -1,2 MPa de 6 horas, 16 horas e 317 horas, respectivamente. Ao longo de todos os períodos de imersão foi utilizado sistema de aeração artificial.

Quando as sementes atingiram cada um dos teores de água foram coletadas três repetições de 40 sementes em nitrogênio líquido para a paralisação do metabolismo, sendo posteriormente realizadas as análises bioquímicas utilizando-se embrião + endosperma da região embrionária.

Atividade respiratória

O dióxido de carbono (CO_2) liberado pelas sementes imersas foi quantificado por meio do aparelho de Pettenkofer e titulação com ácido clorídrico (HCl 0,1N) (Mendes *et al.*, 2009). O cálculo da atividade respiratória foi realizado pela seguinte equação: $N \times D \times 22$ (Müller, 1964), onde N = normalidade do ácido utilizado (0,1), D = diferença entre o volume consumido de HCl na testemunha (“branco”) e o volume consumido na amostra, e 22 = normalidade do CO_2 . Os resultados foram expressos em microgramas de dióxido de carbono liberado por grama de massa seca por hora ($\mu\text{g g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$).

Oxigênio Diluído nas Soluções de Imersão

A mensuração do oxigênio diluído nas soluções de imersão foi realizada por meio de método eletrométrico empregando-se oxímetro Modelo DO-48, Marca PHTEK (Kayto Eletronics Inc., China). Os resultados foram expressos em miligramas de oxigênio por litro de solução de imersão (mg L^{-1}).

Etanol Liberado pelas Sementes

A quantificação do etanol liberado pelas sementes no meio de imersão foi realizada por meio de metodologia adaptada de Taylor *et al.* (1999), empregando-se 3 repetições por tratamento. Quando as sementes imersas atingiram cada um dos teores de água foram coletadas 3 replicatas de 150 μL da solução de imersão de cada repetição e acrescentado 1 mL de padrão n-propanol (0,015%). As amostras foram aquecidas à 90°C no amostrador Head Space (Teledyne Tekmar, modelo Versa), sendo injetado 1 μL do vapor em cromatógrafo a gás CG-Trace 1310 (Thermo Scientific) equipado com injetor do tipo slip/splitless, coluna TR-WAX 30m x 0,25mm e filme 0,25 μm e detector FID (Ionização de chama). Os resultados foram expressos em microgramas de etanol por grama de massa seca ($\mu\text{g g}^{-1} \text{MS}$).

Hormônios: ácido abscísico e ácido indolilacético

A extração dos hormônios foi realizada empregando-se metodologia adaptada de Ma *et al.* (2013), com solução composta por metanol, acetonitrila, água Milli-Q e ácido acético (40:40:20:1). A separação cromatográfica foi feita em HPLC Shimadzu modelo Prominence composto por desgaseificador de fase móvel DGU-20A, sistema de bombeamento quaternário composto por bombas LC-20AD, autoamostrador modelo SIL-20ACHT, controlador CBM-20A e forno para colunas modelo CTO-20AC. Foi utilizada coluna Sinergi 2.5 Hydro RP-100A 50x4.6mm, mantida à 40°C durante as determinações. O efluente da coluna foi introduzido em Espectrômetro de Massas do tipo Triploquadrupolo (MS/MS) marca AB Sciex modelo 4500 equipado com fonte de ionização tipo ESI (eletrospray) na interface. Os resultados foram expressos em nanograma por grama de massa seca (ng g^{-1} MS).

Degradação de reservas:

- Açúcares solúveis totais e perfil de glicose, frutose e sacarose

Para a extração dos açúcares solúveis foi empregada metodologia adaptada de Garcia *et al.* (2006). A quantificação dos açúcares solúveis totais foi realizada por análise colorimétrica pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) e solução de glicose como padrão ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm, sendo os açúcares solúveis totais expressos em miligramas por grama de massa seca (mg g^{-1} MS).

Posteriormente separou-se 1 mL das amostras para a purificação em colunas contendo resinas de troca catiônica e aniônica Dowex, eluídas com 10 volumes de água deionizada. O material purificado teve seu pH neutralizado com hidróxido de amônio e concentrados até secagem completa em liofilizador. As amostras foram então ressuspensas em 1 mL de água deionizada e analisado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em

cromatógrafo Metrohm, modelo 850 Professional IC equipado com detector amperométrico. Empregou-se o sistema de eluição isocrático com 200 mM de hidróxido de sódio com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ (Garcia *et al.*, 2006). A separação dos açúcares glicose, frutose e sacarose foi promovida em coluna Metrosep CARB 1, sendo os resultados expressos em miligramas por grama de massa seca (mg g⁻¹ MS).

- Amido

Os métodos de extração e quantificação do amido foram baseados nos trabalhos de McCready *et al.* (1950), Morris (1948) e Yemm e Willis (1954), utilizando o precipitado resultante da extração dos açúcares solúveis. Ao precipitado da extração dos açúcares solúveis foi acrescentada solução de ácido perclórico (HClO₄) 52%, o qual realiza a hidrólise do amido à glicose. As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro a 620nm, utilizando solução de glicose como padrão (100 µg mL⁻¹). Os resultados foram expressos em miligramas por grama de massa seca (mg g⁻¹ MS).

- Proteínas solúveis totais e perfil de albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas

A separação das proteínas solúveis foi realizada conforme sua solubilidade utilizando a metodologia descrita por Suda e Giorgini (2000) adaptada de García-Agustín e Primo-Millo (1989). À cada 24 horas foram extraídas consecutivamente a albumina (água destilada), globulina (cloreto de sódio 5%), prolamina (etanol 60%) e glutelina (hidróxido de sódio 5%). A determinação de cada proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976), sendo somadas as frações das quatro proteínas para a obtenção dos valores de proteínas solúveis totais, as quais foram expressas em miligramas por grama de massa seca (mg g⁻¹ MS).

- Lipídeos totais

A extração dos lípídeos totais foi realizada conforme metodologia descrita por Manirakiza *et al.* (2001) e Ambalkar *et al.* (2011), utilizando Soxhlet em três ciclos de 8 horas e hexano como solvente. A cada período de extração, o hexano foi filtrado, concentrado em rotavapor e armazenado em frascos devidamente identificados e pesados. Os resultados foram expressos em miligramas por grama de massa seca (mg g^{-1} MS).

Teste de Germinação

À medida que as sementes atingiram 15%, 20% e 35% de água de água nos diferentes meios de embebição, 5 repetições de 50 sementes foram submetidas ao teste de germinação, conduzido em rolos de papel de germinação do tipo ‘germitest’ umedecidos com água deionizada e mantidos em germinador sob temperatura e fotoperíodo alternados (8h de escuro a 20°C e 16h de luz a 30°C) (Costa *et al.*, 2011). A contagem das sementes germinadas foi realizada a cada 2 dias, sendo consideradas como germinadas as sementes com no mínimo 2 mm de raiz primária. As seguintes variáveis foram calculadas: porcentagem de germinação, velocidade de germinação (Maguire, 1962) e tempo médio de germinação (Edmond e Drapala, 1958).

Anatomia do embrião

Quando as sementes atingiram cada um dos teores de água no Ψ_w 0 MPa e Ψ_w -1,2 MPa, 15 sementes por tratamento foram coletadas a fim de verificar mudanças na estrutura embrionária. A fixação do material foi realizada em FAA 50 (Johansen, 1940), sendo as amostras mantidas em álcool etílico a 70% (Jensen, 1962). Para confecção do laminário permanente, após desidratação em série etílica, o material foi incluído em hidróxi-etil-metacrilato (Leica[®]) e seccionado com 8 a 10 μm de espessura. As secções foram coradas

utilizando Azul de Toluidina 0,05% pH 4,7 (O'Brien *et al.*, 1964), montadas em Permount® e analisadas em microscópio de luz, sendo as imagens obtidas digitalmente em fotomicroscópio Olympus.

Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados

A atividade respiratória e as concentrações hormonais foram alteradas em função de variações na disponibilidade de oxigênio após os diferentes tempos de imersão para atingir os teores de água até completar a fase de embebição, resultando em diferentes respostas germinativas.

Deste modo, foi verificado que à medida que as sementes imersas em Ψ_w 0 MPa adquiriram maiores teores de água (15% = 4 horas; 20% = 9 horas; 35% = 122 horas) houve a redução na disponibilidade de oxigênio no meio (hipoxia), mesmo com a utilização do sistema de aeração artificial (Tabela 1). No entanto, mesmo com esta redução na disponibilidade de oxigênio houve aumento da respiração (“pico”) quando as sementes atingiram o teor de 20% de água (Tabela 1). Quando as sementes adquiriram água mais lentamente (solução com Ψ_w -1,2 MPa), ou seja, o tempo de imersão para atingir os referidos teores de água foi aumentado (15% = 6 horas; 20% = 16 horas; 35% = 317 horas), observamos que a disponibilidade de oxigênio foi menor em relação ao meio com Ψ_w 0 MPa, ao atingir cada teor de água (Tabela 1). Com estas menores concentrações de oxigênio não foram observadas alterações na atividade respiratória em relação a condição inicial (15%) e nem o aumento da respiração ao atingir o teor de 20% de água, como ocorreu nas sementes

imersas em Ψ_w 0 MPa (Tabela 1). Cabe relatar que, a disponibilidade de oxigênio no meio com Ψ_w -1,2 MPa era menor desde o início do experimento, devido a maior densidade desta solução comparada à água pura (Ψ_w 0 MPa), e que após 317 horas alcançou os menores valores, aproximando-se de zero ($0,46 \text{ mg L}^{-1}$).

Quando as sementes atingiram o teor de 35% de água (fim da fase I), não houve diferença na atividade respiratória entre as sementes submetidas aos diferentes tempos de imersão (122 horas/ Ψ_w 0 MPa e 317 horas/ Ψ_w -1,2 MPa) (Tabela 1), sendo observado aumento da produção de etanol em ambas as condições (Tabela 1), o que indica a ocorrência da fermentação. Ao atingir o teor de água de 35% também se observou o aumento das concentrações de ABA, tanto nas sementes imersas por 122 horas (Ψ_w 0 MPa) como nas sementes imersas por 317 horas (Ψ_w -1,2 MPa), sendo as maiores concentrações de ABA observadas nas sementes imersas pelo maior período (Tabela 2). Além do aumento das concentrações de ABA foi verificado o aumento das concentrações de IAA (Tabela 2).

Ao se comparar a embebição sob imersão nos meios aquosos (Ψ_w 0 MPa e Ψ_w -1,2 MPa), nos quais houve redução da disponibilidade de oxigênio (hipoxia), com a embebição entre papel, no qual a disponibilidade de oxigênio não é afetada (normoxia), constatamos que nas sementes embebidas entre papel houve redução das concentrações de ABA e de IAA (Tabela 2) ao concluírem a fase de embebição (35% de água), oposto ao observado nas sementes imersas (Tabela 2). Embora os níveis hormonais estivessem diferentes quando as sementes embebidas entre papel e as sementes embebidas sob imersão atingiram o fim da fase de embebição (35% de água), observou-se um mesmo padrão de degradação de reservas. Deste modo, foram observadas reduções nas concentrações de açúcares solúveis totais (Tabela 3), representado por redução nas concentrações de sacarose e aumento das concentrações de glicose (Tabela 4). Também foi verificada a redução das concentrações de amido, enquanto os lipídeos e as proteínas solúveis totais não apresentaram redução das suas

concentrações em relação às sementes com teor de água inicial (10%) (Tabela 3). Embora não tenham ocorrido alterações nas concentrações de proteínas solúveis totais, foi observado o aumento das concentrações de glutelinas e prolaminas (Tabela 5).

Cabe observar ainda que as concentrações de ABA também apresentaram redução (Tabela 2) quando as sementes imersas em Ψ_w 0 MPa alcançaram o teor de 20% de água (9 horas), o que coincidiu com o aumento respiratório (Tabela 1), com a redução das concentrações de amido e com o aumento das concentrações de açúcares solúveis (Tabela 3), mais especificamente de glicose (Tabela 4). Nestas sementes a degradação das reservas e a germinabilidade se assemelharam com o observado nas sementes embebidas entre papel. Quando aumentado o tempo para as sementes atingirem o teor de 20% de água (16 horas/ Ψ_w -1,2 MPa), as concentrações de ABA também diminuíram (Tabela 2), no entanto, houve redução da germinação (Tabela 5), em relação às sementes imersas no Ψ_w 0 MPa. No meio de imersão com Ψ_w -1,2 MPa as concentrações de oxigênio eram menores ($2,04 \text{ mg L}^{-1}$) do que no meio com Ψ_w 0 MPa ($3,06 \text{ mg L}^{-1}$), o que pode ter impedido o aumento da respiração (“pico respiratório”). Embora nestas sementes também tenha ocorrido a redução das concentrações de amido, as concentrações dos açúcares solúveis (Tabela 3) eram menores em relação às sementes imersas em Ψ_w 0 MPa ou embebidas entre papel.

Por meio da análise anatômica, verificou-se que antes do início do processo de embebição (sementes com 10% de água) o embrião é reto, com aproximadamente 2 mm de comprimento, apresentando eixo e cotilédones distinguíveis (Figura 1). No entanto, apesar das alterações metabólicas, não foram observados sinais de alongamento e/ou divisão celular após as sementes atingirem os diferentes teores de água (15%, 20% e 35%) em Ψ_w 0 MPa (Figura 2 C, E, G) e em Ψ_w -1,2 MPa (Figura 2 D, F, H) quando comparadas às sementes com o teor de 10% de água (Figura 2 A, B). Especificamente nas sementes imersas por 317 horas (fim da fase I; Ψ_w -1,2 MPa) foram verificadas paredes celulares irregulares, principalmente na

região do meristema fundamental indicando a ocorrência de possíveis danos causados pelo longo período de imersão das sementes (Figura 2 H).

Em resumo, verificou-se que com o aumento do tempo de imersão houve a redução da disponibilidade de oxigênio nas soluções aquosas (hipoxia), mesmo com a utilização do sistema de aeração artificial. A imersão das sementes no Ψ_w 0 MPa até atingirem o teor de 20% de água (9 horas), resultou na mesma germinabilidade das sementes colocadas para embeber diretamente no papel (normoxia). Porém, quando as sementes foram submetidas à imersão até o fim da fase de embebição (35% de água), seja com “velocidade normal” de aquisição de água (Ψ_w 0 MPa) ou com a redução da velocidade (Ψ_w -1,2 MPa), houve baixa atividade respiratória aeróbica, aumento da via fermentativa, aumento das concentrações de ABA e IAA, interferindo na degradação de reservas e ocasionando a redução da germinabilidade. No entanto, quando as sementes alcançaram o fim da embebição (35% de água) em condição de normoxia (entre papel), a germinação não foi reduzida.

Discussão

De modo geral, considerando-se que a redução da disponibilidade de oxigênio nos meios de imersão alterou o metabolismo respiratório, hormonal e germinativo, pode-se inferir que a espécie *A. emarginata* é intolerante à redução da disponibilidade de oxigênio (hipoxia) em concentrações de $2,04 \text{ mg L}^{-1}$ ou menores.

Ao longo da embebição, quando sementes quiescentes em condições adequadas de água, temperatura e oxigênio, atingem teores de água em torno de 20%, é observado o primeiro aumento da atividade respiratória durante o processo germinativo (Patanè *et al.*, 2006). Este aumento foi observado nas sementes de *A. emarginata* imersas por 9 horas na solução com Ψ_w 0 MPa (20% de água) mesmo com redução na disponibilidade de oxigênio de $4,10 \text{ mg L}^{-1}$ (concentração inicial) para $3,06 \text{ mg L}^{-1}$ (redução de 25,4%).

Desta forma, considerando que o oxigênio atua como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória aeróbica, o declínio de sua disponibilidade reduz a respiração aeróbica (Banti *et al.*, 2013), conforme verificado nas sementes imersas em água até atingirem o teor de 35% de água, as quais apresentaram valores de respiração semelhante ao início do metabolismo (15% de água). Do mesmo modo, pode-se inferir que, a baixa disponibilidade de oxigênio desde o início da embebição ($2,23 \text{ mg L}^{-1}$) no meio de imersão com $\Psi_w -1,2 \text{ MPa}$, mesmo com a aeração artificial, foi o fator responsável por manter a respiração baixa nas sementes do início ao fim da fase de embebição. Desta forma, é imprescindível avaliar a quantidade mínima de oxigênio que não cause danos no metabolismo em cada espécie, que em sementes de *A. emarginata* está em torno de $2,23 \text{ mg L}^{-1}$, visto que abaixo de $2,04 \text{ mg L}^{-1}$ houve alterações do metabolismo que resultaram em menor porcentagem e velocidade de germinação e maior tempo médio de germinação das sementes.

A redução da quantidade de oxigênio para concentrações de $1,17 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,46 \text{ mg L}^{-1}$, quando as sementes de *A. emarginata* atingiram o fim da fase I após 122 horas ($\Psi_w 0 \text{ MPa}$) ou 317 horas ($\Psi_w -1,2 \text{ MPa}$), respectivamente, levou à reconfiguração do metabolismo, por meio da alteração da via respiratória aeróbica para a fermentativa, verificado a partir do aumento do etanol. A fermentação alcoólica é considerada a principal via respiratória sob hipoxia (Komatsu *et al.*, 2010), visto que cerca de 92% do piruvato produzido na glicólise é direcionado para a fermentação alcoólica (Kolb e Joly, 2010).

Na presença de oxigênio é observada a produção de 32 ATPs (respiração aeróbica), no entanto, com a ocorrência da via fermentativa há menor produção de energia, pois parte desta é conservada em 2 moléculas de ATP produzidas durante a glicólise e outra parte nos produtos da fermentação, como o etanol (Dongen e Licausi, 2015). Este decréscimo na produção de energia que seria utilizada para o crescimento e manutenção do metabolismo celular (Kleinwächter *et al.*, 2012), junto ao efeito tóxico do etanol às células (Kokubun,

2013), resultaram no comprometimento do processo germinativo, com a menor porcentagem de germinação (15%), maior tempo médio (45 dias) e menor velocidade (0,17 sementes/dia). Desta forma, pode-se relacionar as maiores concentrações de etanol ao fim da fase I com as menores porcentagens de germinação obtidas pelas sementes de *A. emarginata*, principalmente quando a concentração do oxigênio é reduzido a valores próximos à anoxia (0,46 mg L⁻¹).

Os mecanismos e os níveis de tolerância a baixas concentrações de oxigênio, semelhante ao que ocorre em áreas periodicamente alagadas, variam significativamente entre as espécies (Magneschi e Perata, 2009). Um dos mecanismos consiste na ativação da via fermentativa, pois a fermentação é um modo alternativo de re-oxidação do NADH, não permitindo desta forma, a interrupção da glicólise quando a condição de baixa oxigenação é estabelecida (Banti *et al.*, 2013).

Além da alteração da via respiratória, é necessário também o fornecimento adequado de açúcares facilmente fermentáveis para a glicólise (Banti *et al.*, 2013). No entanto, as sementes de *A. emarginata* apresentam baixas concentrações de açúcares (2,5%) e amido (1,7%), e estas reservas não foram suficientes para a manutenção do metabolismo sob hipoxia e resultaram em redução da germinação. Outro fator importante a ser considerado é que as sementes de *A. emarginata* são ricas em lipídeos, cuja degradação durante a respiração consome mais oxigênio, quando comparado aos carboidratos (Kolb e Joly, 2010). Desta forma, com a menor disponibilidade de oxigênio não houve a degradação dos lipídeos e a liberação de substrato (açúcares) que poderia ser utilizado na glicólise para manter a via fermentativa e garantir a germinação. *A. emarginata* apresenta portanto, padrão de utilização dos lipídeos diferente de espécies como *Oryza sativa* L., cuja reserva lipídica (cerca de 20%) é quebrada e utilizada como fonte de energia durante a condição de hipoxia (Miro e Ismail, 2013).

Em relação ao nível de tolerância, neste trabalho foi demonstrado que para as sementes de *A. emarginata* a redução das concentrações de oxigênio para valores de até 2,23 mg L⁻¹ não causa danos no metabolismo, mantendo a germinabilidade. Por outro lado, a espécie *Copaifera lucens* Dwyer, tolera a imersão em água (Ψ_w 0 MPa) em condições de anoxia por 96 horas, apresentando as maiores porcentagens e índice de velocidade de germinação, o que se deve provavelmente a sua adaptação a ambientes de mata ripária (Vidal *et al.*, 2014). Ao contrário da *Copaifera lucens*, e embora a espécie tenha adaptações a condições de alagamento, quando sementes de *A. emarginata* foram mantidas em imersão em condição próxima de anoxia (0,46 mg L⁻¹) houve menor porcentagem (15%) e velocidade de germinação (0,17) demonstrando intolerância a esta condição.

Além de interferir na atividade respiratória, a menor disponibilidade de oxigênio ao fim da fase de embebição sob imersão (1,17 mg L⁻¹ = Ψ_w 0 MPa e 0,46 mg L⁻¹ = Ψ_w -1,2 MPa) resultou no aumento do ABA. Este aumento possivelmente ocorreu devido a redução da atividade da enzima ABA 8'-hidroxilase que atua no processo de degradação oxidativa do ABA, uma vez que o oxigênio é utilizado como substrato desta enzima (Kushiro *et al.*, 2004; Millar *et al.*, 2006).

Como os efeitos do ABA na germinação das sementes são baseados na expressão de fatores de transcrição para a inibição dos hormônios promotores da germinação, impedindo a quebra de reservas, o enfraquecimento do endosperma e o crescimento do embrião (Matilla e Matilla-Vazquez, 2008; Linkies *et al.*, 2009; Graeber *et al.*, 2010; Nambara *et al.*, 2010), o aumento das concentrações de ABA ao fim da fase de embebição sob imersão, explica a redução da germinação em relação aos tratamentos onde suas concentrações foram reduzidas, o que está associado à manutenção das concentrações de amido, lipídeos e proteínas, os quais necessitam de enzimas sintetizadas a partir dos promotores da germinação, para serem degradados (Miransari e Smith, 2014).

Além do aumento dos níveis de ABA, houve também o aumento dos níveis de IAA quando as sementes imersas atingiram o teor de 35% de água, o que pode ter ocorrido em função da síntese *de novo* deste hormônio, conforme proposto por Ayele *et al.* (2012). Desta forma, a redução da germinação destas sementes pode ter ocorrido pela ação do ABA, e também pelo aumento da sensibilidade ao ABA provocada pelas maiores concentrações de IAA (Liu *et al.*, 2007).

A literatura relata que a redução da velocidade de aquisição de água é eficiente em minimizar os danos de embebição causados às sementes (Sharma *et al.*, 2014). No entanto, em sementes que adquirem água lentamente, como espécies do gênero *Annona*, a redução da velocidade de aquisição de água pode ocasionar o aumento excessivo do tempo para a conclusão da fase de embebição, estabelecendo uma condição de hipoxia e até quase anoxia que reduz a germinação, como ocorreu com a *A. emarginata*.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que as condições de imersão nas quais as sementes são mantidas ao longo do tempo até alcançar o fim da fase de embebição é um fator chave na modulação do processo germinativo, pois reduções significativas de oxigênio no meio ocasionam danos metabólicos e reduzem a germinação. Assim, considerando que a fase de embebição é utilizada como referência para definição de tempos de tratamentos que envolvam imersão das sementes em soluções (*priming*, reguladores vegetais), os níveis de oxigênio devem ser monitorados para que não se alcance um nível crítico danoso (hipoxia ou anoxia,) em sementes intolerantes, situação que também ocorreria em longos períodos de alagamento.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP [Processo 2012/24013-1].

Referências

- Ambalkar VU, Sapkal VS, Talib M, Khandelwal AS.** 2011. Soxhlet extraction of neem seed (*Azadirachta indica* A. Juss) using hexane as a solvent. *International Journal of Chemical and Analytical Science* **2**, 10-11.
- Ayele BT, Ozga JA, Wickramarathna AD, Reinecke DM.** 2012. Gibberellin metabolism and transport during germination and young seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* **31**, 235-252.
- Bailey-Serres J, Voesenek LACJ.** 2008. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 313–339.
- Banti V, Giuntoli B, Gonzali S, Loreti E, Magneschi L, Novi G, Paparelli E, Parlanti S, Pucciariello C, Santaniello A, Perata P.** 2013. Low Oxygen Response Mechanisms in Green Organisms. *International Journal of Molecular Science* **14**, 4734-4761.
- Benech-Arnold RL, Gualano N, Leymarie J, Côme D, Corbineau F.** 2006. Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1423-1430.
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H.** 2013. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy.** 3 ed. New York: Springer, 392p.
- Braga JF, Ferreira G, Pinho SZ, Braga LF, Sousa MP.** 2010. Germination of atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) cv. Gefner seeds subjected to treatments with plant growth regulators. *International Journal of Science and Nature* **1**, 120-126.
- Chatrou LW, Pirie MD, Erkens RHK, Couvreur TLP, Neubig KM, Abbott JR, Mols JB, Maas JW, Saunders RMK, Chase MW.** 2012. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society* **169**, 5-40.
- Costa PN, Bueno SSC, Ferreira G.** 2011. Fases da germinação de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H.Rainer em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Fruticultura* **33**, 253-260.
- Dongen JT, Licausi F.** 2015. Oxygen sensing and signaling. *Annual Review Plant Biology* **66**, 345-367.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analitical Chemistry*, **28**, 350-356.

Edmond JB, Drapala WS. 1958. The effects of temperature, sand and acerone on germination of okra seed. *Proceedings of American Society for Horticultural Science* **71**, 428-434.

Ferreira G, Guimarães VF, Pinho SZ, Oliveira MC, Richardt A, Braga JF, Dias GB. 2006. Curva de absorção de água em sementes de atemóia (*Annona cherimola* MILL x *Annona squamosa* L.) CV. 'Gefner'. *Revista Brasileira de Fruticultura* **28**, 121-124.

Garcia IS, Souza A, Barbedo CJ, Dietrich SMC, Figueiredo-Ribeiro RCL. 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the brazilian atlantic forest. *Brazilian Journal Biology*, **66**, 739-745.

Garcia-Agustín P, Primo-Millo E. 1989. Ultrastructural and biochemical changes in cotyledon reserve tissues during germination of *Citrus* seeds. *Journal of Experimental Botany*, **40**, 383-390.

Jimenez JI, Ferreira G, Cavariano C. 2014a. Tetrazolium test for assessment of seed viability of atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). *Journal of Seed Science* **36**, 357-361.

Jimenez JI, Ferreira G, Corsato JM. 2014b. Soluble sugars and germination of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seeds submitted to immersion in GA₃ up to different water contents. *Revista Brasileira de Fruticultura* **36**, 281-287.

Graeber K, Linkies A, Müller K, Wunchova A, Rott A, Leubner-Metzger G. 2010. Cross-species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae *DOG1* genes. *Plant Molecular Biology* **73**, 67-87.

Jensen WA. 1962. Botanical histochemistry. San Francisco: W. H. Freeman and Co.

Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Company.

- Kleinwächter M, Meyer AK, Selmar D.** 2012. Malting revisited: germination of barley (*Hordeum vulgare* L.) is inhibited by both oxygen deficiency and high carbon dioxide concentrations. *Food Chemistry* **132**, 476-481.
- Kokubun M.** 2013. Genetic and cultural improvement of soybean for waterlogged conditions in Asia. *Field Crops Research*, 152, 3-7.
- Kolb RM, Joly CA.** 2010. Germination and anaerobic metabolism of seeds of *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC subjected to flooding and anoxia. *Flora* **205**, 112-117.
- Komatsu S, Sugimoto T, Hoshino T, Nanjo Y, Furukawa K.** 2010. Identification of flooding stress responsible cascades in root and hypocotyl of soybean using proteome analysis. *Amino Acids* **38**, 729–738.
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E.** 2004. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO Journal* **23**, 1647-1656.
- Linkies A, Müller K, Morris K, Tureckova V, Wenk M, Cadman CSC, Corbineau F, Strnad M, Lynn JR, Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G.** 2009. Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination; a comparative approach using *Lepidium sativum* (cress) and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**, 3803–3822.
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC.** 2007. Repression of *AUXIN RESPONSE FACTOR10* by microRNA 160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal* **52**, 133-146.
- Ma L, Zhang H, Xu W, He X, Yang L, Luo Y, Huang K.** 2013. Simultaneous determination of 15 plant growth regulators in bean sprout and tomato with liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods* **6**, 941-951.
- Magneschi L, Perata P.** 2009. Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen. *Annals of Botany* **103**, 181-196.
- Maguire JD.** 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* **2**, 176-177.

- Manirakiza P, Covaci A, Schepens P.** 2001. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dier, and Modified Bligh & Dier extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis* **14**, 93-100.
- Matilla AJ, Matilla-Vazquez MA.** 2008. Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Science* **175**, 87-97.
- Mccready RM, Guggolz J, Silveira V, Owens HS.** 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry*, **22**, 1156-1158.
- Mendes CR, Moraes DM, Lima MGS, Lopes NF.** 2009. Respiratory activity for the differentiation of vigor on soybean seeds lots. *Revista Brasileira de Sementes* **31**, 171-176.
- Millar AA, Jacobsen JV, Ross JJ, Helliwell CA, Poole AT, Scofield G, Reid JB, Gubler F.** 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *The Plant Journal* **45**, 942-954.
- Miransari M, Smith DL.** 2014. Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany* **99**, 110-121.
- Miro B, Ismail AM.** 2013. Tolerance of anaerobic conditions caused by flooding during germination and early growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science* **4**, article 269, 1-18.
- Morris DL.** 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Drywood's anthrone reagent. *Science* **107**, 254-255.
- Müller LE.** 1964. *Manual de Laboratório de Fisiologia Vegetal*. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A.
- Nambara E, Okamoto M, Tatematsu K, Yano R, Seo M, Kamiya Y.** 2010. Absciscic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research* **20**, 55-67.
- O'Brien TP, Feder N, Mccully ME.** 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *O. Protoplasma* **59**, 368-373.
- Oliveira MC, Ferreira G, Guimarães VF, Dias GB.** 2010. Germinação de sementes de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) cv 'Gefner' submetidas a tratamentos com ácido giberélico (GA₃) e ethephon. *Revista Brasileira de Fruticultura* **32**, 544-554.

- Ouhibi C, Attia H, Rebah F, Msilini N, Chebbi M, Aarrouf J, Urban L, Lachaal M.** 2014. Salt stress mitigation by seed priming with UV-C in lettuce plants: Growth, antioxidant activity and phenolic compounds. *Plant Physiology and Biochemistry* **83**, 126-133.
- Paparella S, Araújo SS, Rossi G, Wijayasinghe M, Carbonera D, Balestrazzi A.** 2015. Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Cell Reports* **34**, 1281-1293.
- Patanè C, Cavallaro V, Avola G, D'Agosta G.** 2006. Seed respiration of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] during germination as affected by temperature and osmoconditioning. *Seed Science Research* **16**, 251-260.
- Pérez-Ramos IM, Marañón T.** 2009. Effects of waterlogging on seed germination of three Mediterranean oak species: Ecological implications. *Acta Oecologica* **35**, 422-428.
- Rajashekar CB, Baek KH.** 2014. Hydrogen Peroxide Alleviates Hypoxia during Imbibition and Germination of Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *American Journal of Plant Sciences* **5**, 3572-3584.
- Scaloppi Junior EJ, Martins ABG.** 2014. Estaquia em anonas. *Revista Brasileira de Fruticultura* **36**, 147-156.
- Sharma AD, Rathore SVS, Srinivasan K, Tyagi RK.** 2014. Comparison of various seed priming methods for seed germination, seedling vigour and fruit yield in okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). *Scientia Horticulturae* **165**, 75-81.
- Silva EAA, Melo DLB, Davide AC, Bode N, Abreu GB, Faria JMR, Hilhorst HWM.** 2007. Germination Ecophysiology of *Annona crassiflora* Seeds. *Annals of Botany* **99**, 823-830.
- Suda CNK, Giorgini JF.** 2000. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **12**, 226-245.
- Taylor AG, Johnson CF, Kataki PK, Obendorf PK.** 1999. Ethanol production by hydrated seeds: a high resolution index of seed quality. *Acta Horticulturae* **504**, 153-160.
- Vidal DB, Andrade IL, Andrade ELP, Mielke MS.** 2014. Effects of submergence in water on seed germination and vigor of the *Copaifera lucens* (Fabaceae) seedlings. *Journal of Forestry Research* **25**, 903-908.

Weitbrecht K, Müller K, Leubner-Metzger G. 2011. First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3289-3309.

Yemm EW, Willis AJ. 1954. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. *Biochemical Journal* **57**, 508-514.

Tabela 1. Oxigênio diluído (mg L^{-1}), atividade respiratória ($\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS hora}^{-1}$) e etanol produzido ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ MS}$) pelas sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ao alcançar diferentes teores de água sob imersão em Ψ_w 0 MPa e em Ψ_w -1,2 MPa.

Teor de água (%)	Meio de embebição	
	Imersão em Ψ _w 0 MPa	Imersão em Ψ _w -1,2 MPa
Oxigênio diluído (mg L ⁻¹)		
10 (inicial)	4,10 Aa	1,40 Bb
15	3,69 Ab	2,23 Ba
20	3,06 Ac	2,04 Ba
35	1,17 Ad	0,46 Bc
C.V. (%)	4,21	
Atividade respiratória (μg CO ₂ g ⁻¹ MS hora ⁻¹)		
15	64 Ab	57 Aa
20	190 Aa	40 Ba
35	62 Ab	44 Aa
C.V. (%)	15,83	
Etanol (μg g ⁻¹ MS)		
15	0,29 Ab	0,34 Ab
20	0,34 Ab	0,31 Ab
35	0,55 Aa	0,51 Aa
C.V. (%)	8,25	

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância.

Tabela 2. Ácido abscísico (ng g^{-1} MS) e ácido indolilacético (ng g^{-1} MS) em sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer após a embebição até diferentes teores de água entre papel umedecido, sob imersão em Ψ_w 0 MPa e em Ψ_w -1,2 MPa.

Teor de água (%)	Meio de embebição		
	Entre papel	Imersão em Ψ_w 0 MPa	Imersão em Ψ_w -1,2 MPa
Ácido abscísico (ng g ⁻¹ MS)			
10 (inicial)	2,3 Aa	2,3 Aa	2,3 Ab
15	1,4 Bb	1,0 Cc	2,0 Ab
20	1,2 Bb	1,7 Ab	1,6 Ac
35	1,2 Cb	2,4 Ba	3,2 Aa
C.V. (%)	7,76		
Ácido Indolilacético (ng g ⁻¹ MS)			
10 (inicial)	71,0 Ab	71,0 Ac	71,0 Ad
15	87,9 Ba	66,3 Cc	122,6 Ab
20	93,9 Ba	108,0 Ab	100,4 Bc
35	53,5 Cc	126,0 Ba	208,6 Aa
C.V. (%)	3,44		

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância.

Tabela 3. Açúcares solúveis totais (mg g^{-1} MS), amido (mg g^{-1} MS), lipídeos (mg g^{-1} MS) e proteínas solúveis totais (mg g^{-1} MS) em sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer após a embebição até diferentes teores de água entre papel umedecido, sob imersão em Ψ_w 0 MPa e em Ψ_w -1,2 MPa.

Teor de água (%)	Meio de embebição		
	Entre papel	Imersão em Ψ_w 0 MPa	Imersão em Ψ_w -1,2 MPa
Açúcares solúveis totais (mg g ⁻¹ MS)			
10 (inicial)	25,12 Ab	25,12 Ab	25,12 Aa
15	29,48 Aa	22,02 Bc	20,24 Bb
20	28,18 Aa	29,01 Aa	23,87 Ba
35	19,82 Bc	22,29 Ac	13,99 Cc
C.V. (%)	4,91		
Amido (mg g ⁻¹ MS)			
10 (inicial)	16,58 Aa	16,58 Aab	16,58 Aa
15	11,71 Ab	7,13 Bc	12,08 Ab
20	12,03 ABb	13,31 Ab	10,04 Bb
35	11,81 Bb	18,32 Aa	10,10 Bb
C.V. (%)	11,20		
Lipídeos (mg g ⁻¹ MS)			
10 (inicial)	385,4 Aa	385,4 Aa	385,4 Aa
15	392,8 Aa	360,7 Aa	391,6 Aa
20	404,7 Aa	408,1 Aa	389,2 Aa
35	409,6 Aa	416,9 Aa	371,8 Aa
C.V. (%)	7,58		
Proteínas solúveis totais (mg g ⁻¹ MS)			
10 (inicial)	128,82 Ab	128,82 Ab	128,82 Ab
15	153,56 Aa	124,62 Bb	144,68 Aa
20	130,28 Bb	141,41 Aa	122,01 Bb
35	152,32 Aa	123,00 Cb	140,59 Ba
C.V. (%)	3,43		

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância.

Tabela 4. Glicose (mg g^{-1} MS), frutose (mg g^{-1} MS) e sacarose (mg g^{-1} MS) em sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer após a embebição até diferentes teores de água entre papel umedecido, sob imersão em Ψ_w 0 MPa e em Ψ_w -1,2 MPa.

Teor de água (%)	Meio de embebição		
	Entre papel	Imersão em Ψ_w 0 MPa	Imersão em Ψ_w -1,2 MPa
Glicose (mg g ⁻¹ MS)			
10 (inicial)	0,36 Ac	0,36 Ab	0,36 Ac
15	0,43 Bbc	0,34 Bb	0,53 Ab
20	0,49 Bb	0,50 Ba	0,61 Aab
35	0,77 Aa	0,57 Ba	0,65 Ba
C.V. (%)	9,50		
Frutose (mg g ⁻¹ MS)			
10 (inicial)	0,30 Aa	0,30 Aa	0,30 Ab
15	0,34 Aa	0,30 Aa	0,34 Aab
20	0,34 Ba	0,32 Ba	0,43 Aa
35	0,36 Aa	0,36 Aa	0,35 Aab
C.V. (%)	12,47		
Sacarose (mg g ⁻¹ MS)			
10 (inicial)	13,46 Aa	13,46 Aa	13,46 Aa
15	14,97 Aa	10,37 Bb	12,49 Ba
20	13,30 Aa	12,89 Aa	11,77 Aa
35	8,92 Ab	10,23 Ab	8,40 Ab
C.V. (%)	8,88		

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância.

Tabela 5. Albuminas (mg g^{-1} MS), globulinas (mg g^{-1} MS), glutelinas (mg g^{-1} MS) e prolaminas (mg g^{-1} MS) em sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer após a embebição até diferentes teores de água entre papel umedecido, sob imersão em Ψ_w 0 MPa e em Ψ_w -1,2 MPa.

Teor de água (%)	Meio de embebição		
	Entre papel	Imersão em Ψ_w 0 MPa	Imersão em Ψ_w -1,2 MPa
Albuminas			
10 (inicial)	77,00 Abc	77,00 Aa	77,00 Aa
15	86,83 Aa	64,54 Cb	75,97 Ba
20	72,28 Bc	83,10 Aa	58,73 Cb
35	84,01 Aab	65,72 Bb	71,52 Ba
C.V. (%)		5,55	
Globulinas			
10 (inicial)	18,85 Ab	18,85 Aa	18,85 Ab
15	22,33 Ba	19,32 Ba	27,53 Aa
20	16,62 Ab	18,89 Aa	19,22 Ab
35	22,38 Aa	11,33 Cb	16,48 Bb
C.V. (%)		7,92	
Glutelinas			
10 (inicial)	24,00 Ab	24,00 Ac	24,00 Ac
15	33,02 Aa	29,76 ABab	28,92 Bb
20	29,99 Aa	27,90 Ab	30,81 Ab
35	32,33 Ba	31,80 Ba	36,58 Aa
C.V. (%)		5,70	
Prolaminas			
10 (inicial)	8,96 Ac	8,96 Ac	8,96 Ac
15	11,37 Ab	11,00 Ab	12,26 Ab
20	11,39 Bb	11,52 Bb	13,25 Ab
35	13,60 Ba	14,15 Ba	16,00 Aa
C.V. (%)		6,87	

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância.

Tabela 6. Germinação (%), velocidade de germinação e tempo médio de germinação (dias) de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer após a embebição até diferentes teores de água entre papel umedecido, sob imersão em Ψ_w 0 MPa e em Ψ_w -1,2 MPa.

Teor de água (%)	Meio de embebição		
	Entre papel	Imersão em Ψ _w 0 MPa	Imersão em Ψ _w -1,2 MPa
Germinação (%)			
10 (inicial)	67 Abc	67 Aab	67 Aa
15	72 Aab	72 Aa	60 Ba
20	60 Ac	62 Ab	45 Bb
35	76 Aa	42 Bc	15 Cc
C.V. (%)	8,72		
Velocidade de germinação			
10 (inicial)	1,48 Aab	1,48 Aa	1,48 Aa
15	1,45 ABab	1,60 Aa	1,35 Ba
20	1,24 Ab	1,13 Ab	0,76 Bb
35	1,59 Aa	0,74 Bc	0,17 Cc
C.V. (%)	13,74		
Tempo médio de germinação (dias)			
10 (inicial)	24 Aa	24 Ab	24 Ac
15	24 Aa	25 Ab	25 Ac
20	24 Ba	30 Aa	31 Ab
35	25 Ca	30 Ba	45 Aa
C.V. (%)	7,39		

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância.

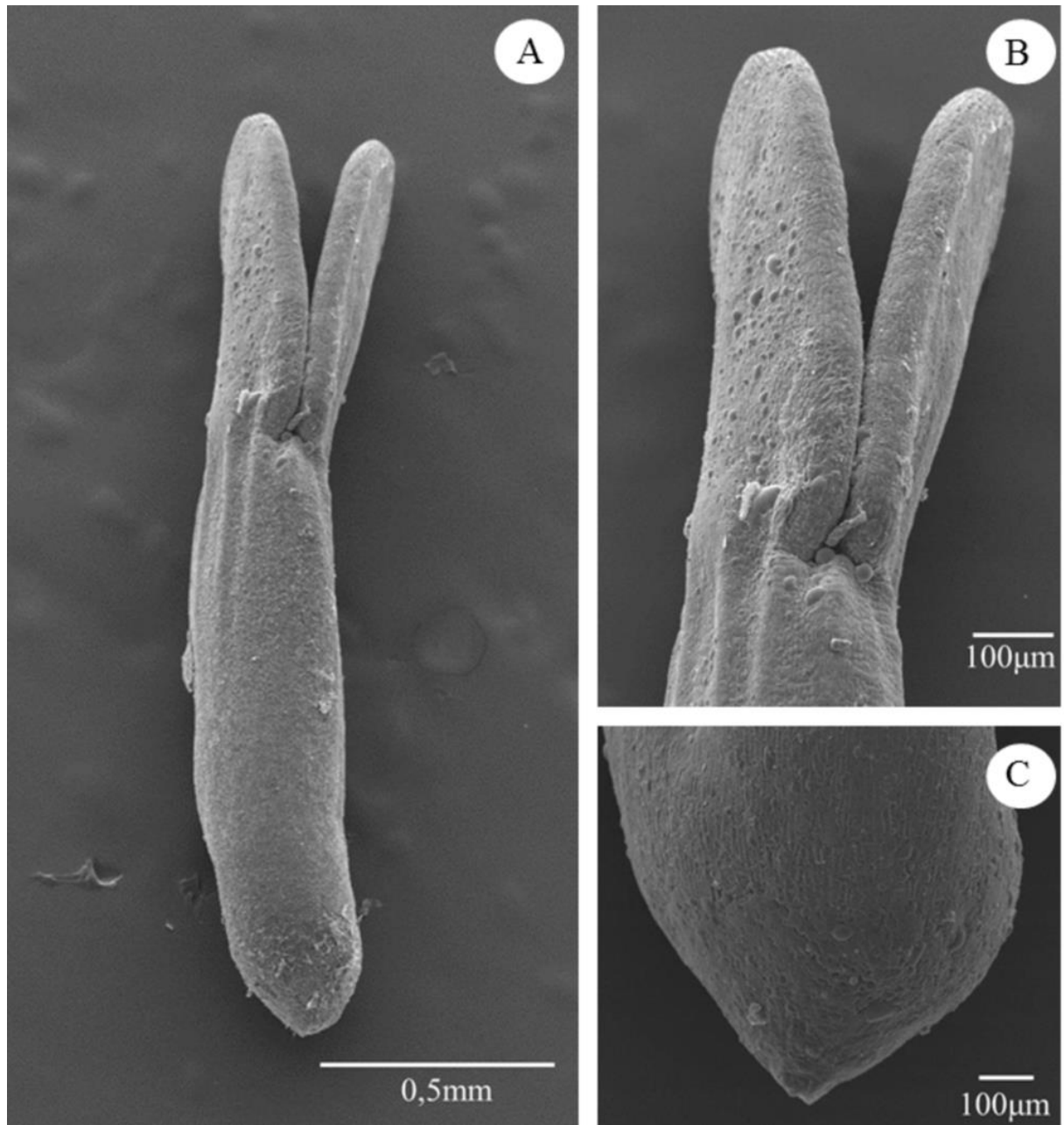


Figura 1. Visão geral do embrião de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer antes dos tratamentos de imersão (10% água) (A), região cotiledonar (B) e região radicular (C).

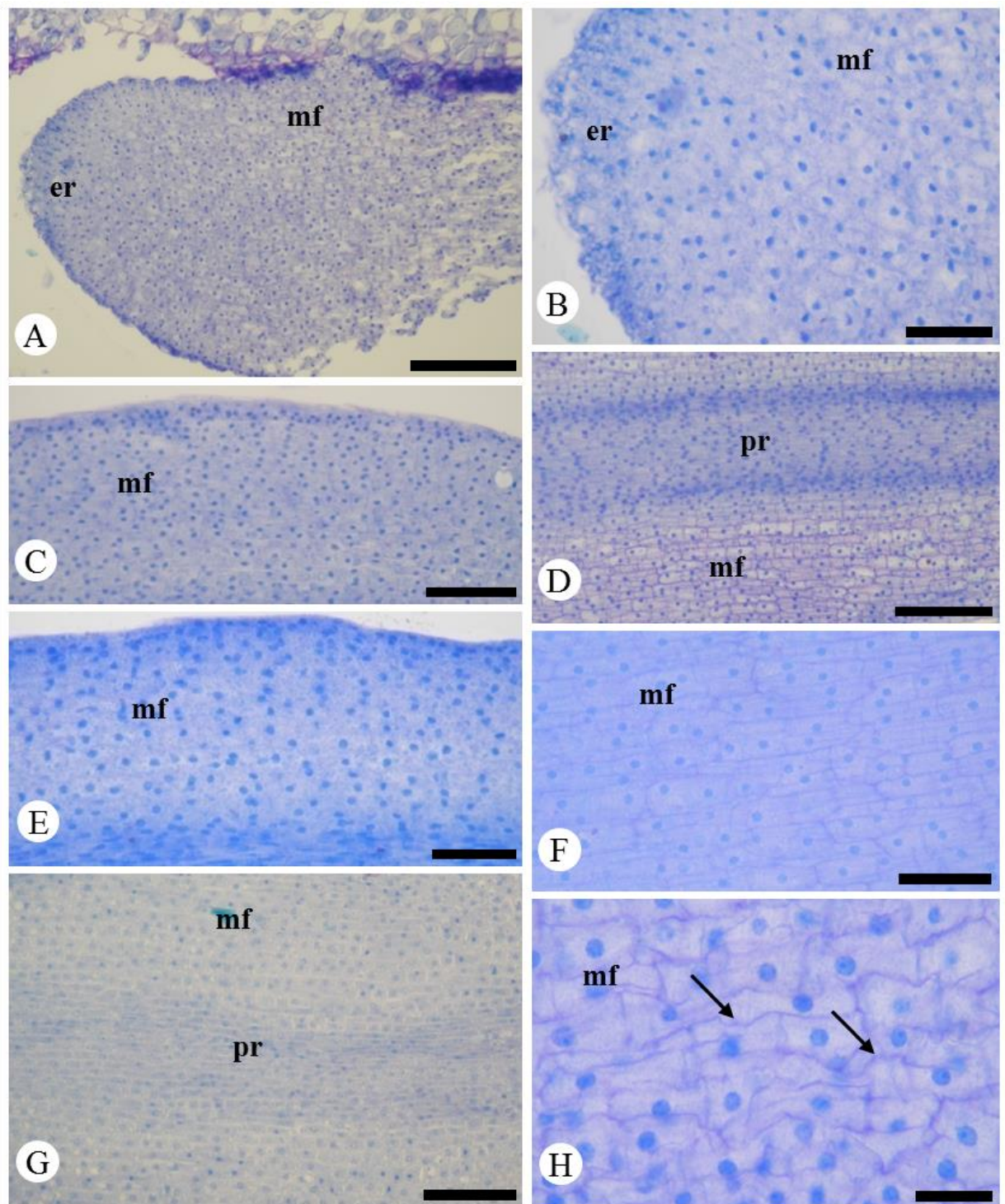


Figura 2. Secções longitudinais do eixo embrionário de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer antes dos tratamentos de embebição sob imersão (A, B), imersas em Ψ_w 0 MPa por 4 horas (C), 9 horas (E), 122 horas (G) e imersas em Ψ_w -1,2 MPa por 6 horas (D), 16 horas (F) e 317 horas (H). (A) Extremidade radicular (er) (B) Detalhe da extremidade radicular. (C, D, E, F, H) Detalhe do meristema fundamental (mf) (G) Detalhe do meristema fundamental e procâmbio (pr). Setas indicam paredes celulares irregulares. Barras de escala são 150 μ m (A); 100 μ m (C, D, G); 50 μ m (B, E, F); 20 μ m (H).

4. CAPÍTULO II

Embebição lenta causa danos ultraestruturais e alterações no metabolismo de sementes de
Annona emarginata (Schltdl.) H. Rainer?

Resumo

Sementes dispersas em condições de alagamento ou submetidas a tratamentos pré-germinativos como a imersão em reguladores vegetais ou *priming* podem apresentar variações no padrão de germinação. Neste estudo avaliamos a ocorrência de alterações metabólicas e danos ultraestruturais causados pela imersão das sementes de *Annona emarginata* em água (Ψ_w 0 MPa) durante a fase de embebição (fase I). Os tempos de imersão foram definidos de acordo com a curva de aquisição de água, considerando o tempo necessário para que sementes inicialmente secas (10% de água), atingissem os teores de 15%, 20% e 35% de água (fim da embebição). Além disso, reduzimos a velocidade de aquisição de água utilizando solução com Ψ_w -1,2 MPa (PEG), visando aumentar o tempo de imersão para que as sementes atingissem os mesmos teores de água. Os danos causados pelos menores tempos de imersão não reduziram a germinabilidade. As sementes imersas por 122 horas (fim da fase I) apresentaram danos no sistema de membranas e organelas celulares, o que resultou consequentemente em decréscimo na porcentagem e velocidade de germinação. Quando a velocidade de aquisição de água foi reduzida, fazendo com que as sementes levassem 317 horas para concluir a fase I, os danos ultraestruturais foram ainda maiores e os índices germinativos menores. Concluímos que o aumento do tempo de imersão devido a redução da velocidade de embebição para alcançar o fim da embebição pode não ser favorável à reorganização celular e redução de danos ultraestruturais nas sementes. Em sementes com fase I extensa podem ocorrer danos metabólicos severos se as mesmas forem imersas até o final da fase de embebição, causando redução da porcentagem de germinação.

Termos para indexação: Annonaceae, Danos de Membrana, Mitocôndria, Sistema antioxidante, Teor de água, Ultraestrutura.

Introdução

A embebição, fase I do padrão trifásico de aquisição de água durante a germinação das sementes, é geralmente rápida e envolve a aquisição de grande volume de água, devido à diferença entre o potencial hídrico da semente ortodoxa seca e do meio (Weitbrecht et al., 2011). Esta fase termina quando a entrada de água se estabiliza, o que ocorre quando as sementes alcançam em média de 30% a 35% de água. Embora considerada rápida, a duração desta fase varia em função de diversos fatores, como a composição do tegumento e das reservas da semente, umidade e temperatura do ambiente e temperatura da água (Soriano et al., 2011). Esta variação ocorre até entre espécies de um mesmo gênero, como é o caso de *Annona*. Enquanto em *A. squamosa* a fase I termina após 5 horas do início da imersão das sementes em água (Ferreira et al., 2014) em *A. crassiflora* o término desta fase ocorre após 144 horas (Silva et al., 2007).

Embora a embebição seja *por si* um processo físico dirigido pelo potencial matricial (Ψ_m) e portanto, também ocorra em sementes mortas (Krishnan et al., 2004), deve-se considerar que é nesta fase, com o início da reidratação, que sementes ortodoxas vivas reativam o metabolismo que havia sido reduzido antes da dispersão (Weitbrecht et al., 2011) e a respiração é aumentada dando prosseguimento ao processo germinativo (Benamar et al., 2008). Por ser a fase de reativação do metabolismo e, portanto de suma importância para o processo germinativo, o tempo de duração desta fase tem sido utilizado para a determinação do tempo de tratamentos pré-germinativos, como a imersão em reguladores vegetais (Amaro et al., 2009; Oliveira et al., 2010) e *priming* (Sharma et al., 2014).

No entanto, é durante esta fase que são observados danos em decorrência da elevada velocidade de entrada de água na semente. Deste modo, a embebição é também uma fase crítica, na qual podem ocorrer danos irreversíveis às membranas celulares, enquanto mudam do estado gel para o estado cristalino líquido (Corbineau, 2012), permitindo a lixiviação de

eletrólitos, açúcares e aminoácidos, comprometendo o processo germinativo (Kokubun, 2013). Neste contexto, a redução da velocidade de entrada de água nas sementes por meio da alteração do potencial osmótico (Ψ_s) da solução de imersão tem sido utilizada como estratégia para evitar tais danos (Chen et al., 2013; Paparella et al., 2015). A lenta hidratação da semente proporciona maior tempo para a reparação e/ou reorganização das membranas celulares, reduzindo os riscos de danos ao eixo embrionário (Varier et al., 2010; Sharma et al., 2014).

Por outro lado, a lenta entrada de água que ocorre naturalmente em sementes de *A. emarginata* até o fim da fase de embebição, que tem duração em torno de 109 horas (35% de água), ocasionou redução das variáveis germinativas (Gimenez et al., 2014a). Assim, enquanto a imersão até o fim da fase I é favorável à germinação de algumas espécies como *A. squamosa* (Ferreira et al., 2002) cuja fase I é mais rápida (5 horas), em outras espécies como em *A. emarginata* pode causar o decréscimo da germinabilidade. Desta forma, acredita-se que a redução da velocidade de entrada de água em sementes cuja embebição é naturalmente mais lenta como em *A. emarginata*, o aumento excessivo no tempo de duração da embebição provoca danos.

Nestas condições, se hipotetiza que os longos períodos de submersão podem resultar em estresse às sementes, devido a redução da disponibilidade de oxigênio no meio (hipoxia), o que se assemelharia a condições de alagamento por longos períodos. Sob condições de estresse como o causado pela hipoxia, espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas, tais como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$) (Jaleel et al., 2007). Estas EROs podem reagir com vários componentes biológicos como DNA, RNA, carboidratos, proteínas (Job et al., 2005) e lipídeos (Garg e Manchanda, 2009), prejudicando o funcionamento da célula. A interação entre as EROS e os lipídeos, por exemplo, causa a peroxidação dos lipídeos, levando à alteração da permeabilidade e degradação das membranas ou ainda à morte celular (Greggains et al., 2000; Ratajczak e

Pukacka, 2005). O dano oxidativo causado às proteínas mitocondriais pode levar à desintegração da matriz mitocondrial (Bartoli et al., 2004), além de alterações nas suas membranas, alterando a atividade desta organela e reduzindo conseqüentemente a produção de energia (Yin et al., 2009). Para controlar o efeito das EROs, as plantas apresentam um sistema de defesa antioxidante que inclui enzimas como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase (POD), as quais podem atuar eficientemente na manutenção das EROs em níveis não tóxicos (Foyer e Noctor, 2005).

Deste modo, este estudo teve como objetivo averiguar se o aumento do tempo, causado pela redução da velocidade de aquisição de água para alcançar a estabilidade da curva de embebição (fase *lag*), ocasiona danos ultraestruturais e metabólicos que resultem na redução da germinação de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer.

Material e Métodos

Imersão das Sementes

As sementes com teor de água inicial de 10% foram submetidas à embebição sob imersão em água e, para reduzir a velocidade de aquisição de água, foi utilizada solução de polietilenoglicol com potencial de -1,2 MPa, até atingirem os teores de 15%, 20% e 35% de água.

Oxigênio Diluído nas Soluções de Imersão

A mensuração do oxigênio diluído nas soluções de imersão foi realizada por meio de método eletrométrico empregando-se oxímetro Modelo DO-48, Marca PHTEK. Os resultados foram expressos em miligramas de oxigênio por litro da solução de imersão (mg L⁻¹).

Condutividade Elétrica (Lixiviação de Solutos)

Ao final dos períodos de imersão das sementes foi determinada a lixiviação de solutos pela leitura da condutividade elétrica nas soluções aquosas pelo método de massa. Os resultados foram expressos em microSiemens por centímetro ($\mu\text{S cm}^{-1}$).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão (MET), as sementes foram fixadas em glutaraldeído (2,5% com tampão fosfato 0,1M a pH 7,3), à 4°C *overnight*, sendo pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (OsO_4) em tampão fosfato na concentração acima citada, durante 2 horas sob temperatura ambiente. As amostras foram desidratadas em série graduada de soluções de acetona e incluídas em resina Araldite. Secções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e observadas em microscópio Philips TEM 100 a 60 kV (Philips, Czech Republic).

Determinação dos Níveis de Malondialdeído (Peroxidação de Lipídeos)

Os níveis de malondialdeído foram determinados nas sementes ao final de cada período de imersão, de acordo com técnica descrita por Heath e Packer (1968). Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do malondialdeído ($155 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo os resultados expressos em nanomol de malondialdeído por grama de massa seca ($\text{nmol de malondialdeído g}^{-1} \text{ MS}$).

Determinação da Atividade de Enzimas Antioxidantes: Superóxido dismutase, Catalase e Peroxidase

Para a extração enzimática foi utilizada metodologia descrita por Kar e Mishra (1976). A determinação da atividade da Superóxido Dismutase (EC 1.15.1.1) foi realizada de acordo

com o método de Peixoto et al. (1999). As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro a 560nm, sendo a atividade da enzima avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), expressa em unidade de SOD por miligrama de proteína (U mg^{-1} proteína). Uma unidade (U) da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio. A determinação da atividade da Catalase (EC 1.11.1.6) foi determinada empregando o protocolo de Peixoto et al. (1999). As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro a 240nm, utilizando para os cálculos o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($39,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade da enzima foi expressa em nanomol de H_2O_2 consumido por minuto por miligrama de proteína ($\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ consumido min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína). A atividade da Peroxidase (EC 1.11.1.7) foi determinada empregando o protocolo de Teisseire e Guy (2000). A formação de purpurogalina foi medida em espectrofotômetro a 430nm e seu coeficiente de extinção molar ($2,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi utilizado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em micromol de purpurogalina por minuto por miligrama de proteína ($\mu\text{mol purpurogalina min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína).

Testes de Germinação

Ao atingir cada um dos teores de água, as sementes foram submetidas ao teste de germinação conduzido em rolos de papel do tipo ‘germitest’ umedecidos com água deionizada e mantidos em germinador sob temperatura e fotoperíodo alternados (8h de escuro a 20°C e 16h de luz a 30°C) (Costa et al., 2011). A contagem das sementes germinadas foi realizada a cada 2 dias, considerando-se como germinadas as sementes com no mínimo 2 mm de raiz primária. As seguintes variáveis foram calculadas: porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (Silva e Nakagawa, 1995) e tempo médio de germinação (Edmond e Drapala, 1958).

Análises dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey à 5% de significância.

Resultados

Nas sementes imersas em Ψ_w 0 MPa (água pura) foram necessárias 4 horas para atingir 15% de água, 9 horas para 20% e 122 horas para atingir o teor de 35% de água (fim da embebição, fase *lag* ou de estabilização). Com a redução da velocidade de embebição de água empregando-se Ψ_w -1,2 MPa, o tempo para que as sementes atingissem 15%, 20% e 35% de água aumentou para 6, 16 e 317 horas respectivamente.

Em ambas as soluções de imersão (Ψ_w 0 e Ψ_w -1,2 MPa) verificamos que a concentração de oxigênio diluído reduziu ao longo do tempo, à medida que as sementes atingiram maiores teores de água (Tabela 1). Além disso, a solução com Ψ_w -1,2 MPa apresentou menores concentrações de oxigênio, independente do teor de água atingido pelas sementes.

A ocorrência de danos em função do tempo de imersão das sementes foi verificada pela análise dos lixiviados (Tabela 2), do estresse oxidativo e da peroxidação de lipídeos (Tabela 3). Observamos que ao alcançar 20% de água os danos somente resultaram em redução da germinação quando a velocidade de entrada de água foi reduzida. Deste modo, após 9 horas de imersão no Ψ_w 0 MPa houve o aumento do valor de lixiviados (Tabela 2), acompanhado do aumento dos níveis de MDA (Tabela 3). No entanto, nestas sementes foi observado o aumento da atividade da SOD (Tabela 3), evitando a ocorrência de maiores danos, o que resultou na manutenção da porcentagem de germinação (Tabela 4). Com a redução da velocidade de entrada de água (Ψ_w -1,2 MPa) verificamos que os níveis de MDA se mantiveram constantes (Tabela 3) assim como os valores de lixiviados (Tabela 2). No

entanto, vale salientar que os valores de lixiviados destas sementes eram maiores em relação às sementes imersas no Ψ_w 0 MPa desde o início da embebição (15% água).

Em relação ao tempo para atingir o fim da fase de embebição (35% água), observamos que tanto com velocidade natural de entrada de água (menor tempo: 122 horas), como com velocidade reduzida (maior tempo: 317 horas), ocorreram danos metabólicos e ultraestruturais nas sementes. No entanto, as sementes que adquiriram água mais lentamente (Ψ_w -1,2MPa) apresentaram danos ainda mais severos, resultando em porcentagens de germinação menores (15%) do que aquelas que embeberam no Ψ_w 0 MPa (42%) (Tabela 4).

Observamos que os valores de lixiviados aumentaram ($0,165 \mu\text{S cm}^{-1}$) após a imersão por 122 horas (35% água). Quando as sementes alcançaram os 35% de água mais lentamente, após 317 horas, verificamos maiores valores de lixiviação ($0,264 \mu\text{S cm}^{-1}$) em relação à imersão por 122 horas (Tabela 2). Também para as sementes imersas mais lentamente (317 horas), ocorreram os maiores valores de MDA, $10,5 \text{ nmol g}^{-1} \text{ MS}$ (Tabela 3), o que indica a ocorrência de maiores danos à membrana. Nesta condição, observamos baixa atividade da SOD e o aumento da atividade apenas da POD, o que não foi suficiente em controlar os níveis de EROs, resultando em maior peroxidação de lipídeos. A CAT não apresentou alterações em sua atividade em nenhuma das condições de imersão. Desta forma, o longo tempo de imersão para que as sementes atingissem o teor de 35% de água provocou maiores danos à membrana em função do aumento da peroxidação de lipídeos e elevada lixiviação de solutos.

Considerando os indicativos metabólicos de maiores danos nas sementes imersas até alcançarem o final da embebição (122h em Ψ_w 0 MPa e 317 horas em Ψ_w -1,2 MPa), realizamos a análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para a visualização das alterações celulares (Figura 1).

Nas sementes com o teor de água inicial (10%) as células do embrião continham parede celular com espessura regular, membrana plasmática, núcleo, mitocôndrias com

membranas interna e externa distinguíveis, retículo endoplasmático, numerosos e pequenos corpos lipídicos, grânulos de amido e vacúolos de reserva repletos de açúcares ou proteínas (Figura 1). No entanto, quando as sementes atingiram o teor de 35% de água (imersas por 122 ou 317 horas), as células do embrião apresentaram alterações. Após a imersão por 122 horas, as mitocôndrias apresentaram-se em maior abundância e com formato irregular, com cristas pouco desenvolvidas e difícil distinção entre as membranas interna e externa. Nas sementes imersas por 317 horas, além destas alterações também verificamos parede celular com irregularidades e sinais de degradação, e o rompimento das membranas dos vacúolos que anteriormente armazenavam açúcares (Figura 1). Estes açúcares foram lixiviados para a solução de imersão, refletindo nos maiores valores de lixiviados encontrados (Tabela 2).

Os danos observados nas sementes imersas até atingirem o fim da fase I (35%), seja com redução da velocidade de embebição (Ψ_w -1,2 MPa) ou não (Ψ_w 0 MPa), resultaram em redução das variáveis germinativas (Tabela 4). Nas sementes mantidas em água (Ψ_w 0 MPa) a porcentagem de germinação foi reduzida de 67% (10% água) para 42% (35% água), o tempo médio de germinação (TMG) aumentou de 24 dias para 30 dias e o índice de velocidade de germinação (IVG) reduzido de 1,54 para 0,74. Quando reduzimos a velocidade de entrada de água e aumentamos o tempo de imersão para 317 horas houve redução ainda maior na porcentagem de germinação (15%), IVG (0,17) e aumento no TMG (45 dias). Deste modo, verificamos a ocorrência de uma série de eventos a nível celular e metabólico indicando danos que se tornaram visíveis nas variáveis germinativas.

Discussão

A partir deste estudo se reforça a importância do conhecimento da curva de aquisição de água, para a determinação da duração de tratamentos que envolvam a imersão de sementes em soluções aquosas (Braga et al., 2010; Gimenez et al., 2014b). Sua importância também

compreende o conhecimento dos processos metabólicos que ocorrem em cada teor de água atingido pelas sementes, até o fim da embebição, a fim de garantir que danos procedentes de tratamentos de sementes não resultem em interpretação equivocada de resultados.

De modo geral, com o teor de 20% de água ocorre o primeiro aumento da respiração das sementes (Patanè et al., 2006), e portanto, o aumento da atividade das mitocôndrias, as quais compreendem o local de maior produção de EROs devido à cadeia respiratória (Rhoads et al., 2006). O aumento das EROs em função da respiração resultou em aumento dos danos nas membranas verificados por meio do aumento do MDA, que é subproduto da peroxidação dos lipídeos de membrana (Liu et al., 2009). Este aumento da peroxidação de lipídeos coincide com o aumento da lixiviação de solutos confirmando a ocorrência de danos na membrana. Nestas sementes também verificamos o aumento da atividade da SOD, a qual foi eficiente em reduzir as EROs a níveis não tóxicos (menos tóxicos) evitando danos ainda maiores.

Por outro lado, quando a velocidade de aquisição de água foi reduzida para alcançar os 20%, a menor disponibilidade de oxigênio da solução pode ter impedido o aumento da respiração. Deste modo, houve menor produção de EROs e consequentemente menor peroxidação de lipídeos. No entanto, sem o aumento da atividade respiratória o metabolismo das sementes pode ter permanecido inalterado, justificando a redução da porcentagem de germinação. Apesar de ter ocorrido menor peroxidação de lipídeos, o que significaria menores danos de membrana, houve maior lixiviação de solutos. Desta forma, os resultados demonstram que nem sempre a redução da velocidade de entrada de água na semente impede a ocorrência de danos irreparáveis no sistema de membranas, garantindo a germinação.

Os danos causados às membranas celulares das sementes imersas por 122 horas (Ψ 0 MPa), para atingir o teor de 35% de água, levaram ao aumento do extravasamento do conteúdo celular para o meio e à redução do vigor das sementes, o que resultou em

porcentagens de germinação ainda menores, conforme já demonstrado em outros trabalhos (Weitbrecht et al., 2011; Ocvirk et al., 2014). Nas sementes imersas por 317 horas, a redução da velocidade de aquisição de água e consequentemente o aumento do tempo de imersão para atingir o teor de 35% de água afetou ainda mais a integridade das membranas, visto que nestas sementes ocorreu o maior valor de lixiviados ($0,264 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$). O aumento da lixiviação ainda pode estar relacionado com a deterioração das sementes (Corbineau, 2012), visto o extenso tempo de imersão em solução com reduzida disponibilidade de oxigênio. Além disso, a análise ultraestrutural mostrou o rompimento das membranas de vacúolos que anteriormente armazenavam açúcares, o que coincide com o aumento dos valores de lixiviados. Assim, com uma menor fonte de energia para a manutenção do metabolismo e crescimento do embrião, ocorreram as menores porcentagens de germinação (15%).

Nas sementes imersas por 122 horas (embebição em maior velocidade) a peroxidação de lipídeos foi reduzida em consequência do aumento da atividade da SOD e da POD, as quais foram eficientes em controlar os níveis de EROs, mas não foi capaz de evitar aumento dos lixiviados. Por outro lado, nas sementes imersas por 317 horas (embebição em menor velocidade) o aumento da peroxidação de lipídeos pode ter ocorrido em função do aumento das EROs causado por alterações nas membranas da mitocôndria, conforme demonstrado por Yin et al. (2009). Nestas sementes o sistema antioxidante parece não ter sido suficiente para controlar os níveis de EROs, visto o aumento da atividade apenas da POD, enquanto a SOD e a CAT apresentaram baixa atividade. Desta forma, considerando que a mitocôndria é uma potencial fonte de O_2^- e que a eliminação deste radical é realizada pela SOD (Mittler, 2002), os níveis de EROs se mantiveram elevados causando o aumento da peroxidação de lipídeos.

A análise ultraestrutural das células do embrião possibilitou a visualização dos danos causados pelos longos períodos de imersão das sementes. Os danos celulares que incluem modificações na estrutura das mitocôndrias, tais como a redução ou ausência de cristas e

desorganização do sistema de membranas, podem levar à alteração da fosforilação oxidativa, processo no qual ocorre a produção de ATP (Frey e Mannella, 2000). Danos mitocondriais semelhantes foram observados em sementes de *Glycine max* L. submetidas à embebição sob baixas temperaturas (Yin et al., 2009). Os autores salientam que estes danos levam à baixa disponibilidade de ATPs, visto que o eixo embrionário não contém cloroplastos para o processo de fotofosforilação e a mitocôndria consiste na principal fonte de energia durante a embebição.

Ainda, semelhante ao alagamento, a imersão pelos longos períodos submeteu as sementes à hipoxia mesmo com a utilização de oxigenação artificial. Assim, além dos danos mitocondriais houve também menor disponibilidade de oxigênio, os quais comprometeram a produção de ATPs, visto que o oxigênio é o aceptor final de elétrons na fosforilação oxidativa (Gupta et al., 2009). Deste modo, a soma destes fatores reduziu a produção de ATPs a um nível abaixo da demanda celular, comprometendo o metabolismo. A manutenção do metabolismo e até mesmo a sobrevivência sob hipoxia estão diretamente relacionadas à capacidade de produzir energia nesta condição (Shingaki-Wells et al., 2014). E deste modo, podemos concluir que além da lixiviação de solutos e da ineficiência do sistema antioxidante, a incapacidade de produção de energia frente aos danos mitocondriais e a hipoxia levou à redução da porcentagem de germinação das sementes de *A. emarginata*.

Deste modo, salientamos que para cada espécie é necessário determinar o tempo máximo de imersão que não provoque danos. Para espécies que adquirem água lentamente, como a *A. emarginata*, a imersão das sementes até o término da fase de embebição (fase I), causa danos principalmente nas mitocôndrias e membranas celulares. Além disso, se a velocidade de aquisição de água for reduzida, aumentando consequentemente o tempo para a conclusão da fase I, os danos são ainda maiores. No entanto, para sementes que adquirem água mais rapidamente e cuja fase I é mais rápida, como a *A. squamosa* (5 horas) (Ferreira et

al., 2002) e a *A. cherimola* x *A. squamosa* (36 horas) (Braga et al., 2010; Oliveira et al., 2010), o tempo de imersão até o término da fase I não é danoso e resulta em alta germinabilidade. Em resumo a informação de que embebição lenta até alcançar a fase *lag* da curva de aquisição de água provoca danos ultraestruturais e alterações no metabolismo de sementes de *A. emarginata* explica as baixas porcentagens de germinação de certas espécies quando submetidas a longos períodos de imersão, principalmente aquelas que já apresentam lenta aquisição de água.

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Processo 2012/24013-1.

Referências

- Amaro ACE, Zucareli, V, Mischán, MM, Ferreira, G.** 2009 Combinações entre GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-aminopurina e ethephon na germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. Revista Brasileira de Sementes **31**, 195-202.
- Bartoli CG, Gómez F, Martínez DE, Guamet, JJ.** 2004 Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Experimental Botany **55**, 1663-1669.
- Benamar A, Rolletschek H, Borisjuk L, Avelange-Macherel MH, Curien G, Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Macherel D.** 2008 Nitrite-nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier anoxia. Biochimica et Biophysica Acta **1777**, 1268-1275.
- Braga JF, Ferreira G, Pinho SZ, Braga LF, Sousa MP.** 2010 Germination of atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) cv. Gefner seeds subjected to treatments with plant growth regulators. International Journal of Science and Nature **1**, 120-126.
- Chen K, Fessehaie A, Arora R.** 2013 Aquaporin expression during seed osmopriming and post-priming germination in spinach. Biologia Plantarum **57**, 193-198.

Corbineau F. 2012 Markers of seed quality: from present to future. *Seed Science Research* **22**, S61-S68.

Costa PN, Bueno SSC, Ferreira G. 2011 Fases da germinação de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H.Rainer em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Fruticultura* **33**, 253-260.

Edmond JB, Drapala WS. 1958 The effects of temperature, sand and acerone on germination of okra seed. *Proceedings of American Society for Horticultural Science* **71**, 428-434.

Ferreira G, Erig PR, Moro E. 2002 Uso de ácido giberélico em sementes de fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) visando a produção de mudas em diferentes embalagens. *Revista Brasileira de Fruticultura* **24**, 178-182.

Ferreira G, González-Esquinca AR, De-La-Cruz-Chacón I. 2014 Water uptake by *Annona diversifolia* Saff. and *A. purpurea* Moc. & Sessé Ex Dunal seeds (Annonaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura* **36**, 288-295.

Foyer CH, Noctor G. 2005 Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**, 1866-1875.

Frey TG, Mannella CA. 2000 The internal structure of mitochondria. *Trends Biochemical Science* **25**, 319-324.

Garg N, Manchanda G. 2009 ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems* **143**, 81-96.

Gimenez JI, Ferreira G, Corsato JM. 2014 (a) Soluble sugars and germination of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seeds submitted to immersion in GA₃ up to different water contents. *Revista Brasileira de Fruticultura* **36**, 281-287.

Gimenez JI, Ferreira G, Cavariani C. 2014 (b) Tetrazolium test for assessment of seed viability of atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). *Journal of Seed Science* **36**, 357-361.

Greggains V, Finch-Savage WE, Quick WP, Atherton NM. 2000 Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. *New Phytologist* **148**, 267-276.

Gupta KJ, Zabalza A, van Dongen JT. 2009 Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiologia Plantarum* **137**, 383-391.

Heath RL, Packer L. 1968 Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry Biophysics* **125**, 189-198.

Jaleel CA, Manivannan P, Sankar B, Kishorekumar A, Gopi R, Somasundaram R, Panneerselvam R. 2007 Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. *Colloids Surf B: Biointerfaces* **60**, 110-116.

Job C, Rajjou L, Lovigny Y, Belghazi M, Job D. 2005 Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. *Plant Physiology* **138**, 790-802.

Kar M., Mishra D. 1976 Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology* **57**, 315-319.

Kokubun M. 2013 Genetic and cultural improvement of soybean for waterlogged conditions in Asia. *Field Crops Research* **152**, 3-7.

Krishnan P, Joshi DK, Nagarajan S, Moharir AV. 2004 Characterization of germinating and non-viable soybean seeds by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Seed Science Research* **14**, 355-362.

Liu ZJ, Zhang XL, Bai JG, Suo BX, Xu PL, Wang L. 2009 Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves. *Scientia Horticulturae* **121**, 138-143.

Mittler R. 2002 Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science* **7**, 405-410.

Ocvirk D, Spoljarevic M, Markovic SS, Lisjak M, Hanzer R, Teklic T. 2014 Seed germinability after imbibition in electrical conductivity test and relations among maize seed vigour parameters. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **12**, 140-145.

Oliveira MC, Ferreira G, Guimarães VF, Dias GB. 2010 Germinação de sementes de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) cv ‘Gefner’ submetidas a tratamentos com ácido giberélico (GA₃) e ethephon. *Revista Brasileira de Fruticultura* **32**, 544-554.

Paparella S, Araújo SS, Rossi G, Wijayasinghe M, Carbonera D, Balestrazzi A. 2015 Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Cell Reports* **34**, 1281-1293.

Patanè C, Cavallaro V, Avola G, D'Agosta G. 2006 Seed respiration of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] during germination as affected by temperature and osmoconditioning. *Seed Science Research* **16**, 251-260.

Peixoto HPP, Cambraia J, Sant'Ana R, Mosquim PR, Moreira AM. 1999 Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **11**, 137-143.

Ratajczak E, Pukacka S. 2005 Decrease in beech (*Fagus sylvatica*) seed viability caused by temperature and humidity conditions as related to membrane damage and lipid composition. *Acta Physiologiae Plantarum* **27**, 3-12.

Reynolds ES. 1963 The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**, 208-212.

Sharma AD, Rathore SVS, Srinivasan K, Tyagi RK. 2014 Comparison of various seed priming methods for seed germination, seedling vigour and fruit yield in okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench.). *Scientia Horticulturae* **165**, 75-81.

Shingaki-Wells R, Millar AH, Whelan J, Narsai R. 2014 What happens to plant mitochondria under low oxygen? An omics review of the responses to low oxygen and reoxygenation. *Plant, Cell and Environment* **37**, 2260-2277.

Silva JB, Nakagawa J. 1995 Estudos de fórmulas para cálculo de velocidade de germinação. *Informativo Abrates* **5**, 62-73.

Silva EAA, Melo DLB, Davide AC, Bode N, Abreu GB, Faria JMR, Hilhorst HWM. 2007 Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. *Annals of Botany* **99**, 823-830.

Soriano D, Orozco-Segovia A, Márquez-Guzmán J, Kitajima K, Buen AG, Huante P. 2011 Seed reserve composition in 19 tree species of a tropical deciduous forest in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. *Annals of Botany* **107**, 939-951.

Teisseire H, Guy V. 2000 Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science* **153**, 65-72.

Varier A, Vari AK, Dadlani M. 2010 The subcellular basis of seed priming. *Current Science* **99**, 450-456.

Weitbrecht K, Müller K, Leubner-Metzger G. 2011 First on the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3289-3309.

Yin G, Sun H, Xin X, Qin G, Liang Z, Jing X. 2009 Mitochondrial damage in the soybean seed axis during imbibition at chilling temperatures. *Plant Cell Physiology* **50**, 1305-1318.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Oxigênio diluído (mg L^{-1}) nas soluções de imersão das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ao atingir os diferentes teores de água sob imersão em Ψ_w 0 MPa e em Ψ_w -1,2 MPa.

Teor de água (%)	Oxigênio diluído (mg L^{-1})	
	Meio de imersão	
	Ψ_w 0 MPa	Ψ_w -1,2 MPa
15	3,69 Aa	2,23 Ba
20	3,06 Ab	2,04 Bb
35	1,17 Ac	0,46 Bc

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância.

Tabela 2. Condutividade elétrica (C.E. [$\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$]) nas sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ao atingir os diferentes teores de água sob imersão em Ψ_w 0 MPa e em Ψ_w -1,2 MPa.

Teor de água (%)	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	
	Meio de imersão	
	Ψ_w 0 MPa	Ψ_w -1,2 MPa
10 (inicial)	0,007 Ad	0,007 Ac
15	0,047 Bc	0,090 Ab
20	0,072 Bb	0,091 Ab
35	0,165 Ba	0,264 Aa

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância.

Tabela 3. Malondialdeído (nmol g^{-1} MS), Superóxido dismutase (U mg^{-1} Proteína), e Peroxidase ($\mu\text{mol purpurogalina min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Proteína) nas sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer após embebição sob imersão em Ψ_w 0 MPa e em Ψ_w -1,2 MPa, até os diferentes teores de água.

Teor de água (%)	Meio de imersão	
	Ψw 0 MPa	Ψw -1,2 MPa
	Malondialdeído (nmol g ⁻¹ MS)	
15	9,5 Ab	9,4 Aab
20	11,7 Aa	8,7 Bb
35	7,4 Bc	10,5 Aa
C.V. (%)	6,82	
Superóxido dismutase (U mg ⁻¹ Proteína)		
15	472,9 Bc	600,7 Aa
20	540,6 Ab	387,9 Bb
35	671,5 Aa	424,3 Bb
C.V. (%)	4,62	
Peroxidase (μmol purpurogalina min ⁻¹ mg ⁻¹ Proteína)		
15	6,4 Bb	10,1 Ab
20	6,8 Bb	8,3 Ac
35	8,3 Ba	13,0 Aa
C.V. (%)	6,70	

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância.

Tabela 4. Germinação (%), tempo médio de germinação (TMG [dias]) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer após embebição sob imersão em Ψ_w 0 MPa e em Ψ_w -1,2 MPa, até os diferentes teores de água.

Teor de água (%)	Meio de imersão	
	Ψw 0 MPa	Ψw -1,2 MPa
	Germinação (%)	
10 (inicial)	67 Aa	67 Aa
15	62 Ab	65 Aa
20	64 Aab	44 Bb
35	42 Ac	15 Bc
C.V. (%)	4,89	
Tempo médio de germinação (dias)		
10 (inicial)	24 Ab	24 Ac
15	25 Ab	25 Ac
20	30 Aa	31 Ab
35	30 Ba	45 Aa
C.V. (%)	6,34	
Velocidade de germinação		
10 (inicial)	1,54 Aa	1,54 Aa
15	1,69 Aa	1,41 Ba
20	1,18 Ab	0,76 Bb
35	0,74 Ac	0,17 Bc
C.V. (%)	8,26	

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância.

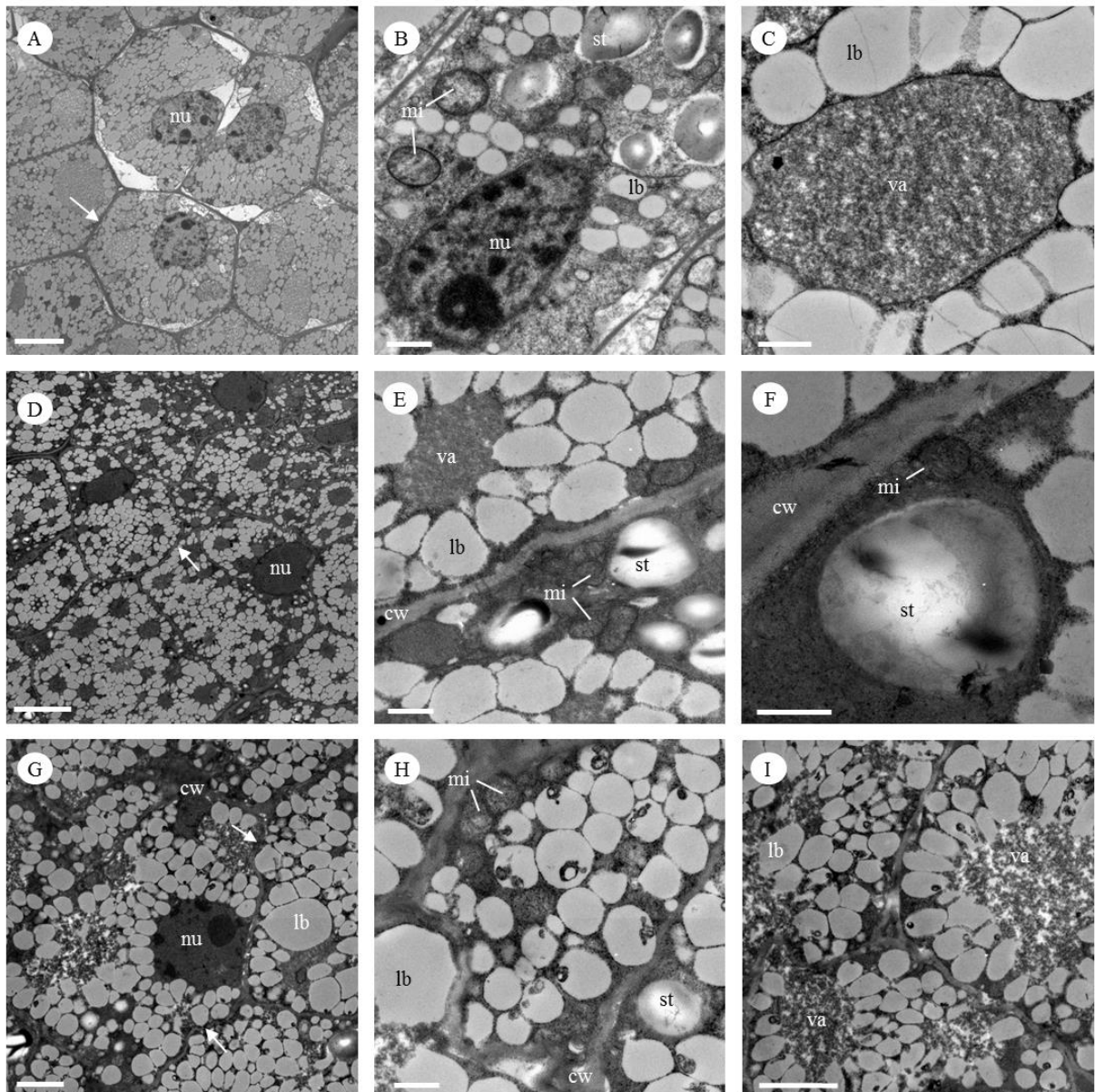


Figure 1. Ultraestrutura do eixo embrionário das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer antes da embebição (A-C), após 122 horas (D-F) e 317 horas de imersão (G-I). (A) Visão geral das células do eixo antes da embebição e (D) após 122 horas com paredes celulares espessas, (G) e após 317 horas com paredes celulares desuniformes. Setas indicam parede celular. (B, C) Ultraestrutura antes da embebição, núcleo (nu), mitocôndria (mi) com cristas e membrana interna e externa distinguíveis, numerosos corpos lipídicos (lb), grãos de amido (st), e vacúolos de armazenamento contendo açúcares (va). (E, F) Mudanças ultraestruturais após 122 horas de imersão incluem maior abundância de mitocôndrias, com formato irregular, cristas pouco desenvolvidas, e difícil distinção entre membranas interna e externa. (H, I) Mudanças ultraestruturais após 317 horas de imersão incluem paredes celulares desuniformes (cw) com sinais de degradação e rompimento de vacúolos de armazenamento de açúcares, maior abundância de mitocôndrias, com formato irregular, cristas pouco desenvolvidas, e difícil distinção entre membranas interna e externa. Barras de escalas são 5 μm (A, D); 0,6 μm (B, E, H); 0,5 μm (C, F); 2 μm (G, I).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fato das sementes permanecerem sob imersão por longos períodos para atingirem maiores teores de água, sugere que o tempo de imersão seja o responsável pelo decréscimo germinativo. No entanto, as alterações nas respostas metabólicas e germinativas ocorrem em decorrência da redução da disponibilidade de oxigênio no meio ao longo da embebição, atingindo concentrações próximas à anoxia (ausência de O_2).

Desta forma, o meio de embebição em que as sementes alcançam a estabilização da curva (fim da embebição) altera as respostas no metabolismo e na germinação, em decorrência da variação na disponibilidade de oxigênio. Quando as sementes atingem o final da fase de embebição (35%) entre papel umedecido (normoxia) a germinabilidade é mantida, o que não ocorre quando o teor de 35% de água é atingido sob imersão em soluções com Ψ_w 0 MPa ou Ψ_w -1,2 MPa (hipoxia) nas quais a germinabilidade é reduzida (42% e 15%, respectivamente).

A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer não é tolerante à hipoxia, sendo a concentração limite de tolerância em torno de 2,23 mg L⁻¹ de oxigênio dissolvido no meio aquoso.

A utilização do sistema artificial de aeração deve ser avaliada quanto à quantidade de oxigênio disponibilizada no meio de imersão e sua capacidade em manter os níveis de oxigenação, sem restrições ao metabolismo germinativo.

Tendo em vista a aplicação prática deste estudo, os resultados demonstram que quando houver a necessidade de tratamentos de imersão, como por exemplo a aplicação de reguladores vegetais ou *priming*, deve-se estabelecer a curva de embebição com monitoramento dos níveis de oxigênio e relacionar com a germinabilidade, sendo assim possível determinar o tempo de imersão durante os tratamentos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o fator limitante durante a embebição de sementes em soluções aquosas e que pode auxiliar a definir o tempo de imersão é a determinação do nível crítico de disponibilidade de oxigênio, a fim de evitar danos irreversíveis (ultraestruturais e metabólicos) que resultem em redução da germinabilidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ALMEIDA, L.F.P.; ALENCAR, C.M.; YAMANISHI, O.K. Propagação por enxertia de atemoia ‘Thompson’ sobre espécies de *Rollinia*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.2, p.653-656, 2010.
- ALMEIDA, J.R.G.S.; ARAÚJO, C.S.; PESSOA, C.O.; COSTA, M.P.; PACHECO, A.G.M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, p.258-264, 2014.
- AMARO, A.C.E.; ZUCARELI, V.; MISCHAN, M.M.; FERREIRA, G. Combinações entre GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-aminopurina e ethephon na germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.105-202, 2009.
- ANESE, S.; SILVA, E.A.A.; DAVIDE, A.C.; FARIA, J.M.R.; SOARES, G.C.M.; MATOS, A.C.B.; TOOROP, P.E. Seed priming improves endosperm weaking, germination, and subsequent seedling development of *Solanum lycocarpum* St. Hil. **Seed Science & Technology**, v.39, p.125-139, 2011.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, p.399-436, 2009.
- ATAÍDE, G.M.; BORGES, E.E.L.; GONÇALVES, J.F.C.; GUIMARÃES, V.M.; FLORES, A.V.; BICALHO, E.M. Alterations in seed reserves of *Dalbergia nigra* ((Vell.) Fr All. Ex Benth.) during hydration. **Journal of Seed Science**, v.35, n.1, p.56-63, 2013.
- BAILEY-SERRES, J.; FUKAO, T.; GIBBS, D.J.; HOLDSWORTH, M.J.; LEE, S.C.; LICAUSI, F.; PERATA, P.; VOESENEK, L.A.C.J.; van DONGEN, J.T. Making sense of low oxygen sensing. **Trends in Plant Science**, v.17, p.129-138, 2012.
- BAILEY-SERRES, J.; FUKAO, T.; GIBBS, D.J.; HOLDSWORTH, M.J.; LEE, S.C.; LICAUSI, F.; PERATA, P.; VOESENEK, L.A.C.J.; DONGEN, J.T. Making sense of low oxygen sensing. **Trends in Plant Science**, v.17, n.3, p.1360-1385, 2012.

¹ Normas ABNT NBR 6023:2002.

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

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intercellular signalling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, v.331, p.806-814, 2008.

BANTI, V.; GIUNTOLI, B.; GONZALI, S.; LORETI, E.; MAGNESCHI, L.; NOVI, G.; PAPARELLI, E.; PARLANTI, S.; PUCCIARIELLO, C.; SANTANIELLO, A.; PERATA, P. Low oxygen response mechanisms in green organisms. **International Journal of Molecular Science**, v.14, p.4734-4761, 2013.

BARON, D.; FERREIRA, G.; RODRIGUES, J.D.; BOARO, C.S.F.; MACEDO, A.C. Gas exchange, physiological indexes and ionic accumulation in *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seedlings in nutrients solution. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n.3, p.361-376, 2013.

BARTOLI, C.G.; GÓMEZ, F.; MARTÍNEZ, D.E.; GUIAMET, J.J. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1663-1669, 2004.

BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v.14, p.1-16, 2004.

BENECH-ARNOLD, R.L.; GUALANO, N.; LEYMARIE, J.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.6, p.1423-1430, 2006.

BERNARDES, T.G.; ESTRÊLA, C.T.; NAVES, R.V.; REZENDE, C.F.A.; MESQUITA, M.A.M.; PIRES, L.L. Efeito do armazenamento e de fitohormônios na qualidade fisiológica de sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.3, p.163-168, 2007.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3 ed. New York: Springer, 2013. 392p.

BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K.V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.359-373, 2010.

BONAVENTURE, L. El cultivo de la cherimoya y de su híbrido atemoya en Brasil. **Acta Horticulturae**, v.497, p.147-151, 1999.

BOVERIS, A.; PUNTARULO, S.A.; ROY, A.H.; SANCHEZ, R.A. Spontaneous chemiluminescence of soybean axis during imbibition. **Plant Physiology**, v.76, p.447-451, 1984.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, n.2, p.83-116, 1992.

BRAGA, J.F.; FERREIRA, G.; PINHO, S.Z.; BRAGA, L.F.; SOUSA, M.P. Germination of atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) cv. Gefner seeds subjected to treatments with plant growth regulators. **International Journal of Science and Nature**, v.1, n.2, p.120-126, 2010.

CAMPBELL, C.W.; POPENOE, I. Effect of gibberellic acid on seed dormancy of *Annona diversifolia* Salf. **Proceedings of the Tropical Region American Society for Horticultural Science**, v.11, p.33-36, 1968.

CAMPOS, F.G.; BARON, D.; MARQUES, M.O.M.; FERREIRA, G.; BOARO, C.S.F. Characterization of the chemical composition of the essential oils from *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer 'terra-fria' and *Annona squamosa* L.. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, p.202-208, 2014.

CARVALHO; N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.

CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs.) **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.149-162.

CAVALCANTE, T.R.M.; NAVES, R.V.; SERAPHIN, J.C.; CARVALHO, G.D. Diferentes ambientes e substratos na formação de mudas de araticum. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.1, p.235-240, 2008.

CHATROU, L.W.; PIRIE, M.D.; ERKENS, R.H.K. ; COUVREUR, T.L.P. ; NEUBIG, K.M.; ABBOTT, J.R.; MOLS, J.B.; MAAS, J.W.; SAUNDERS, R.M.K.; CHASE, M.W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.169, p.5-40, 2012.

CHIU, K.Y.; CHEN, C.L.; SUNG, J.M. Why low temperature primed sh-2 sweet corn seeds have better storability: some physiological clues. **Seed Science and Technology**, v.33, p.199–213, 2005.

CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, v.22, p.61-68, 2012.

COSTA, P.N.; BUENO, S.S.C.; FERREIRA, G. Fases da germinação de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H.Rainer em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.1, p.253-260, 2011.

DE LA CRUZ-CHACÓN, I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. **Natural Product Research**, v.26, n.1, p.42-49, 2012.

DIAZ-VIVANCOS, P.; BARBA-ESPIN, G.; HERNANDEZ, J.A. Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. **Plant Cell Reports**, v.32, p.1491-1502, 2013.

DONGEN, J.T.; LICAUSI, F. Oxygen sensing and signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v66, p.345-367, 2015.

ELKOCA, E.; HALILOGLU, K.; ESITKEN, A.; ERCISLI, S. Hydro- and osmopriming improve chickpea germination. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v.57, p.193-200, 2007.

FELLE, H.H. pH Regulation in anoxic plants. **Annals of Botany**, v.96, p.519-532, 2005.

FERREIRA, G. **Reguladores vegetais na superação da dormência, balanço hormonal, e degradação de reservas em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc. e Sessé ex Dunal (Annonaceae)**. 101f. Tese (Livre-docência). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

FERREIRA, G., CEREDA, E., SILVA, C.P., CUNHA, R.J.P., CATANEO, A. Imbibition study of sugar apple (*Annona squamosa* L.) and atemoya (*Annona squamosa* L. x *A. Cherimola* Mill.) seeds. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS, 1., 1997, Chapingo, México. **Memorias...** Chapingo, México: Universidad Autónoma Chapingo, 1997. p.210-224.

FERREIRA, G.; ERIG, P.R.; MORO, E. Uso de ácido giberélico em sementes de fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) visando a produção de mudas em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, p.178-182, 2002.

FERREIRA, G.; GIMENEZ, J.I.; CORSATO, J.M.; OLIVEIRA, M.C. Germinação de sementes de anonáceas. In: FERREIRA, G.; KAVATI, R.; BOARO, C.S.F.; FERRARI, T.B.; LEONEL, S. (Ed.) *Anonáceas: propagação e produção de mudas*. Botucatu: FEPAF. 2013. p.19-43.

FERREIRA, G.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I. Water uptake by *Annona diversifolia* Saff. and *A. purpurea* Moc. & Sessé Ex Dunal seeds (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, p.288-295, 2014.

FERREIRA, G.; GUIMARÃES, V.F.; PINHO, S.Z.; OLIVEIRA, M.C.; RICHART, A.; BRAGA, J.F.; DIAS, G.B. Curva de absorção de água em sementes de atemóia (*Annona cherimola* MILL x *Annona squamosa* L.) CV.'Gefner'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.1, p.121-124, 2006.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v.17, p.1866-1875, 2005.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, v.143, p.81-96, 2009.

GIMENEZ, J.I.; FERREIRA, G.; CORSATO, J.M. Soluble sugars and germination of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seeds submitted to immersion in GA₃ up to different water contents. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, p.281-287, 2014.

GIMENO-GILLES, C.; LELIÈVRE, E.; VIAU, L.; MALIK-GHULAM, M.; RICOULT, C.; NIEBEL, A.; LEDUC, N.; LIMAMI, A.M. ABA-Mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: modifying

enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. **Molecular Plant**, v.2, n.1, p.108-119, 2009.

GOMES, M.P.; GARCIA, Q.S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia**, v.68, n.3, p.351-357, 2013.

GRAEBER, K.; LINKIES, A.; MÜLLER, K.; WUNCHOVA, A.; ROTT, A.; LEUBNER-METZGER, G. Cross-species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae DOG1 genes. **Plant Mol. Biol.**, v.73, p.67–87, 2010.

GREGGAINS, V.; FINCH-SAVAGE, W.E.; QUICK, W.P.; ATHERTON, N.M. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, v.148, p.267-276, 2000.

GUPTA, K.J.; ZABALZA, A.; DONGEN, J.T. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. **Physiologia Plantarum**, v.137, p.383-391, 2009.

HADAS, A. Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. **Journal of Experimental Botany**, v.27, p.480-489, 1976.

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; AELST, A.C.; HEMMINGA, M.A. Imbibitional leakage from anhydrobiotes revisited. **Plant, Cell and Environment**, v.22, p.1121-1131, 1999.

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.60, p.110-116, 2007.

JOB, C.; RAJJOU, L.; LOVIGNY, Y.; BELGHAZI, M.; JOB, D. Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. **Plant Physiology**, v.138, p.790-802, 2005.

JUBES, J.T.; MARTINEZ, H.; PADILLA, E.; OSTE, C.A. Efectos de escarificacion, medio, posicion de siembra y ácido gibberellico, sobre la germinacion de semillas em cherimoya

(*Annona cherimolia* Mill). **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.12, n.1/2, p.161-171, 1975.

KATO-NOGUCHI, H. Pyruvate metabolism in rice coleoptiles under anaerobiosis. **Plant Growth Regulation**, v.50, p-41-46, 2006.

KODDE, J., BUCKLEY, W.T., GROOT, C.C., RETIERE, M., ZAMORA, A.M.V. E GROOT, S.P.C. A fast ethanol assay to detect seed deterioration. **Seed Science Research**, v.2, p.55-62, 2012.

KOKUBUN, M. Genetic and cultural improvement of soybean for waterlogged conditions in Asia. **Field Crops Research**, v.152, p.3-7, 2013.

KOMATSU, S.; SUGIMOTO, T.; HOSHINO, T.; NANJO, Y.; FURUKAWA, K. Identification of flooding stress responsible cascades in root and hypocotyl of soybean using proteome analysis. **Amino Acids**, v.38, p.729-738, 2010.

KRISHNAN, P.; JOSHI, D.K.; NAGARAJAN, S.; MOHARIR, A.V. Characterization of germination and non-viable soybean seeds by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. **Seed Science Research**, v.14, p.355-362, 2004.

KROCHKO, J.E.; ABRAMS, G.D.; LOEWEN, M.K.; ABRAMS, S.R.; CUTLER, A.J. (+) - Absciscic Acid 8'-Hydroxylase is a cytochrome P450 Monooxygenase. **Plant Physiology**, v.118, p.849-860, 1998.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n.3, p.1-11, 2001.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2009, 384 p.

LIU, P.P.; MONTGOMERY, T.A.; FAHLGREN, N.; KASSCHAU, K.D.; NONOGAKI, H.; CARRINGTON, J.C. Repression of *AUXIN RESPONSE FACTOR10* by microRNA 160 is critical for seed germination and post-germination stages. **The Plant Journal**, v.52, p.133-146, 2007.

LUZIA, D.M.M.; JORGE, N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Industrial Crops and Products**, v.42, p.231-235, 2013.

MAAS, P.; KAMER, H.M.D.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.D.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v.52, n.80, p.61-94, 2001.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. *Annonaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 27 Jan. 2016a

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. *Annonaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110243>>. Acesso em: 27 Jan. 2016b

MATSUMOTO, R.S.; RIBEIRO, J.P.N.; TAKAO, L.K.; LIMA, M.I.S. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.3, p.631-635, 2010.

MIRANSARI, M.; SMITH, D.L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v.99, p.110-121, 2014.

MIRO, B.; ISMAIL, A.M. Tolerance of anaerobic conditions caused by flooding during germination and early growth in rice (*Oryza sativa* L.). **Frontiers in Plant Science**, v.4, article 269, p.1-18, 2013.

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

MUNNÉ-BOSCH, S.; OÑATE, M.; OLIVEIRA, P.G.; GARCIA, Q.S. Changes in phytohormones and oxidative stress markers in buried seeds of *Vellozia alata*. **Flora**, v.206, p.704-711, 2011.

NAMBARA, E.; OKAMOTO, M.; TATEMATSU, K.; YANO, R.; SEO, M.; KAMIYA, Y. Absciscic acid and the control of seed dormancy and germination. **Seed Science Research**, v.20, p.55-67, 2010.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014

OLIVEIRA, M.C.; FERREIRA, G.; GUIMARÃES, V.F.; DIAS, G.B. Germinação de sementes de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *A.squamosa* L.) cv ‘Gefner’ submetidas a

tratamentos com ácido giberélico (GA₃) e ethephon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.2, p.544-554, 2010.

PATANÈ, C.; CAVALLARO, V.; AVOLA, G.; D'AGOSTA, G. Seed respiration of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] during germination as affected by temperature and osmoconditioning. **Seed Science Research**, v.16, p.251-260, 2006.

RAGASA, C.Y.; SORIANO, G.; TORRES, O.B.; DON, M.J.; SHEN, C.C. Acetogenins from *Annona muricata*. **Pharmacognosy Journal**, v.4, n.2, p.32-37, 2012.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.St.-Hil. **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien**, v.108 B, p.191-205, 2007.

RESENDE, M.L.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, p.123-130, 2003.

RIBEIRO, M.N.O.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; PIO, L.A.S.; HILHORST, H.W.M. *In vitro* seed germination and seedling development of *Annona crassiflora* Mart.. **Scientia Agricola**, v.66, p.410-413, 2009.

RIZZINI, C.T. Dormancy in seeds of *Annona crassiflora* Mart. **Journal of Experimental Botany**, v.24, n.78, p.117-123, 1973.

SANTOS, J.G.; ZUCOLOTO, M.; COELHO, R.I.; LOPES, J.C.; ALMEIDA, G.D. Germinação e crescimento de mudas de biribazeiro (*Rollinia mucosa* (Jack) Baill) no Brasil. **IDESIA**, v.27, n.2, p.55-59, 2009.

SCALOPPI JUNIOR, E.J.; MARTINS, A.B.G. Estaquia em anonas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, p.147-156, 2014.

SGUAREZI, C.N., BRACCINI, A.L., SCAPIM, C.A., BRACCINI, M.C.L.; DALPASQUALE, V.A. Avaliação de tratamentos pré-germinativos para melhorar o desempenho de sementes de café (*Coffea arabica* L.), I.Condicionamento osmótico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.152-161, 2001.

- SHARMA, A.D.; RATHORE, S.V.S.; SRINIVASAN, K.; TYAGI, R.K. Comparison of various seed priming methods for seed germination, seedling vigour and fruit yield in okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench.). **Scientia Horticulturae**, v.165, 75-81, 2014.
- SILVA, D.B.; SILVA, J.A.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. **Frutas do cerrado**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. 2001. 179p.
- SILVA, E.A.A.; MELO, D.L.B.; DAVIDE, A.C.; BODE, N.; ABREU, G.B.; FARIA, J.M.R.; HILHORST, H.W.M. Germination Ecophysiology of *Annona crassiflora* Seeds. **Annals of Botany**, v.99, p.823-830, 2007.
- SILVA, E.N.; FERREIRA-SILVA, S.L.; FONTENELEA, A.V.; RIBEIRO, R.V.; VIÉGASC, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**, v.167, p.1157-1164, 2010.
- SLIWINSKA, E.; BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D. Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.3587-3594, 2009.
- SMET, S. DE; DAMME, P. VAN; SCHELDEMAN, X.; ROMERO, J. Seed structure and germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Acta Horticulturae**, n.497, p.269-278, 1999.
- SOCOŁOWSKI, F.; CICERO, S.M. Use of growth regulators to overcome seed dormancy in *Xylopia aromatica* (Annonaceae). **Seed Science & Technology**, v.39, p.21-28, 2011.
- SORIANO, D.; OROZCO-SEGOVIA, A.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J.; KITAJIMA, K.; BUEN, A.G.; HUANTE, P. Seed reserve composition in 19 tree species of a tropical deciduous forest in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. **Annals of Botany**, v.107, p.939-951, 2011.
- SOUSA, S.A.; DANTAS, A.C.V.L.; PELACANI, C.R.; VIEIRA, E.L.; LEDO, C.A.S. Superação da dormência em sementes de pinha. **Caatinga**, v.21, n.4, p.118-121, 2008.
- SOUZA, M.O.; SOUZA, C.L.M.; PELACANI, C.R. Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas e crescimento inicial de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) em ambientes salinos. **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.1, p.105-112, 2011.

STENZEL, N.M.C.; MURATA, I.M.; NEVES, C.S.V.J. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.305-308, 2003.

TOKUNAGA, T.A. **A cultura da atemóia**. Campinas: CATI, 2000. 80 p.

TOUGOU, M.; HASHIGUCHI, A.; YUKAWA, K.; NANJO, Y.; HIRAGA, S.; NAKAMURA, T.; NISHIZAWA, K.; KOMATSU, S. Responses to flooding stress in soybean seedlings with the *alcohol dehydrogenase* transgene. **Plant Biotechnology**, v.29, p.301-305, 2012.

TULLIO, M.C.; ARRIGONI, O. The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. **Seed Science Research**, v.13, p.249-260, 2003.

VALENZUELA, J.R.C.; OSÓRIO, J.D.B. Efecto del ácido giberélico y el método de siembra en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de anona colorada (*Annona reticulata* L.). **Revista facultad Nacional de Agronomía**, v.51, n.2, p.235-244, 1998.

VARIER, A.; VARI, A.K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, v.99, n.4, p.450-456, 2010.

VIEIRA, M.H.P.; IRBER, M. de V. Emergência e taxa de germinação em *Annona coriácea*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo. **Resumos...** Nova Friburgo: Sociedade Botânica do Brasil, 1996.

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

YIN, G.; SUN, H.; XIN, X.; QIN, G.; LIANG, Z.; JING, X. Mitochondrial damage in the soybean seed axis during imbibition at chilling temperatures. **Plant Cell Physiology**, v.50, p.1305-1318, 2009.

ZABALZA, A.; van DONGEN, J.T.; FROELICH, A.; OLIVER, S.N.; FAIX, B.; GUPTA, K.J.; SCHMÄLZLIN, E.; IGAL, M.; ORCARAY, L.; ROYUELA, M.; GEIGENBERGER, P. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. **Plant Physiology**, v.149, p.1087-1098, 2009.