JULIANA IURA DE OLIVEIRA MELLO

Alterações bioquímicas durante o armazenamento e a germinação de sementes de *Caesalpinia echinata e Erythrina speciosa*, leguminosas nativas da Floresta Atlântica

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2013

JULIANA IURA DE OLIVEIRA MELLO

Alterações bioquímicas durante o armazenamento e a germinação de sementes de *Caesalpinia echinata e Erythrina speciosa*, leguminosas nativas da Floresta Atlântica

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. RITA DE CÁSSIA LEONE FIGUEIREDO RIBEIRO

CO-ORIENTADORA: DRA. MARILIA GASPAR

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Mello, Juliana Iura de Oliveira
M527a Alterações bioquímicas durante o armazenamento e a germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*, leguminosas nativas da Floresta Atlântica / Juliana Iura de Oliveira Mello -- São Paulo, 2013.
133 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2013
Bibliografia.

1. Carboidrato. 2. Proteínas. 3. Amido. I. Título

CDU: 547.454

Dedico

Ao meu pai, *Alberto de Oliveira Mello*, que não pode estar comigo até o fim do doutorado, mas, onde quer que esteja, espero tê-lo feito orgulhoso.

Agradeço

Ao Instituto de Botânica por me receber e ter proporcionado o encontro com tantos profissionais e pessoas especiais, que muito contribuíram para o meu aprendizado.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao Projeto Temático "Carboidratos como moduladores de processos ecofisiológicos e indicadores de estresses em plantas tropicais" - Processo 2005/04139-7, ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e à CAPES pela bolsa de doutorado sanduiche.

Aos funcionários e proprietários da Fazenda Atala, em Jaú, por permitirem que coletássemos sementes em suas dependências.

À minha orientadora e mãe científica, Dra Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro, pelos conselhos, puxões de orelha, palavras de incentivo e principalmente, por acreditar em mim.

À minha co-orientadora, Marilia Gaspar, por me ensinar e me motivar.

Ao ex-orientador, mas eterno Papuzko, Claudio Barbedo, pelas conversas, auxílios e inestimável amizade.

Ao Prof Henk Hilhorst por ter permitido que eu fizesse parte de seu grupo de pesquisa na *Wageningen University*.

Aos profissionais do grupo *Plant Physiology* da Universidade de Wageningen, em especial ao Wilco, Leo, Tania e Kerstin, por me ajudarem, me ensinarem e pela amizade.

Aos amigos brasileiros e de tantos outros cantos do mundo que fiz na Holanda, Manuela, Mina, Alvaro, Anibal, Saulo, Déborah, Claire, Paloma, Lilian, Fabio, Carlos, Davi, Robert, Carmen, Agustin, Marine, Cheng, Ton, entre tantos outros, por me receberem e se transformarem na minha família durante esses 5 meses longe de casa.

Aos inúmeros amigos do laboratório de Fisiologia. Não citarei nome por nome, para evitar o erro de esquecer alguém, mas tenham certeza que vocês fizeram esses longos anos mais agradáveis.

Aos amigos da Seção de Sementes, a eterna Família Index. Foi muito bom ter aprendido a fazer ciência com vocês.

Ao Pesquisador Dr Marco Aurélio Silva Tiné pela ajuda com as fotos de eletroforese e por sempre estar disposto a responder qualquer dúvida, mesmo que eu não sendo sua aluna.

Às alunas Glaucia Rodrigues de Oliveira e Aline Coelho pela ajuda com o processamento das amostras, pelas conversas, cafés e amizade.

À Pesquisadora Dra. Maria Angela Machado pela ajuda com a correção do inglês.

Às amigas e doutoras Amanda Asega (Instituto Butantã) e Aline Calavari (Universidade Federal de São Paulo) e Amanda Souza (Universidade de São Paulo) pelo auxílio nas análises do metabolismo de carboidratos.

Aos alunos da disciplina "Práticas em laboratório de bioquímica vegetal", pela perfeita execução dos últimos géis. Obrigada por deixa-los ensiná-los e pelos ótimos resultados.

Ao amigo e namorado, André Mathias, pelo seu amor, por ter me motivado, me ajudado a crescer e por compreender o quanto esse doutorado é importante para mim.

À minha família, agora um pouco menor, mas mais unida do que nunca. É graças a vocês que aqui estou. Obrigada, do fundo do coração, por tudo!

Sumário

Considerações iniciais 9
Espécies estudadas 11
Caesalpinia echinata 11
Erythrina speciosa 13
Objetivos 15
Objetivos Gerais 15
Referências bibliográficas 16
Capítulo I - Temperatura sub-zero viabiliza o armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* por períodos prolongados 20
Resumo 20
Abstract 21
Introdução 22
Material e métodos 23
Resultados e discussão 24
Referências bibliográficas 30
Capítulo II - Dinâmica dos compostos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* em duas fases de maturação armazenadas em temperatura sub-zero 32
Resumo 32
Abstract 33
Introdução 34
Material e Métodos 36
Extração e quantificação de carboidratos 37
Extração e quantificação de proteínas 38
Eletroforese de proteínas – SDS-PAGE 38
Delineamento experimental e análise estatística 39
Resultados 40
Discussão 58
Referências bibliográficas 62
Capítulo III - Ácido abscísico em sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa* submetidas à dessecação e armazenamento 66
Resumo 66

Abstract 67
Introdução 68
Material e Métodos 70
Erythrina speciosa 70
Caesalpinia echinata 71
Germinação e teor de água 71
Extração de ABA 72
Quantificação de ABA 73
Delineamento experimental e análise estatística 73
Resultados 74
Erythrina speciosa 74
Dessecação de sementes imaturas de *Erythrina speciosa* 76
Estresse osmótico em sementes de *Erythrina speciosa* 78
Ácido abscísico 80
Caesalpinia echinata 81
Discussão 84
Referências bibliográficas 87
Capítulo IV - Mobilização de reservas durante a germinação de sementes de duas espécies de Leguminosae 90
Resumo 90
Abstract 91
Introdução 92
Material e Métodos 93
Extração e quantificação de carboidratos 93
Extração e quantificação de proteínas 94
Eletroforese de proteínas – SDS-PAGE 95
Delineamento experimental e análise estatística 96
Resultados 96
Discussão 111
Referências bibliográficas 116
Considerações finais 120
Resumo geral 122
Summary 124
Anexos 126

Considerações iniciais

As sementes representam, para a maioria das espécies, não apenas a estrutura básica de propagação, mas também um reservatório genético que pode ser preservado de maneira segura, econômica e por longos períodos. Sendo indivíduos independentes da planta mãe, as sementes podem se desenvolver com suas próprias reservas nutritivas, armazenadas principalmente na forma de carboidratos, lipídios e proteínas. Tais reservas são consumidas para manutenção e desenvolvimento pós-germinativo do embrião até a formação de uma plântula capacitada a se manter de forma autotrófica. Carboidratos e lipídios são utilizados como fonte de energia e carbono, enquanto as proteínas são as principais fontes de nitrogênio e enxofre, indispensáveis para a síntese de novas proteínas, ácidos nucléicos e compostos secundários para o desenvolvimento das plântulas.

A primeira fase do desenvolvimento das sementes é marcada pelo crescimento inicial, com intensa divisão celular e aumento da massa fresca. Nesta fase, as sementes são constituídas principalmente de água e não tem a capacidade de tolerar a dessecação.

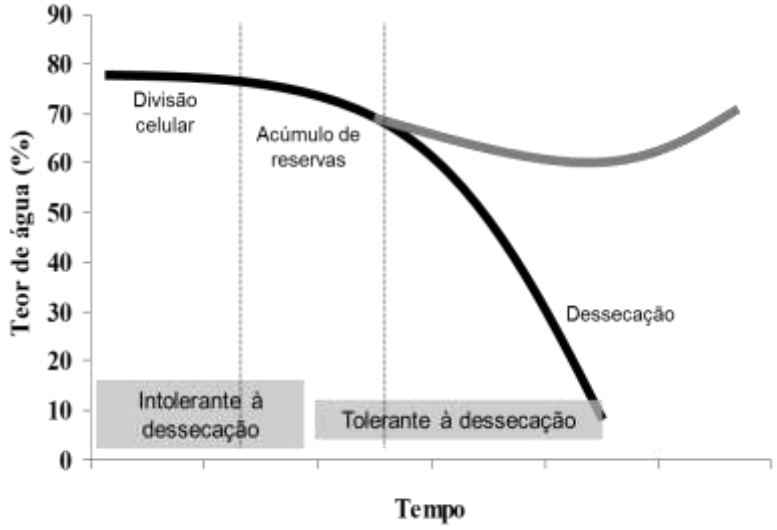


Figura 1. Esquema geral trifásico dos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento de sementes (linha preta – sementes ortodoxas, linha cinza – sementes recalcitrantes (Adaptado de De Castro *et al.* 2004).

Na segunda fase ocorre a expansão celular, com acúmulo de reservas, principalmente proteínas e carboidratos, ocasionando aumento substancial da massa seca e redução do teor de água. A partir desta fase, as sementes ortodoxas adquirem a

capacidade de tolerar a secagem. Nessa condição, essas sementes são dispersas da planta mãe e ao encontrarem condições adequadas para rehidratação, reiniciam o desenvolvimento até a formação de novas plantas (Buckeridge *et al.* 2004).

Por outro lado, nas sementes denominadas recalcitrantes não há a etapa de dessecação ao final da maturação, sendo mantidas com elevado teor de água até a dispersão. Algumas destas sementes podem reiniciar o desenvolvimento quando ainda ligadas à planta mãe, processo conhecido por viviparidade, como observado em sementes de várias espécies, incluindo-se *Inga vera* (Andreo *et al*. 2006).

O sucesso do armazenamento de sementes está relacionado ao baixo teor de água destas e à presença de compostos que minimizam, retardam ou protegem contra danos causados pelo envelhecimento natural em condições ambientais. A redução do teor de água e da temperatura do ambiente são técnicas comumente empregadas no armazenamento de sementes ortodoxas, uma vez que reduzem o metabolismo e consequentemente diminuem a velocidade de degradação dos compostos de reserva. Dentre os compostos protetores, destacam-se os açúcares da série da rafinose e os ciclitóis, que além de protegerem as sementes em situações de estresse, como ultra-secagem e congelamento, impedem a cristalização da sacarose, o que resultaria na desestruturação das membranas e consequentemente na inviabilidade das sementes (Caffrey *et al.* 1988, Peterbauer & Richter 2001).

Sabe-se que temperaturas baixas estimulam o declínio do conteúdo de amido e o aumento de carboidratos solúveis em plantas e sementes e que este aumento está altamente correlacionado à tolerância ao frio em muitas espécies. Contudo, a percepção e transdução de sinais, reprogramação da expressão gênica e do metabolismo, reestruturação de estruturas celulares, alterando o crescimento e o desenvolvimento em resposta a temperaturas baixas são processos muito complexos, regulados por múltiplos genes e ainda pouco conhecidos (Kaplan *et al.* 2006).

Além dos carboidratos, a presença de reservas lipídicas nos tecidos das sementes também parece estar relacionada à sobrevivência destas após exposição a temperaturas muito baixas (Dussert *et al*. 2001). Sementes do gênero *Inga* apresentam baixo conteúdo de lipídios e são intolerantes à dessecação e ao congelamento (Pritchard *et al*. 1995, Mello *et al*. 2010). Por outro lado sementes ortodoxas de várias espécies tolerantes à dessecação e ao congelamento, como soja, *Dalbergia miscolobium* e *Caesalpinia echinata* (Hume & Jackson 1981, Vertucci 1989, Silva *et al.* 1998, Mello *et al*. 2010) dentre outras, apresentam de 20-30% de lipídios, altos teores de ácido

linoléico (C18:2) e proteínas de reserva. A dinâmica dos ácidos graxos, em função da retirada de água ou do armazenamento sob baixas temperaturas não está elucidada, no entanto, sabe-se que maior quantidade de ácido linolênico (Omega 3) é encontrada em sementes intolerantes à dessecação (Liu *et al*. 2006).

Além dos carboidratos e lipídios, algumas classes de proteínas estão fortemente relacionadas com o processo de tolerância à dessecação em sementes, como as *Late Embriogenesis Abundant Proteins* (LEA) e as *Heat Shock Proteins* (HSP), entre outras (Chatelain *et al.* 2012 e referências nela contidas). Em relação à tolerância ao frio, acredita-se que mudanças quantitativas e qualitativas nas proteínas poderiam estar associadas com a diferença à tolerância a baixas temperaturas, como ocorre com as dehidrinas, que são induzidas pela desidratação celular (Arora & Wisniewski 1994, Harris *et al*. 2006, Renaut *et al*. 2005).

Espécies estudadas

Caesalpinia echinata

Caesalpinia echinata Lam. (Caesalpinioideae), popularmente conhecida por pau-brasil (Figura 2), é uma espécie tropical endêmica do Brasil, encontrada na Mata Atlântica, do Rio Grande do Norte ao Rio de Janeiro. Entre os séculos XVI e XIX, sua árvore foi alvo de exploração devido à presença de um poderoso corante de cor avermelhada, utilizado no tingimento de tecidos e que indicava elevado *status* social daqueles que o utilizavam, uma vez que tal corante apresentava elevado valor comercial (Rocha 2008).

Desde o séc XVII, a madeira de pau-brasil é utilizada na fabricação de arcos de instrumentos musicais, como os de violino, por apresentar características físicas, mecânicas e acústicas excepcionais (Alves *et al*. 2008, Alves *et al*. 2008b, Longui *et al.* 2010, Longui *et al*. 2012).

Além de sua importância histórica/comercial, as sementes de pau-brasil vêm sendo estudadas para fins medicinais, mostrando-se fonte de produtos de ação pró-inflamatória em ratos (Alencar *et al.* 2002) e auxiliando na redução de edemas em coelhos (Cruz-Silva *et al.* 2004).

Sementes de pau-brasil são consideradas ortodoxas, mas perdem a capacidade germinativa em um mês quando armazenadas em temperatura ambiente. Após dessecação e armazenamento a 8 °C, essas sementes mantêm a viabilidade por até 18 meses (Barbedo *et al.* 2002). Sementes maduras de pau-brasil também são tolerantes ao congelamento desde que armazenadas com baixo teor de água, podendo se manter viáveis por até 24 meses (Hellmann *et al*. 2006). Essas sementes contêm mais de 40% de amido, 10-15% de açúcares, predominantemente sacarose e traços de rafinose e estaquiose e 17% de lipídios (Garcia *et al*. 2006, Mello *et al*. 2010). Os ciclitóis galactopinitol e ciceritol também estão presentes nessas sementes, sendo acumulados na fase tardia da maturação (Borges *et al.* 2006). Recentemente, proteases com pesos moleculares variarando de 19 a 110 kDa foram extraídas de sementes de *C. echinata* e analisadas por Praxedes-Garcia *et al.* (2012), sendo purificada pela primeira vez uma serina protease na espécie (CeSP), possivelmente envolvida no processo de mobilização de proteínas de reserva.

Leduc *et al.* (2012) demonstraram que sementes imaturas de pau-brasil (45 DAA), que são intolerantes a dessecação, podem ser desidratadas até baixos níveis de água quando previamente tratadas com solução de polietilenoglicol. Nessas condições, foram observados aumentos significativos de ciclitóis e sacarose nos eixos embrionários e mantidas altas porcentagens de germinação. Esses resultados sugerem a possibilidade de ampliação do aproveitamento de uma colheita contendo sementes com diferentes idades fisiológicas, o que favorece a conservação da espécie.

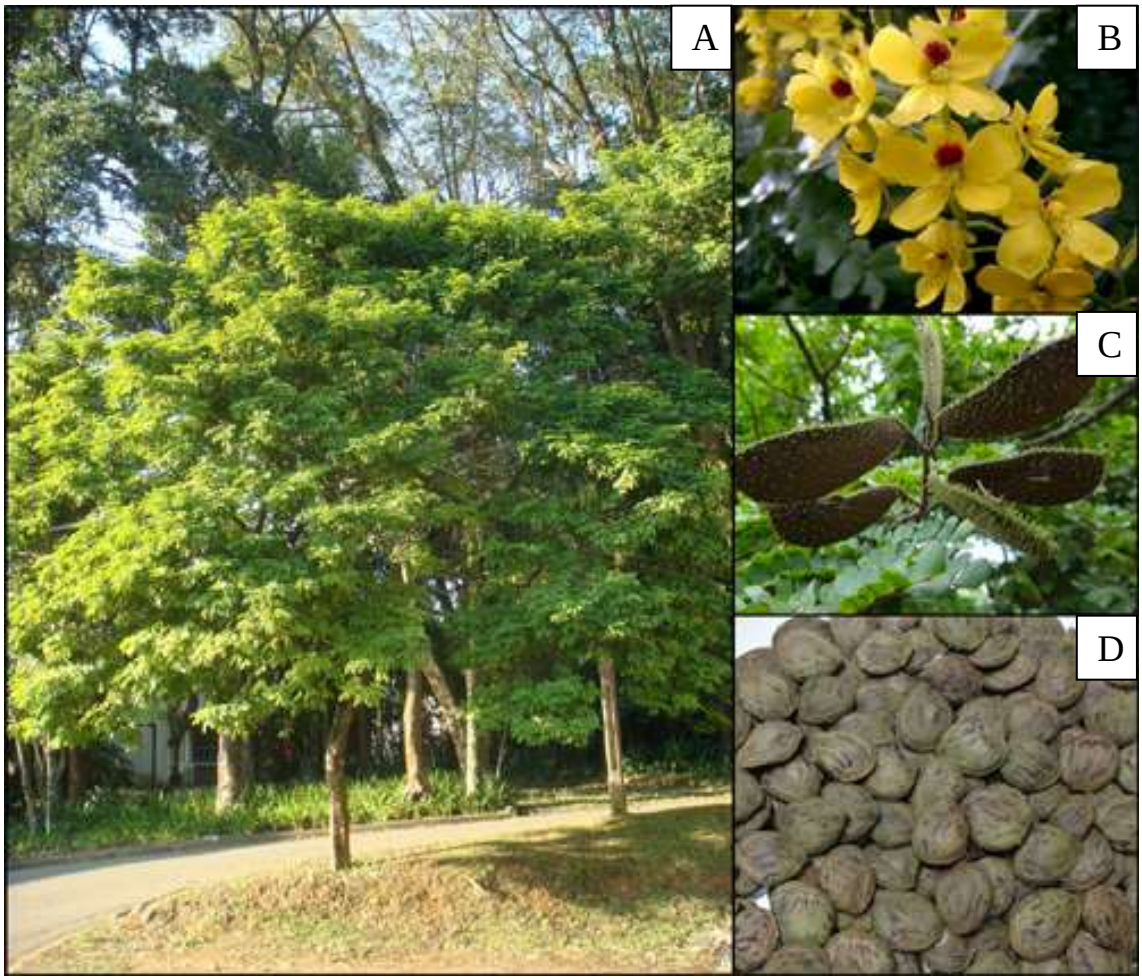


Figura 2. Aspectos gerais de *Caesalpinia echinata*. A – indivíduo adulto, B – Inflorescência, C – Frutos maduros, D – Sementes maduras.

Erythrina speciosa

Erythrina speciosa Andrews também pertence à família Leguminosae (Faboideae) e ocorre na floresta pluvial atlântica, principalmente do Espírito Santo até Santa Catarina. A árvore, conhecida popularmente como mulungu-do-litoral e eritrina-candelabro (Figura 3), é bastante ornamental quando florida, sendo comumente usada em paisagismo. Muitos exemplares da espécie podem ser observados no *Jardim de Lineu*, no Jardim Botânico de São Paulo.

As flores de *Erythrina* são vistosas, de cor vermelha ou alaranjadas (Figura 3 A,B), o que as torna alvo da polinização por pássaros, mas não possuem odor (Raven 1974 *apud* Etcheverry 2005). As espécies do gênero *Erythrina* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades, tais como asma, dor estomacal e disenteria, na forma de preparados de folhas, cascas e raízes (Faria *et al.*

2007). Suas sementes apresentam impermeabilidade à água, característica bastante comum entre as espécies da subfamília Faboideae (Perez 2004) e são classificadas como ortodoxas, podendo ser armazenadas por longos períodos mesmo em temperatura ambiente.

Figura 3. Aspectos gerais de *Erythrina speciosa*. A – indivíduo adulto, B – Inflorescência, C – Frutos com diferentes idades, D – Sementes maduras.

Mello *et al.* (2010) analisaram a composição das sementes de eritrina e averiguaram que estas apresentam 14% de carboidratos solúveis, destacando-se a sacarose (30%) e OSR (65%) e apenas traços de amido. Os lipídios representam cerca de 23% da massa seca das sementes, dos quais 70% são ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido oléico. Também foi constatada a presença de lecitinas em sementes da espécie (Konozy *et al.* 2003).

Objetivos

Sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa* são tolerantes à dessecação e ao congelamento, contudo a longevidade das sementes de eritrina é maior, sendo possível armazená-las em temperatura ambiente por vários anos, enquanto as de pau-brasil perdem a viabilidade em um mês nessas condições. O presente estudo teve por objetivo analisar a dinâmica dos compostos de reserva das sementes das duas espécies na etapa final do desenvolvimento, quando ambas atingem massa seca máxima e após a dispersão, a fim de avaliar se as alterações que ocorrem nesses compostos poderiam estar relacionadas com a armazenabilidade dessas sementes em condições ambientais.

Como as sementes ortodoxas perdem a capacidade de tolerar a dessecação quando o processo germinativo é iniciado, este estudo objetivou, ainda, analisar as modificações nos compostos de reserva durante a germinação, buscando relacionar tais alterações com os processos de aquisição ou perda de tolerância à dessecação e armazenabilidade.

Objetivos Gerais

- ✓ Avaliar a viabilidade de sementes de pau-brasil durante o armazenamento em longo prazo (cinco anos) sob temperaturas de 2, 8 e -18°C.
- ✓ Analisar a composição e as alterações nos principais compostos de reserva de sementes imaturas e maduras de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa* submetidas à secagem artificial e ao armazenamento em temperatura sub-zero e/ou ambiente.
- ✓ Analisar e comparar as alterações bioquímicas em sementes germinantes das duas espécies, com vistas a compreender as alterações nos compostos de reserva durante a perda de tolerância à dessecação.

Os resultados obtidos foram agrupados em quatro capítulos, organizados na forma de artigos científicos, apresentados separadamente, a seguir.

Referências bibliográficas

Alencar, V. B. M., Melo, S. C., Albuquerque, K. F., Figueiredo, I. S. T., Tupinambá, D. D., Freitas, B. T., Alencar, N. M. N., Sampaio, A. H., Ribeiro, R. A. & Cavada, B. S. 2002. Pro-inflammatory effect of galactose binding lectin isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. Seeds. *In:* T.C. Boo-Hansen (ed.). Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry 16. Lemchesvej (DK): Textop Publisher.

Alves, E. S., Angyalossy V., Longui, E. L., Lombardi, D. R., Amano, E. & Vargas, A. 2008. O arco: arte e ciência. *In*: R. C. L. Figueiredo-Ribeiro R. C. L., C. J. Barbedo, D. S. Alves, M. Domingos & M. R. Braga (eds). Pau-brasil: da semente à madeira. Conhecer para conservar. São Paulo: Instituto de Botânica/SMA, pp. 169-183.

Alves, E. S., Longui, E. L. & Amano, E. 2008b. Pernambuco Wood (*Caesalpinia echinata*) used in the manufacture of bows for string instruments. IAWA Journal 29: 323-335.

Andreo, Y., Nakagawa, J. & Barbedo, C. J. 2006. Mobilização de agua e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Pennington. Revista Brasileira de Botânica 29: 309-318.

Arora, R. & Wisniewski, M. E. 1994. Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch.). II. A 40-kilodalton bark protein in cold-acclimated tissues of peach is heat stable and related to the dehydrin family of proteins. Plant Physiology 105: 95-101.

Barbedo, C. J., Bilia, D. A. C. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (paubrasil). Revista Brasileira de Botânica 25: 431-439.

Borges, I. F., Barbedo, C. J., Richter, A. A. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2006. Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae). Brazilian Journal of Plant Physiology 18: 475-482.

Buckeridge, M. D., Aidar, M. P. M., Santos, H. P. & Tiné, M. A. S. 2004. Acúmulo de reservas. *In*: A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed, pp. 31-50.

Caffrey, M., Fonseca, V. & Leopold, A.C. 1988. Lipid-sugar interactions. Plant Physiology 86: 754-758.

Chatelain, E., Hundertmark, M., Leprince, O., Le Gall, S., Satour, P., Deligny-Penninck, S., Rogniaus, H. & Buitink, J. 2012. Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. Plant, Cell & Environment 35: 1440-1455.

Cruz-Silva, I., Gozzo, A. J. Nunes, V. A., Neuhof, C., Neuhof, H. & Araújo, M. S. 2004. Effect of inhibitors from *Caesalpinia echinata* on pulmonary edema. Proc. Braz. Soc. Biochem. Mol. Biol. 33: 1.

De Castro, R. D. & Hilhorst, H. W. M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. 2004. *In*: A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed, pp. 149-162.

Dussert, S., Chabrillange, N., Rocquelin, G., Engelmann, F., Lopez, M. & Hamonn, S. 2001. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature expouse in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. Physiologia Plantarum 112: 495-504.

Etcheverry, A.V. & Alemán, C.E.T. 2005. Reproductive Biology of *Erythrina falcata* (Fabaceae: Papilionoideae). Biotropica 37: 54-63.

Faria, T. J., Cafêu, M. C., Akiyoshi, G., Ferreira, D. T., Galão, O. F. & Andrei, C. C. 2007. Alcalóides de flores e folhas de *Erythrina speciosa*. Andrews. Química Nova 30: 525-527.

Garcia, I. S., Souza, A., Barbedo, C. J., Dietrich, S. M. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from Brazilian Atlantic Forest. Brazilian Journal of Biology 66: 739-745.

Harris, G. C, Valerie, A., Cahn, M., Nevidomskyte, D. & Königer, M. 2006. Seasonal changes in photosynthesis, protein composition and mineral content in Rhododendron leaves. Plant Science 170: 314-325.

Hellmann, M. E., Mello, J. I. O., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. & Barbedo C. J. 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água. Revista Brasileira de Botânica 29(1): 93-101.

Hume, D. J. & Jackson, A. K. H. 1981. Frost tolerance in soybean. Crop Science 21: 689-692.

Kaplan, F., Sung, D. Y. & Guy, C. L. 2006. Roles of *β*-amylase and starch breakdownn during temperatures stress. Physiologia Plantatum 126: 120-128.

Konozy, E. H. E., Bernardes, E. S., Rosa, C., Faca, V., Greene, l. J. & Ward, R. J. 2003. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. Archives of Biochemistry and Biophysica 410: 222-229.

Leduc, S. N. M., Silva, J. P. N., Gaspar, M., Barbedo, C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2012. Non-structural carbohydrates of immature seeds of *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) are involved in the induction of desiccation tolerance. Australian Journal of Botany 60: 42-48.

Liu, M.-S., Chang, C.-Y. & Lin, T.-P. 2006. Comparison of phospholipids and their fatty acids in recalcitrant and orthodox seeds. Seed Science & Technology 34: 443-452.

Longui, E. L., Brémaud, I, Silva Júnior, F. G., Lombardi, D. R. & Alves, E. S. 2012. Relationship among extractives, lignin and holocellulose contents with performance index of seven Wood species used fow bows of string instruments. IAWA Journal 33: 141-149.

Longui, E. L., Lombardi, D. R. & Alves, E. S. 2010. Potential Brazilian Wood species for bows of string instruments. Holzforshung 64: 511-520.

Mello, J. I. O., Barbedo, C. J., Salatino, A. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2010. Reserve carbohydrates and lipids from seeds of four tropical tree species with different sensivity to desiccation. Brazilian Archives of Biology and Technology 53: 889-899.

Perez, S. C. J. G. A. 2004. Dormência embrionária. *In*: A.G. Ferreira & Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre Artmed, pp. 125-135.

Peterbauer, T. & Richter, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. Seed Science Research 11: 185-197.

Praxedes-Garcia, P., Cruz-Silva, I., Gozzo, A. J., Nunes, V. A., Torquato, R. J., Tanaka, A. S., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Gonzalez, Y. G. & Araújo, M. S. 2012. Biochemical aspects of a serine protease from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) seeds: a potential tool to access the mobilization of seed storage

proteins. The Scientific World Journal Volume 2012, Article ID 562715, 8 pages-doi: 10.1100/2012/562715).

Pritchard, H. W., Haye, A. J., Wright, W. J. & Steadman, K. J. 1995. A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. Seed Science and Technology 23: 85-100.

Raven, H. R., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. 2001. Biologia vegetal, p. 906.

Renaut, J., Hoffmann, L. & Hausman, J.-F. 2005. Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing in poplar plantlets. Physiologia Plantarum 125: 82-94.

Rocha, Y. T. 2008. Brasil, europeus e pau-brasil. *In*: R. C. L. Figueiredo-Ribeiro R. C. L., C. J. Barbedo, D. S. Alves, M. Domingos & M. R. Braga (eds). Pau-brasil: da semente à madeira. Conhecer para conservar. São Paulo: Instituto de Botânica/SMA, pp. 9-32.

Silva, T. R. G., Cortelazzo, A. L. & Dietrich, S. M.C. 1998. Variations in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 10: 119-124.

Vertucci, C. W. 1989. Relationship between thermal transitions and freezing injury in pea and soybean seeds. Plant Physiology 90: 1121-1128.

Capítulo I - Temperatura sub-zero viabiliza o armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* por períodos prolongados

Resumo

Sementes de pau-brasil geralmente têm sua germinação rapidamente reduzida quando armazenadas em condições naturais. As temperaturas baixas, principalmente abaixo de zero, podem estender essa viabilidade por até dois anos. No entanto, não há informações sobre o comportamento germinativo das sementes submetidas a períodos mais longos de armazenamento, visando à formação de banco de germoplasma. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de sementes de pau-brasil durante o armazenamento por cinco anos em câmaras com temperaturas de 2, 8 ou -18°C. Antes do armazenamento, as sementes foram submetidas à secagem artificial (50°C) até atingirem 10% de água. A germinação e o desenvolvimento de plântulas normais de sementes mantidas a baixas temperaturas não foram diferentes dos demais tratamentos durante o primeiro ano de armazenagem. No entanto, após 24 meses, apenas sementes armazenadas a -18°C mantiveram a maior percentagem de germinação. Sementes armazenadas por 5 anos a -18°C apresentaram valores elevados de germinação e desenvolvimento das plântulas, porém com indícios de início de deterioração. O armazenamento em temperaturas abaixo de zero pode ser uma ferramenta importante para manutenção de bancos de sementes de *Caesalpinia echinata*, contribuindo para a conservação e preservação da biodiversidade vegetal, e por esta razão novos trabalhos devem ser conduzidos.

Abstract

Seeds of Brazilwood usually have their germinability quickly reduced if stored under natural conditions. Low temperatures, mainly sub-zero, can extend this viability until at least two years. However, there is no information about the germination behaviour of these seeds for longer periods, aiming at the germoplasm bank formation. The aim of this work was to evaluate the viability of Brazil wood seeds during long term storage at 2, 8 and -18°C. Before storage, seeds were subjected to artificial drying (50 °C) until the moisture content reached 10%. The germination and the normal seedling development of seeds maintained at low temperatures did not differ from other treatment during the first year of storage. However, after 24 months only seeds stored at -18 °C kept high germination percentage. Seeds stored for 5 years at -18 °C showed high values of germination and normal seedling development; these seeds started to deteriorate. Storage at sub-zero temperatures could be an important way to maintain *Caesalpinia echinata* seed banks, contributing to the conservation and the preservation of plant biodiversity, and for these reasons new works should be developed.

Introdução

Caesalpinia echinata Lam., o pau-brasil, foi incluída na lista do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) de espécies em risco de extinção no ano de 1992 e permaneceu nesta após, ao menos, uma década e meia (Pilatti *et al.* 2011). Sua madeira, antes explorada para a obtenção de corante avermelhado, hoje é utilizada para a fabricação de arcos musicais, uma vez que esta apresenta qualidades excepcionais (Franco & Yojo 2008), sendo que sua alta demanda internacional inclui o comércio ilegal (Abensperg-Traun 2009). Este foi um dos motivos para inclusão, pelo IBAMA, de *C. echinata* entre as espécies de plantas lenhosas importantes economicamente à beira da extinção (Pilatti *et al.* 2011). Devido a sua importância histórica e ecológica, diversas ações foram tomadas na tentativa de preservar e conservar a espécie, como a formação de bosques e arboretos da espécie em diversas regiões do país (Rocha 2010) e a criação de leis sobre a comercialização mundial da espécie (Lamarca & Barbedo 2011), mas a conservação *ex situ*, por meio de bancos de germoplasma, ainda continua inviável.

A área de ocorrência natural do pau-brasil estende-se do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Norte (Rocha 2010), estando limitado a um pequeno número de indivíduos. No entanto, São Paulo, que não é área de ocorrência natural da espécie, é o Estado brasileiro que concentra o maior número de unidades de conservação da espécie símbolo do país, o que reforça o fato de que a preservação *ex situ* é de extrema importância. Dentre as formas de conservação *ex situ*, a formação de bancos de sementes deveria estar entre as principais por representar, para a maioria das espécies, não apenas a estrutura básica de propagação, mas também um reservatório genético que pode ser preservado de maneira segura, econômica e por longos períodos. Contudo, técnicas convencionais de armazenamento, que incluem secagem e armazenamento das sementes sob baixas temperaturas a fim de reduzir o metabolismo destas, podem não evitar a deterioração das sementes, possivelmente devido a processos oxidativos, incluindo-se a própria respiração e a ação de radicais livres (Lamarca & Barbedo 2012).

As sementes de pau-brasil, quando armazenadas em temperatura ambiente, perdem a viabilidade em um mês (Barbedo *et al.* 2002), mas podem ter sua viabilidade prolongada se submetidas à secagem e armazenadas sob baixas temperaturas. Nessas condições Hellmann *et al.* (2006) conseguiram mantê-las viáveis por dois anos, com

alta porcentagem de plântulas normais. Esse mesmo período foi o máximo descrito por Zanotti *et al.* (2012) para condições de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C). No entanto, esse período ainda é insuficiente para o efetivo sucesso de sua conservação em bancos de germoplasmas. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a manutenção da viabilidade das sementes de pau-brasil após o armazenamento em longo prazo (até 5 anos) sob condições de congelamento.

Material e métodos

As sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) foram coletadas em 2002 de aproximadamente 20 árvores em bosque homogêneo implantado na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, Município de Mogi-Guaçu, SP (22º 15-16' S e 47º 8-12' W).

As sementes obtidas foram inicialmente avaliadas quanto ao teor de água e à germinação. O teor de água foi avaliado pelo método da estufa a 103±2 ºC/ 17±1 horas (ISTA 1996), com quatro repetições de três sementes cada. O teste de germinação foi realizado em germinadores com circulação interna de água, regulados para 25 ºC, com as sementes colocadas em rolos de papel (Mello & Barbedo 2007), com quatro repetições de dez sementes cada. Neste teste avaliaram-se, a cada três dias, as sementes germinadas (protrusão da raiz primária de, no mínimo, 2 cm) e o desenvolvimento de plântulas normais (Barbedo *et al.* 2002).

Após caracterização inicial, as sementes foram submetidas à secagem controlada em estufa a 50 °C até terem seu teor de água reduzido de 20% (inicial) para, aproximadamente, 10%, baseando-se em informações de Barbedo *et al.* (2002). A seguir, foram armazenadas em sacos de papel permeável, em quatro câmaras com temperaturas reguladas para 7 ± 3 ºC (UR de 45 ± 7%), 2 ± 2 °C (UR de 29 ± 2%) e –18 ± 5 ºC (UR de 84 ± 10%). Uma amostra controle foi mantida em temperatura ambiente de laboratório (22 ± 7 °C, UR de 80 ± 15%). A viabilidade das sementes armazenadas nas diferentes temperaturas foi avaliada após seis meses, um, dois, três, quatro e cinco anos através de testes de germinação, conforme descrito previamente. Foi averiguado, também, o teor de água das sementes em cada tratamento.

As médias obtidas foram analisadas estatisticamente pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey (5%).

Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 7 (temperatura de armazenamento x período de armazenamento) e, quando necessário, os dados foram transformados para arc sen $(\%)^{-0,5}$ (Gomes 1982).

Resultados e discussão

As sementes mantidas a 22°C, que apresentavam inicialmente cerca de 80% de germinação, já estavam mortas na primeira avaliação realizada aos seis meses de armazenamento, corroborando informações anteriores sobre a curta armazenabilidade das sementes de *C. echinata* sob temperaturas usuais em laboratórios de pesquisa (Barbedo *et al.* 2002, Lamarca & Barbedo 2012).

O teor de água das sementes não se alterou significativamente, dentro de cada temperatura, após os três primeiros anos. As temperaturas positivas (8 e 2 °C) propiciaram grande redução do teor de água já nos primeiros seis meses de armazenamento das sementes (Tabela 1). Contudo, as sementes mantiveram o mesmo teor de água após esse período. Já o armazenamento sob temperatura de congelamento manteve as sementes com teor de água mais elevado, mas que também manteve-se praticamente constante após os seis primeiros meses de armazenamento até o final do período experimental.

Tabela 1. Variações no teor de água (%) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. armazenadas em diferentes temperaturas.

Temperatura de armazenamento	**Período de armazenamento (meses)**			
(°C)	**6**	**12**	**24**	**36**
+2°C	6,2 bB	6,0 bB	7,0 bA	5,1 bC
+8°C	6,5 bA	6,2 bA	5,5 cB	5,1 bB
-18°C	10,9 aAB	11,2 aA	9,5 aC	10,6 aB
coef. var. (%)	2,7			

Médias seguidas pela mesma letra (Letras minúsculas comparam dentro das colunas, maiúsculas comparam dentro das linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Embora as sementes acondicionadas a +8°C e a +2°C tenham apresentado grande redução no teor de água, essas sementes mantiveram-se viáveis durante os 12

primeiros meses e, até os primeiros seis meses, não apresentaram diferença significativa na porcentagem de germinação em comparação com as sementes mantidas congeladas e que não perderam água durante o armazenamento (Figura 1). Diferenças significativas entre os valores de germinação das sementes armazenadas sob temperaturas positivas só foram observadas a partir dos 12 meses e mantiveram-se até o último período, aos 60 meses de armazenamento. Nas sementes armazenadas a -18°C aparentemente a perda de viabilidade se iniciou somente a partir de 60 meses.

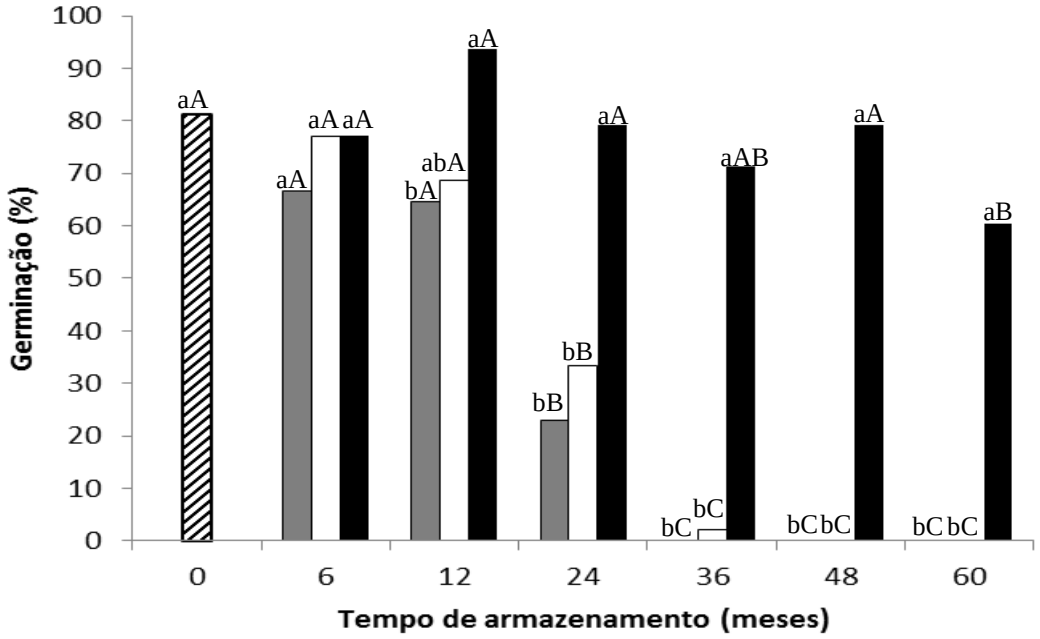


Figura 1. Germinação (%) de sementes de *Caesalpinia echinata* no tempo zero (barra listrada) e após diferentes períodos de armazenamento a +8°C (barra cinza), +2°C (barra branca) e -18°C (barra preta). Colunas com mesma letra no topo (minúsculas para comparação entre temperaturas, maiúsculas entre períodos de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Os resultados de germinação nos primeiros 24 meses de armazenamento são semelhantes aos obtidos por Barbedo *et al.* (2002), Hellmann *et al.* (2006) e Zanotti *et al.* (2012). Contudo, esses autores não avaliaram períodos maiores de armazenamento que, conforme verificado no presente trabalho, demonstram que temperaturas positivas de armazenamento promovem a completa perda da viabilidade das sementes de *C. echinata* já aos três anos, inviabilizando qualquer intuito de conservação de germoplasma dessa espécie em temperaturas que não sejam negativas. Reforça-se,

portanto, a idéia de que temperaturas negativas são necessárias para reduzir reações oxidativas que conduzem à rápida deterioração das sementes de *C. echinata,* conforme descrito por Lamarca & Barbedo (2012).

O resultado da germinção e do desenvolvimento de plântulas normais é um indicativo da manutenção do vigor das sementes armazenadas em diferentes temperaturas (Figuras 1 e 2). Contudo, por esses resultados verificou-se que o prejuízo às sementes armazenadas sob temperaturas positivas iniciou-se já aos 12 meses, ou seja, seis meses antes do observado analisando-se apenas a germinação. Também foi possível verificar que, embora as sementes armazenadas a -18°C tenham reduzido a capacidade germinativa somente após cinco anos de armazenamento, a redução da porcentagem de plântulas normais indica que sua deterioração já havia se iniciado aos 24 meses. Embora a porcentagem de sementes que produziram plântulas normais tenha sido elevada durante os 60 meses de armazenamento a -18°C, a redução observada dos 12 aos 24 meses sugere algum processo de deterioração nessas sementes. Portanto, mesmo ampliando-se substancialmente a capacidade de armazenamento das sementes de *C. echinata* com temperatura sub-zero, há evidências de que o processo de rápida

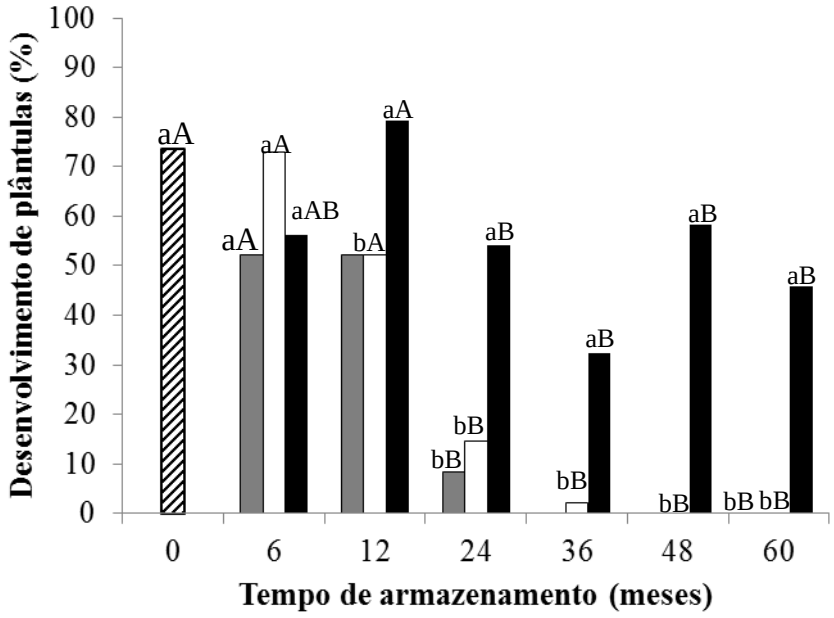


Figura 2. Desenvolvimento de plântulas normais (%) a partir de sementes de *Caesalpinia echinata* no tempo zero (barra listrada) e após diferentes períodos de armazenamento a +8°C (barra cinza), +2°C (barra branca) e -18°C (barra preta). Colunas com mesma letra no topo (minúsculas para comparação entre temperaturas, maiúsculas entre períodos de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

deterioração observado em trabalhos anteriores não tenha ainda sido satisfatoriamente controlado.

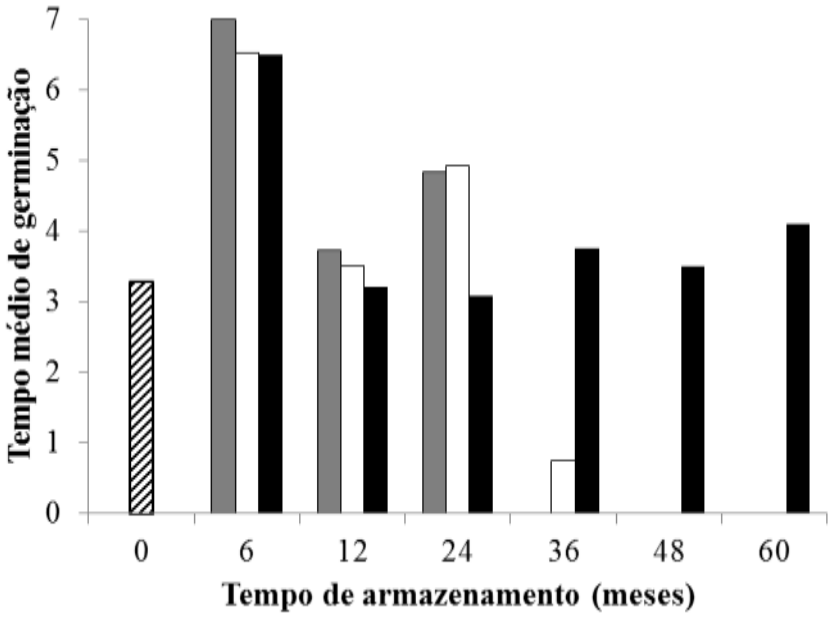


Figura 3. Tempo médio de germinação (dias) de sementes de *Caesalpinia echinata* no tempo zero (barra listrada) e após diferentes períodos de armazenamento a +8°C (barra cinza), +2°C (barra branca) e -18°C (barra preta).

Apesar de levar em conta somente o número de sementes germinadas, o tempo médio de germinação também constitui um teste interessante para análise de vigor (Labouriau 1983). O resultado deste teste foi indicativo do grau de deterioração das sementes armazenadas nas diferentes temperaturas, o que *a priori* corroborou os resultados de plântulas normais, demonstrando que o vigor foi efetivamente reduzido em todas as temperaturas, principalmente de forma mais intensa nas temperaturas positivas (Figura 3). Verifica-se uma queda inicial no tempo médio de germinação, até os seis primeiros meses, para todas as temperaturas de armazenamento. Tal fato não significa, contudo, que houve aumento no vigor das sementes, mas que as sementes não armazenadas poderiam apresentar algum grau de dormência ou, que necessitavam um período de pós-colheita para a completa maturação.

O tempo médio para germinação das sementes armazenadas sob temperaturas positivas aumentou dos 6 aos 12 meses, demonstrando o início da deterioração. Aos 24

meses, o tempo médio de germinação dessas sementes foi zero (ou muito próximo de zero) não por aumento no vigor, mas pela simples falta de suficiente porcentagem de germinação (Figura 1). Já as sementes armazenadas a -18°C mantiveram o tempo médio para germinação dos seis aos 48 meses, demonstrando não ser este um teste suficientemente sensível para diagnosticar a queda no vigor das sementes, apontada nos valores de plântulas normais.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram que as sementes de pau-brasil devem ser armazenadas em temperaturas sub-zero. Contudo, deve-se atentar para os valores do teor de água, que foram significativamente reduzidos durante o armazenamento em temperaturas positivas (Tabela 1). Esses resultados poderiam sugerir que a deterioração de tais sementes poderia ter ocorrido não em função da temperatura, mas da redução no teor de água. Neste caso, porém, seria esperada uma redução na germinação já nos primeiros seis meses de armazenamento, uma vez que nesse período as sementes já haviam atingido o teor de água que manteriam até o final do armazenamento. Outro importante fator a se considerar é que as sementes de *C. echinata* são tolerantes à dessecação, suportando reduções até 4% (Martini Neto 2011). Como o teor de água das sementes armazenadas nunca foi inferior a 5%, supõe-se que a deterioração não ocorreu em função do teor de água, mas sim de processos termo-dependentes. Reforça-se tal idéia pelos resultados obtidos por Lamarca & Barbedo (2012) que fixaram o teor de água das sementes e submeteram-nas a diferentes temperaturas. Estes autores verificaram que os processos oxidativos ocorrem de forma progressivamente mais intensa com qualquer aumento na temperatura do ambiente.

Outro aspecto importante referente ao teor de água é que, como já observado por Hellmann *et al.* (2006), se mantidas com elevado teor de água em temperaturas abaixo de zero as sementes de pau-brasil não sobrevivem, possivelmente por danos mecânicos ocasionados em suas membranas pela expansão da água em sua forma sólida. Torna-se importante também avaliar alterações na composição das sementes uma vez que Garcia *et al.* (2006) verificaram alterações nos carboidratos durante o armazenamento das sementes de *C. echinata* e Mello *et al.* (2011) evidenciaram que os lipídios dessas sementes também poderiam estar envolvidos com as alterações ocorridas durante o armazenamento destas.

O armazenamento de sementes ortodoxas a -18 ºC é adotado pela maioria dos bancos de sementes, permitindo prolongar a longevidade das sementes por muitas décadas (Santos 2000). Sabendo-se que as sementes de *C. echinata* toleram a exposição

ao nitrogênio líquido (Zanotti *et al.* 2012), é possível que se mantidas em temperaturas muito baixas, estas mantenham a capacidade germinativa por períodos superiores aos obtidos no presente trabalho. Uma vez que a produção de sementes de pau-brasil é anual, a possibilidade de armazenar suas sementes por pelo menos cinco anos pode servir como importante ferramenta para conservação da espécie símbolo do país, considerada ainda hoje como em risco de extinção.

Referências bibliográficas

Abensperg-Traun, M. 2009. CITES, sustainable use of wild species and incentive-driven conservation in developing countries, with an emphasis on southern Africa. Biol. Conserv. 142: 948-963.

Barbedo, C. J., Bilia, D. A. C. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Revista Brasileira de Botânica 25: 431-439.

Franco, N. & Yojo T. 2008. Propriedades físicas, mecânicas e acústicas da madeira de pau-brasil. *In* Pau-brasil: da semente à madeira. Conhecer para preservar. (R.C.L. Figueiredo-Ribeiro, C.J. Barbedo, E.S. Alves, M. Domingos & M.R. Braga, orgs.). Governo do Estado de São Paulo e Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo. p.154-158.

Garcia, I. S., Souza, A., Barbedo, C. J., Dietrich, S. M. C. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the brazilian atlantic forest. Brazilian Journal of Biology 66: 739-745.

Gomes, F. P. 1982. Curso de estatística experimental. 10. ed. Nobel, Piracicaba.

Hellmann, M. E., Mello, J. I. O., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. & Barbedo C. J. 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água. Revista Brasileira de Botânica 29: 93-101.

ISTA (International Seed Testing Association). 1996. International rules for seed testing, rules 1996. Seed Science and Technology 24: 1-335.

Labouriau, L. G. 1983. A germinação das sementes. OEA, Washington. 174p.

Lamarca, E. V. & Barbedo, C. J. 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. Hoehnea 39: 577-586.

Martini-Neto, N. 2011. Isotermas de sorção de água, potencial de armazenamento e suas relações com as taxas respiratórias em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo. 89p.

Mello, J. I. O. & Barbedo, C. J. 2007. Temperatura, luz e substrato para germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae - Caesalpinioideae). Revista Árvore 31: 645-655.

Mello, J. I. O., Centeno, D. C., Barbedo, C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2011. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. Seed Science & Technology 39: 465-480.

Pilatti, F. K., Aguiar, T., Simões, T., Benson, E. E. & Viana, A.M. 2011. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 47: 82-98.

Rocha, Y. T. 2010. Distribuição geográfica e época de florescimento do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam. – Leguminosae). Rev. Dep. Geogr. 20: 23-36.

Santos, I. R. I. 2000. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12: 70-84.

Zanotti, R. F., Motta, L. B., Bragatto, J., Labate, C. A., Salomão, A. N., Vendrame, W. A. & Cuzzuol, G. R. F. 2012. Germination, carbohydrate composition and vigor of cryopreserved *Caesalpinia echinata* seeds. Brazilian Archives of Biology and Technology 55: 661-669.

Capítulo II - Dinâmica dos compostos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* em duas fases de maturação armazenadas em temperatura sub-zero

Resumo

Durante a maturação, as sementes acumulam compostos tais como carboidratos, lipídios e proteínas que servirão como fonte de reserva energética para o desenvolvimento da nova plântula, além de geralmente proverem proteção contra a dessecação e oscilações térmicas. Após atingir a maturidade fisiológica, as sementes entram num processo de deterioração que pode ser postergado, desde que sejam utilizadas condições adequadas de armazenamento. Para sementes ortodoxas, o armazenamento é comumente realizado reduzindo-se o teor de água e a temperatura, a fim de diminuir as taxas metabólicas. Desta forma, sementes de *Caesalpinia echinata* em duas fases de maturação (imaturas – 45 dias após antese – DAA e recém-dispersas – 55 DAA) foram avaliadas quanto à germinação e composição de carboidratos solúveis, amido e proteínas, após dessecação e armazenamento a 22 °C e a -18 °C, por 30 dias. Sementes recém-coletadas apresentaram maior teor de açúcares solúveis em relação ao relatado na literatura para a espécie. Contudo, o armazenamento reduziu a concentração de tais compostos . Estas também apresentaram menor porcentagem de germinação, sendo o armazenamento letal para sementes com 45 DAA. O armazenamento a -18 °C foi eficiente para a conservação das sementes com 55 DAA. Sementes das duas fases de maturação apresentaram grande quantidade de globulinas e prolaminas, destacando-se proteínas com peso molecular próximo a 22 e 66 kDa, reportadas como importantes nos processos de mobilização de proteínas de reserva e tolerância a estresse hídrico.

Abstract

During seed maturation, carbohydrates, lipids and proteins are accumulated to be used as source of energy for the development of the new plantlet, and to provide protection against drought and thermal oscillations. After reaching physiological maturity, seeds start a deterioration process, however, this can be retarded by storage, when appropriate techniques are employed for the species. In orthodox seeds, storage is commonly performed by reducing the water content and temperature, in order to reduce the metabolism and prevent germination. In that way, seeds of *Caesalpinia echinata* in two stages of maturation (immature – 45 days after anthesis – DAA, and recently dispersed – 55 DAA) were evaluated concerning germination rates, soluble carbohydrate composition and contents of starch and protein, after drying and storing at 22 ° C and -18 ° C for 30 days. Freshly harvested seeds showed higher amounts of soluble sugars than that reported in the literature for this species. However, storage of seeds at both stages caused a reduction in the amounts of those compounds.. Stored seeds also showed lower germination rates, being the storage lethal to the 45 DAA seeds. Storage of mature seeds at -18 °C was efficient to maintain germination rates. Seeds at both maturation stages showed large amounts of globulin and prolamin, especially proteins with molecular weights close to 22 and 66 kDa, reported as important in the processes of protein mobilization and tolerance to water stress.

Introdução

O desenvolvimento de sementes é um processo complexo, que inicia a partir da fertilização do óvulo e consiste de uma série de alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas (Marcos Filho 2005). Essas alterações resultam em um padrão trifásico: (1) histodiferenciação, com intenso processo de divisão celular e organogênese, (2) maturação, com a deposição de reservas e (3) secagem. Esta última fase é observada apenas em sementes ortodoxas, pois sementes recalcitrantes são dispersas com elevado teor de água e metabolismo ativo (De Castro *et al.* 2004).

Durante a maturação há o acúmulo de compostos de reserva como o amido, alguns polissacarídeos de parede celular, sacarose e oligossacarídeos da série da rafinose (OSR) são depositados em diversos tecidos da semente. A sacarose e os OSR, assim como os ciclitóis, têm sido amplamente associados com a tolerância à dessecação de sementes ortodoxas (Lin & Huang 1994, Obendorf 1997, Peterbauer & Richter 2001, Buckeridge *et al.* 2004, Mello *et al.* 2010), que se estabelece durante a maturação da semente (Kermode 1990, Hoekstra *et al.* 2001), antevendo a fase final de dessecação (De Castro *et al.* 2004).

A partir do momento em que a semente atinge a maturidade fisiológica, ainda no campo, tem início um processo de deterioração, geralmente irreversível. Assim, definir o ponto certo da coleta, no final do processo de maturação, pode aumentar as chances de sucesso do armazenamento das sementes e do estabelecimento das plântulas.

A velocidade e taxa de deterioração das sementes são altamente influenciadas pelas condições ambientais, tais como temperatura e umidade relativa do ar, além das características intrínsecas das sementes, como teor de água, composição bioquímica e metabolismo (Carvalho & Nakagawa 2000). Uma vez que preservação ou o armazenamento de sementes é necessário, seja por motivos ecológicos ou econômicos, deve-se levar em conta fatores como condições ambientais (armazenamento *in* situ) e embalagem (armazenamento *ex situ*). A perda da qualidade das sementes pode ser controlada durante o armazenamento, desde que sejam empregadas técnicas capazes de reduzir o metabolismo destas, evitando a degradação dos compostos de reserva e a formação de substâncias oxidantes, além de evitar danos causados por patógenos.

Uma forma amplamente empregada no armazenamento de sementes consiste na associação da redução do teor de água destas, com baixos valores de temperatura e umidade relativa do ar. Existem relatos que indicam que a longevidade das sementes ortodoxas é duplicada a cada 1% de diminuição do teor de água (para teores entre 5-15%) ou a cada 5,5 °C de diminuição na temperatura de armazenamento (válido para temperaturas entre 0 e 40 °C) (Villela & Peres 2004).

No entanto, nem todas as sementes podem ser submetidas à dessecação. Apenas sementes ortodoxas são capazes de tolerar a redução do teor de água e baixas temperaturas, principalmente temperaturas sub-zero, uma vez que o sucesso do congelamento de sementes está associado à redução do teor de água, evitando desta forma a expansão da água no estado sólido, causando desestruturação celular e consequentemente danos às sementes.

Para que as sementes tolerem a dessecação é essencial que estas apresentem mecanismos e estratégias de proteção de estruturas subcelulares e dos tecidos, tais como o acúmulo de reservas solúveis e insolúveis, desdiferenciação celular, redução do metabolismo, presença de sistema antioxidante, acúmulo de proteínas específicas, oligossacarídeos, açúcares álcoois e a presença e funcionamento de um sistema de reparo durante a reidratação (Pammenter & Berjak 1999).

Dentre as estratégias encontradas pelas sementes ortodoxas para tolerar a desidratação, inclue-se o aumento na quantidade de carboidratos totais reportado em sementes imaturas de *C. echinata* (Leduc *et al.* 2012) e de outras espécies e tecidos vegetais (Kuo *et al.* 1988, Dionne *et al.* 2001), sendo este aumento possivelmente relacionado com a hidrólise do amido. Mello *et al.* (2010) encontraram grande quantidade de oligossacarídeos da série da rafinose e ciclitóis galactosilados, respectivamente em sementes de *Erythrina speciosa* e *Caesalpinia echinata*, duas espécies de leguminosas com sementes ortodoxas.

Os ciclitóis galactosilados têm sido associados à proteção de tecidos embrionários em situações de estresse, como a dessecação, e também na manutenção do vigor durante o armazenamento (Peterbauer & Richter 2001). Esses carboidratos contribuem para a formação do estado vítreo das sementes durante a desidratação. Nesse estado de alta viscosidade há redução acentuada das reações químicas, até quase a paralisação, conservando intactas as estruturas celulares e os tecidos das sementes. A formação do estado vítreo é considerada um processo importante para a aquisição de tolerância à dessecação em sistemas biológicos (Williams & Leopold 1989, Bruni &

Leopold 1991) e sua formação é intensificada na presença de oligossacarídeos, prevenindo a cristalização até mesmo em sistemas artificiais (Koster & Leopold 1988).

Além dos carboidratos, algumas classes de proteínas estão fortemente relacionadas com o processo de tolerância à dessecação em sementes, como as *Late Embryogenesis Abundant Proteins* (LEAs) e as *Heat Shock Proteins* (HSPs), entre outras (Hundertmark *et al.* 2011). Em relação à tolerância ao frio, mudanças quantitativas e qualitativas nas proteínas em plântulas de pêssego, folhas de rododendro e álamo poderiam estar associadas à tolerância a baixas temperaturas, como ocorre com as deidrinas, que são induzidas pela desidratação celular (Arora & Wisniewski 1994, Harris *et al.* 2006, Renaut *et al.* 2005).

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo analisar o conteúdo e a composição de carboidratos e proteínas de reserva das sementes de *C. echinata*, em duas fases de maturação (imaturas e maduras), submetidas à secagem e ao armazenamento em temperatura sub-zero e no ambiente, visando verificar as principais modificações nesses compostos ocorridas nos processo de tolerância à dessecação e perda de viabilidade, para melhor compreensão dos mecanismos de manutenção de viabilidade durante o armazenamento.

Material e Métodos

Frutos de *Caesalpinia echinata* foram coletados em cerca de 50 matrizes localizadas em propriedade privada no município de Jaú/SP, em 2011, aos 45 dias (imaturos) e 55 dias após a antese (DAA), conforme definido por Borges *et al.* (2005). Neste último ponto, as sementes já haviam atingido o valor máximo de matéria seca e se encontravam próximo ao ponto de dispersão natural. Após beneficiamento, as sementes foram avaliadas quanto ao teor de água (ISTA 1985), germinabilidade, conforme descrito por Mello & Barbedo (2007) e analisadas quanto aos carboidratos solúveis, amido e proteínas, conforme descrito a seguir, coletando-se separadamente os cotilédones e eixo embrionário.

Sementes de ambas as idades foram submetidas à dessecação em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C, até atingirem teores de água de aproximadamente 8%. Sementes maduras e imaturas, secas e não secas, foram armazenadas a -18 °C e em temperatura ambiente (22 °C, controle) por 30 dias, em sacos de papel (Figura 1).

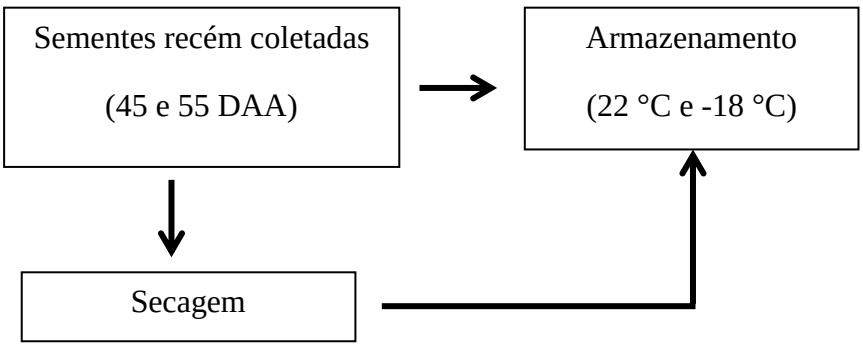


Figura 1. Esquema geral do delineamento experimental de sementes imaturas e maduras de *Caesalpinia echinata* submetidas ou não à secagem e armazenamento por 30 dias a -18 °C e a 22 °C.

Extração e quantificação de carboidratos

A partir das amostras liofilizadas e pulverizadas com auxílio de almofariz e pistilo, 100 mg de cotilédone e cerca de 10 mg de eixo embrionário/raízes foram utilizados para a extração de carboidratos solúveis. As extrações foram realizadas em banho-maria a 80 °C, por 15 min, utilizando-se 1 mL ou 0,5 mL (respectivamente para cotilédone e eixo embrionário) de etanol 80% por amostra, sendo o precipitado re-extraído duas vezes e os sobrenadantes juntados. O açúcar total foi quantificado pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), usando glucose como padrão. Os resultados foram expressos em mg por g de massa seca (mg g^{-1} MS).

Os carboidratos solúveis neutros foram analisados por cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) após deionização em coluna de troca iônica Dowex-1 (forma Cl^-) e Dowex-50W (forma H^+). O sistema de HPAEC/PAD (Dionex ICS-3000) usado consistiu de uma coluna CarboPac PA-1, com 4x250 mm e eluição com gradiente de 150 mM de hidróxido de sódio (eluente B) e água (eluente A), com a seguinte programação: 0-25 min, 66,7% eluente B; 25,1-30 min, 100% eluente B, 30,1-35 min, 66,7% eluente B, com fluxo de 0,2 mL min^{-1}.

Parte do extrato etanólico foi evaporada e re-suspendida em água destilada e utilizada para quantificação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson (Somogyi 1945), utilizando-se glucose como padrão.

O resíduo das extrações de carboidratos solúveis foi submetido à determinação enzimática de amido de acordo com Amaral *et al.* (2007).

Extração e quantificação de proteínas

Para a extração das globulinas (primeira fração), ao material vegetal previamente desengordurado em acetona (100 mg – cotilédones, 20 mg - eixos embrionários), foi adicionado NaCl 0,5 M, na proporção 2:5 (p:v). A extração foi realizada a 4 °C, por 1h. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado a -20 °C. Repetiu-se a extração com NaCl e centrifugação. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20 °C. Lavou-se o resíduo com 500 µL de H_2O MQ e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 min. Nova lavagem foi realizada e o resíduo foi seco e pesado.

A extração da segunda fração (prolaminas) foi realizada com o resíduo da 1ª extração, utilizando-se solução de isopropanol 55% e β Mercaptoetanol (βMe) 0,4% (1:4, p:v) por uma noite. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 min (temperatura ambiente). Recolheu-se o sobrenadante e armazenou-se a -20 °C. A extração foi repetida por 2h. Recolheram-se e juntaram-se os sobrenadantes.

As glutelinas foram extraídas a partir do resíduo da 2ª extração, utilizando-se SDS 5%, βMe 2,5% em tampão Tris HCl 100 mM pH 7,5 por 2h em temperatura ambiente, após o qual, as amostras foram fervidas a 100 °C por 5 min e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -20 °C.

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), usando-se albumina de soro bovino como padrão (BioRad).

Eletroforese de proteínas – SDS-PAGE

A análise comparativa do perfil proteico das duas frações foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). O gel de resolução foi preparado a partir de 8 mL de uma solução estoque de acrilamida e bis-acrilamida (29,2:0,8 p/p), 5 mL de tampão de resolução (Tris HCl 3M pH 8,8), 200 µL de SDS

10% e 6,7 mL de H_20 deionizada, e vertido em placas de vidro separadas por espaçadores de 2 mm, imediatamente após a adição dos catalizadores da reação, 100 µl de PAM 10% e 10 µl de TEMED. Após o período de polimerização do gel, adicionou-se o gel de empacotamento 4% consistindo de 2,6 mL de acrilamida e bis acrilamida (29,2:0,8, p/p), tampão de resolução (Tris HCl 0,5M pH 6,8), 200 µL de SDS 10% e 12 mL de H_2O deionizada. Também foram adicionados 100 µL de PAM e 10 µL de TEMED para catalização da reação de polimerização.

Quantidade correspondente a 7,5 µg de proteínas foram utilizadas para cada amostra e desnaturadas por 5 min a 100 °C, na presença de 60 µL de tampão de amostra, contendo H_20 deionizada, Tris HCl 0,5M pH 6,8, glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 0,5% e βMe 5%. A corrida eletroforética foi realizada em sistema Mini-Protean II (Bio-Rad, USA) contendo tampão Tris-Glicina (solução estoque, 1L, 10x concentrada contendo: 33,3 g de TrisBase, 144 g de glicina e 10 g de SDS). A voltagem aplicada foi de 50 mA, até a saída do azul de bromofenol do gel.

Os géis foram fixados em solução de ácido acético, etanol e H_2O deionizada (1:4:5, v/v/v) por 1 hora, corados em solução de 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R-250 por 1 hora e descorados em solução de ácido acético, metanol e água deionizada (1:2:7, v/v/v), durante a noite e, após o qual, a solução foi trocada por ácido acético, metanol, água deionizada (1:3:6, v/v/v), onde permaneceu por cerca de 2 horas ou até que o excesso de corante fosse completamente removido. Alternativamente, para os géis cujas bandas apresentaram fraca coloração com Coomasie, foi realizada coloração com prata, utilizando o kit Silver Stain Plus (Bio-Rad), segundo instruções do fabricante. Utilizou-se como padrão uma mistura de proteínas com pesos moleculares de ampla gama (Bio-Rad, USA).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições para os testes bioquímicos e quatro repetições de 12 sementes para os testes de germinação e quatro repetições de 5 sementes para os testes de teor de água e matéria seca. Os resultados analisados em esquema fatorial 3x2x2 (armazenamento x secagem x idade) foram submetidos à análise de variância empregando-se o teste F ao nível de 5%.

Resultados

Sementes imaturas (45 DAA) recém coletadas de *Caesalpinia echinata* apresentaram elevado teor de água (69%), enquanto que sementes recém-dispersas (55 DAA) apresentaram cerca de 15% (redução de 78% - Tabela 1). Lotes de sementes das duas idades, com os teores de água iniciais, foram armazenados por 30 dias em temperatura ambiente (22 °C, controle) e a -18 °C (congelador). Após este período, as sementes de 45 DAA tiveram redução no teor de água, sendo que as mantidas em temperatura ambiente mostraram a maior redução (280%), enquanto as sementes armazenadas a -18 °C reduziram 29% o conteúdo de água. Por outro lado, as sementes de 55 DAA não tiveram o teor de água modificado em função da temperatura de armazenamento. Nota-se que as sementes das duas idades, que foram mantidas a 22 °C apresentaram o mesmo valor de teor de água, evidenciando que estas entraram em equilíbrio com a umidade relativa do ar.

Tabela 1. Teor de água (%) de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA submetidas à secagem ou não e armazenamento por 30 dias a 22 °C e -18 °C.

Armazenamento	45 DAA								55 DAA							
	com secagem				sem secagem				com secagem				sem secagem			
22 ° C	14,3	a	A	*a*	13,7	c	A	*a*	12,9	a	A	*a*	12,7	a	A	*a*
-18 °C	11,1	ab	B	*a*	49,2	b	A	*a*	12,6	a	A	*a*	12,2	a	A	*b*
sem armazenamento	6,9	b	B	*a*	69,3	a	A	*a*	8,9	a	B	*a*	15,1	a	A	*b*
coef. var. (%)	13,87															

Letras minúsculas comparam armazenamento, maiúsculas comparam secagem e itálicas comparam idade.

Logo após a coleta, as sementes de pau-brasil foram submetidas à secagem artificial em estufa, sendo o teor de água reduzido para 7-9%. Essas sementes secas também foram armazenadas, havendo alteração do teor de água em função da temperatura. Nas sementes imaturas desidratadas houve aumento no teor de água, sendo este maior nas sementes mantidas em temperatura ambiente (*ca.* 107%). Todavia, nas sementes recém dispersas secas não houve alteração no teor de água. Novamente observa-se que sementes secas das duas idades armazenadas a -18 °C e a 22 °C por 30 dias apresentaram teor de água similar. Quando armazenadas, sementes dessecadas das duas idades também apresentaram o mesmo teor de água igual (11-12%).

O fator idade para massa seca não apresentou interação com os demais fatores estudados, sendo a média de 133,88 mg semente^{-1} (45 DAA) e de 319,25 mg semente^{-1} (55 DAA), valor este 138% maior do que o das sementes de 45 DAA. Na tabela 2

observa-se a massa seca das sementes de pau-brasil antes e após secagem com ou sem armazenamento.

Tabela 2. Massa seca (mg semente^{-1}) de sementes de *Caesalpinia echinata* submetidas ou não à secagem e armazenamento por 30 dias a 22 °C e -18 °C.

Armazenamento	com secagem			sem secagem		
22 ° C	211,00	a	A	228,88	a	A
-18 ºC	251,38	a	A	199,13	a	B
sem armazenamento	240,88	a	A	228,13	a	A
coef. var. (%)	15,67					

Letras minúsculas comparam colunas e maiúsculas comparam linhas.

A massa seca só apresentou diferença estatística nas sementes sem secagem e armazenadas a -18 °C, sendo que para esta variável, só houve interação dos fatores secagem e temperatura de armazenamento.

Na tabela 3 são mostrados os resultados dos testes de germinação e de desenvolvimento de plântulas obtidos nos experimentos. Inicialmente as sementes de 45 e 55 DAA apresentaram alta porcentagem de germinação e de desenvolvimento de plântulas normais (95-98% e 82-86%, respectivamente), valores estatisticamente iguais para as variáveis. Após o armazenamento das sementes com teor de água original, a germinação de sementes imaturas e recém dispersas foi reduzida, sendo o congelamento letal para sementes com 45 DAA. Embora 15% dessas sementes armazenadas a 22 °C tenham germinado, estatisticamente este resultado não diferiu dos valores encontrados para o armazenamento a -18 °C.

As sementes com 55 DAA sem secagem e armazenadas também apresentaram diminuição da germinação, no entanto 65% das sementes mantidas a -18 °C germinaram. A germinação das sementes das duas idades armazenadas em temperatura ambiente foi estatisticamente igual. O desenvolvimento de plântulas nos lotes com 45 e 55 DAA também foi semelhante, sendo praticamente nulo.

A secagem foi prejudicial para as sementes das duas idades, embora tenha sido observado 25% de germinação naquelas com 55 DAA. Nenhum dos lotes apresentou germinação após armazenamento a 22 ºC. Sementes armazenadas a -18 ºC secas mantiveram o padrão de germinação observado antes do armazenamento.

Tabela 3. Germinação (%) e desenvolvimento de plântulas (%) de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias a 22 °C e -18 C.

Germinação																
Armazenamento	45 DAA								55 DAA							
	com secagem				sem secagem				com secagem				sem secagem			
22 ° C	0,00	a	B	*a*	15,03	b	A	*a*	0,00	b	A	*a*	10,00	c	A	*a*
-18 °C	3,35	a	A	*b*	0,00	b	A	*b*	22,50	a	B	*a*	65,00	b	A	*a*
sem armazenamento	1,68	a	B	*b*	98,33	a	A	*a*	25,00	a	B	*a*	95,00	a	A	*a*
coef. var. (%)	31,44															
Desenvolvimento de plântulas																
Armazenamento	45 DAA								55 DAA							
	com secagem				sem secagem				com secagem				sem secagem			
22 ° C	0,00	a	A	*a*	3,33	b	A	*a*	0,00	b	A	*a*	0,00	c	A	*a*
-18 °C	0,00	a	A	*b*	0,00	b	A	*b*	12,50	ab	B	*a*	47,50	b	A	*a*
sem armazenamento	0,00	a	B	*b*	86,65	a	A	*a*	15,00	a	B	*a*	82,50	a	A	*a*
coef. var. (%)	35,25															

Letras minúsculas comparam armazenamento, maiúsculas comparam secagem e itálicas comparam idade.

Desenvolvimento de plântulas a partir de sementes armazenadas só foi observado em sementes com 55 DAA armazenadas a -18 °C, embora em porcentagem menor em relação ao controle.

As análises bioquímicas foram realizadas nos eixos embrionários e cotilédones separadamente. Não foi possível coletar material de sementes de pau-brasil com 45 DAA sem secagem, após o armazenamento nas duas temperaturas, devido à grande contaminação por fungos, uma vez que estas sementes apresentavam 70% de água.

Na tabela 4 estão mostrados os teores de carboidratos solúveis totais encontrados nos eixos e cotilédones de sementes de pau-brasil. De maneira geral, as sementes com 55 DAA apresentaram maior teor de açúcares solúveis, principalmente nos eixos embrionários, independente do tratamento aplicado.

Eixos embrionários e cotilédones das sementes com 55 DAA apresentaram cerca de 100% mais carboidratos solúveis do que as de 45 DAA. Com o armazenamento, houve redução nos teores de carboidratos solúveis em cerca de 15% nos eixos embrionários e 19% nos cotilédones.

Em função da secagem, sementes das duas idades apresentaram comportamentos opostos. Enquanto nos eixos e cotilédones de sementes com 45 DAA a redução do teor de água ocasionou aumento de 16 e 36%, respectivamente, nas sementes de 55 DAA a dessecação acarretou redução de cerca de 4% nos valores de carboidratos solúveis, tanto nos eixos, quanto nos cotilédones.

O armazenamento de sementes secas provocou redução de 17-36% nos teores de açúcares totais solúveis nas duas idades, nas duas condições de armazenamento, tanto nos eixos quanto nos cotilédones.

Os açúcares redutores representaram pequena proporção dos açúcares solúveis nas sementes de pau-brasil e a quantificação destes pode ser observada na tabela 5.

Tabela 4. Teor de carboidratos solúveis (mg g^{-1} MS) nos eixos embrionários e cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias à 22 °C e -18 C.

Eixo embrionário																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	126,97	b	A	*b*	0,00	b	B	*b*	216,89	b	A	*a*	237,72	b	A	*a*
-18 °C	125,33	b	A	*b*	0,00	b	B	*b*	201,43	b	A	*a*	228,40	b	A	*a*
sem armazenamento	164,07	a	A	*b*	141,33	a	B	*b*	260,86	a	A	*a*	272,52	a	A	*a*
coef. var. (%)	7,78															
Cotilédone																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	104,74	b	A	*b*	0,00	b	B	*b*	142,81	b	B	*a*	178,18	b	A	*a*
-18 °C	117,02	b	A	*b*	0,00	b	B	*b*	159,47	b	A	*a*	177,00	b	A	*a*
sem armazenamento	153,88	a	A	*b*	112,46	a	B	*b*	210,75	a	A	*a*	219,30	a	A	*a*
coef. var. (%)	8,45															

Letras minúsculas comparam armazenamento, maiúsculas comparam secagem e itálicas comparam idade.

Tabela 5. Teor de açúcares redutores (mg g^{-1} MS) nos eixos embrionários e cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias à 22 °C e -18 C.

Eixo embrionário																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	65,68	ab	A	*a*	0,00	b	B	*b*	41,67	a	A	*b*	46,05	b	A	*a*
-18 °C	45,90	b	A	*a*	0,00	b	B	*b*	42,94	a	A	*a*	42,09	b	A	*a*
sem armazenamento	56,36	ab	A	*a*	41,95	a	B	*b*	51,55	a	B	*a*	62,99	a	A	*a*
coef. var. (%)	15,63															
Cotilédone																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	26,57	a	A	*a*	0,00	b	B	*b*	21,33	b	A	*a*	23,39	a	A	*a*
-18 °C	25,13	a	A	*b*	0,00	b	B	*b*	33,08	a	A	*a*	27,80	a	A	*a*
sem armazenamento	27,67	a	A	*a*	24,45	a	A	*a*	23,50	b	A	*a*	24,52	a	A	*a*
coef. var. (%)	20,93															

Letras minúsculas comparam armazenamento, maiúsculas comparam secagem e itálicas comparam idade.

Assim como observado para carboidratos solúveis, os açúcares redutores estavam presentes em maior quantidade nos eixos embrionários das sementes de pau-brasil nos quais há 71% mais açúcar redutor do que nos cotilédones de sementes imaturas, enquanto que esse valor é 157% maior nas sementes recém-dispersas.

Nos eixos embrionários de sementes com 55 DAA foram encontrados 33,4% a mais de açúcares redutores, comparando com o mesmo tecido de sementes de 45 DAA. Já nos cotilédones, as sementes das duas idades apresentaram a mesma quantidade destes açúcares (24 mg g^{-1} MS).

Com o armazenamento, eixos embrionários de sementes recém-dispersas mostraram redução de cerca de 30% destes compostos, sendo que nos cotilédones não foi observada diferença estatística entre os resultados encontrados.

A secagem só alterou a quantidade de açúcares redutores nos eixos embrionários, sendo que nos eixos de sementes de 45 DAA houve incremento de 34% e nos de 55 DAA, decréscimo de 18%.

O armazenamento de sementes secas não alterou a quantidade de açúcares redutores nos cotilédones de sementes com 45 DAA e nos eixos embrionários de sementes recém-dispersas, no entanto, nos eixos com 45 DAA, a temperatura ambiente fez com que estes açúcares aumentassem 16% e o congelamento reduziu 23%. Nos cotilédones de 55 DAA a temperatura ambiente não influenciou a quantidade de açúcares redutores, enquanto o congelamento fez com que houvesse aumento de 40% no teor dos mesmos.

O amido é um dos principais compostos de reserva das sementes de pau-brasil e as quantidades encontradas nos eixos embrionários e cotilédones de sementes imaturas e recém-dispersas estão mostradas na tabela 6.

Nos eixos embrionários, sementes com 55 DAA foram encontrados 35 mg g^{-1} MS de amido, 34% a mais do que nos eixos com 45 DAA. Já nos cotilédones, não existiu diferença estatística entre as duas idades, sendo observados valores de 143-155 mg g^{-1} MS.

O armazenamento de sementes com 55 DAA não secas reduziu em 63% a quantidade de amido quando as mesmas foram mantidas a 22 °C, sendo que não foram detectadas alterações nas sementes congeladas. Por outro lado, nos cotilédones houve aumento de 203% na quantidade de amido das sementes mantidas a 22 °C e 150% nas congeladas.

Tabela 6. Teor de amido (mg g^{-1} MS) nos eixos embrionários e cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias à 22 °C e -18 C.

Eixo embrionário																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	22,56	a	A	*b*	0,00	b	B	*b*	43,52	b	A	*a*	12,77	b	B	*a*
-18 °C	2,70	b	A	*b*	0,00	b	A	*b*	13,17	c	B	*a*	42,81	a	A	*a*
sem armazenamento	8,61	b	B	*b*	22,90	a	A	*b*	63,68	a	A	*a*	34,87	a	B	*a*
coef. var. (%)	19,24															
Cotilédone																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	221,67	a	A	*a*	0,00	b	B	*b*	260,18	b	B	*a*	434,25	a	A	*a*
-18 °C	257,39	a	A	*b*	0,00	b	B	*b*	347,15	ab	A	*a*	357,64	a	A	*a*
sem armazenamento	129,80	b	A	*b*	154,82	a	A	*a*	400,57	a	A	*a*	143,09	b	B	*a*
coef. var. (%)	19,88															

Letras minúsculas comparam armazenamento, maiúsculas comparam secagem e itálicas comparam idade.

A secagem reduziu em 62% o teor de amido encontrado nos eixos embrionários de sementes imaturas e aumentou em 82% o teor deste carboidrato nos eixos de 55 DAA. Nos cotilédones de 45 DAA não houve diferença, enquanto nas sementes de 55 DAA o amido aumentou 180%.

Nas sementes secas de 55 DAA armazenadas, observa-se redução de amido nos dois tecidos analisados (32%/ 22 °C, 80%/ -18°C – eixos embrionários; 35%/ 22 °C, 13%/ -18 °C – cotilédones). No caso das sementes com 45 DAA, eixos embrionários armazenados a -18 °C não apresentaram modificação no teor de amido, enquanto o armazenamento a 22 °C ocasionou o aumento expressivo de 162%. Já nos cotilédones, tanto a 22 °C quanto a -18 °C o amido aumentou, em média, 84% nas sementes de 45 DAA.

Os teores de açúcares solúveis individuais nos eixos embrionários de pau-brasil de 45 e 55 DAA encontram-se nas tabelas 7 e 8.

O açúcar encontrado em maior quantidade nos eixos embrionários foi a sacarose, sendo que sementes de 45 DAA apresentaram 14,78 mg g^{-1} MS e as de 55 DAA, 23,21 mg g^{-1} MS, seguido dos ciclitóis (5,45 e 4,01 mg g^{-1} MS, respectivamente).

Os ciclitóis estão em maior proporção nos eixos embrionários de sementes de 45 DAA (*ca.* 27% a mais). Os eixos embrionários de sementes com 55 DAA não apresentaram qualquer modificação significativa nos teores desses açúcares durante o armazenamento.

A secagem não alterou o teor de ciclitóis nos eixos das sementes das duas idades, assim como o armazenamento das sementes secas imaturas e das recém-dispersas.

O dobro da quantidade de glucose foi encontrado nos eixos embrionários de sementes recém-dispersas, quando comparadas às imaturas e, com o armazenamento, a quantidade deste açúcar não foi alterada nos eixos das sementes recém-dispersas.

A secagem não influenciou o teor de glucose nos eixos embrionários das sementes das duas idades, assim como o armazenamento das sementes secas com 45 DAA secas e do armazenamento de eixos de 55 DAA sob temperatura negativa. Sementes de 55 DAA secas e armazenadas em temperatura ambiente, tiveram redução de 34% no teor de glucose.

A frutose estava presente em maior quantidade nos eixos embrionários de sementes de 55 DAA (176%) e com o armazenamento, o teor deste açúcar não foi alterado nos eixos embrionários de sementes recém-dispersas. A secagem não modificou a quantidade de frutose nos eixos embrionários das sementes de 45 e 55 DAA, assim como o armazenamento de sementes secas de 45 DAA e quando as sementes de 55 DAA foram armazenadas a -18 °C. O armazenamento em temperatura ambiente ocasionou redução de cerca de 50% nos eixos embrionários das sementes recém-dispersas.

A análise estatística do teor de sacarose nos eixos embrionários indicou que a temperatura de armazenamento não teve efeito significativo, portanto, são comparados apenas os dados de idade e secagem.

Os eixos embrionários de sementes recém-dispersas apresentaram 36% a mais de sacarose do que os eixos embrionários das sementes imaturas. E em função da secagem, houve redução de 77% do teor deste açúcar apenas nos eixos embrionários.

Assim como observado para os ciclitóis, os teores de rafinose foram maiores nos eixos embrionários das sementes imaturas (135% maior). Após o armazenamento a -18 °C das sementes recém-dispersas, os eixos embrionários não apresentaram modificação nos teores de rafinose, no entanto, nas sementes mantidas em temperatura ambiente, este valor foi 129% maior.

A secagem não alterou o teor deste oligossacarídeo nos eixos embrionários das sementes de 45 DAA e 55 DAA, assim como o armazenamento de sementes de 55 DAA. Eixos embrionários de 45 DAA após secagem tiveram aumento de 18% no teor

de rafinose quando armazenadas a 22 °C e redução de 19% quando armazenadas a -18 °C.

Tabela 7. Teor de açúcares individuais (mg g^{-1} MS) nos eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias à 22 °C e -18 C.

Ciclitóis																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	5,31	a	A	*a*	0,00	b	B	*b*	3,40	a	B	*b*	4,04	a	A	*a*
-18 °C	5,32	a	A	*a*	0,00	b	B	*b*	3,98	a	A	*b*	4,39	a	A	*a*
sem armazenamento	5,43	a	A	*a*	5,45	a	A	*a*	3,73	a	A	*b*	4,01	a	A	*b*
coef. var. (%)	9,89															
Glucose																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	0,94	a	A	*a*	0,00	b	B	*b*	0,79	b	B	*a*	1,51	a	A	*a*
-18 °C	0,74	a	A	*b*	0,00	b	B	*b*	1,45	a	A	*a*	1,35	a	A	*a*
sem armazenamento	0,76	a	A	*b*	0,63	a	A	*b*	1,20	a	A	*a*	1,22	a	A	*a*
coef. var. (%)	25,8															
Frutose																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	0,5	a	A	*a*	0,00	b	B	*b*	0,52	b	B	*a*	1,20	a	A	*a*
-18 °C	0,57	a	A	*b*	0,00	b	B	*b*	0,96	a	B	*a*	1,32	a	A	*a*
sem armazenamento	0,56	a	A	*b*	0,37	a	A	*b*	0,98	a	A	*a*	1,02	a	A	*a*
coef. var. (%)	27,16															
Sacarose																
Secagem	**45 DAA**								**55 DAA**							
com secagem	3,41	b	B						25,36	a	A					
sem secagem	14,78	a	B						23,21	a	A					
coef. var. (%)	30,55															
Rafinose																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	0,86	a	A	*a*	0,00	b	B	*b*	0,57	a	B	*b*	0,78	a	A	*a*
-18 °C	0,59	b	A	*a*	0,00	b	B	*b*	0,44	a	A	*b*	0,45	b	A	*a*
sem armazenamento	0,73	ab	A	*a*	0,80	a	A	*a*	0,41	a	A	*b*	0,34	b	A	*b*
coef. var. (%)	16,54															

Letras minúsculas comparam armazenamento, maiúsculas comparam secagem e itálicas comparam idade. (*) Letras minúsculas comparam colunas, maiúsculas comparam linhas.

Os fatores idade, armazenamento e secagem para os teores de estaquiose nos eixos embrionários não apresentaram interação tripla, apenas dupla (secagem x armazenamento, idade x armazenamento, idade x secagem), por isso os dados são apresentados separados na tabela 8.

Assim como a rafinose e os ciclitóis, os eixos embrionários de sementes imaturas apresentaram a maior quantidade de estaquiose (200% de aumento) e em função da secagem, os eixos de 45 DAA apresentaram 100% mais deste açúcar, já os eixos de 55 DAA não apresentaram alteração em seu teor.

Tabela 8. Teor de estaquiose (mg g^{-1} MS) nos eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias à 22 °C e -18 C.

Armazenamento	**com secagem**			**sem secagem**		
22 ° C	0,04	b	A	0,01	b	A
-18 °C	0,06	ab	A	0,00	b	B
sem armazenamento	0,08	a	A	0,12	a	A
Armazenamento	45 DAA			55 DAA		
22 ° C	0,04	b	A	0,01	a	A
-18 °C	0,06	b	A	0,00	a	B
sem armazenamento	0,17	a	A	0,03	a	B
Idade	**com secagem**			**sem secagem**		
45 DAA	0,11	a	A	0,06	a	B
55 DAA	0,01	b	A	0,02	b	A
coef. var. (%)	62,24					

Letras minúsculas comparam colunas, maiúsculas comparam linhas.

Analisando as idades e o armazenamento, a proporção de estaquiose dos eixos com 45 DAA foi reduzida nas duas temperaturas de armazenamento, cerca de três vezes, enquanto nos eixos com 55 DAA não houve modificação.

As sementes sem armazenamento foram as que apresentaram maior teor de estaquiose, com ou sem secagem, sendo que durante o armazenamento as sementes secas mantidas a 22 °C foram as que apresentaram menor valor (0,04 mg g^{-1} MS) sendo que as sementes sem secagem armazenadas a -18 °C não apresentaram o referido açúcar.

Os teores de açúcares solúveis individuais nos cotilédones das sementes com 45 e 55 DAA são apresentados nas tabelas 9, 10, 11 e 12. Da mesma forma que a estaquiose nos eixos embrionários, os três fatores analisados para ciclitóis de cotilédones só apresentaram interações duplas (armazenamento x secagem, armazenamento x idade, idade x secagem) e estão mostrados separadamente na tabela 9.

Os cotilédones de sementes com 55 DAA recém-coletadas apresentaram 132% mais ciclitóis do que os de 45 DAA e a secagem ocasionou aumento de 184% no teor de ciclitóis nos cotilédones de 45 DAA e redução de 11,5% nos cotilédones de 55 DAA.

Ao compararmos as idades durante o armazenamento, observamos que os cotilédones de 45 DAA apresentaram redução de 64% e os de 55 DAA, aumento de 73% no teor de ciclitóis.

Tabela 9. Teor de ciclitóis (mg g^{-1} MS) nos cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias à 22 °C e -18 C.

Armazenamento	**com secagem**			**sem secagem**		
22 ° C	6,06	a	A	2,90	b	B
-18 °C	5,25	a	A	3,26	b	B
sem armazenamento	5,80	a	A	5,44	a	A
Armazenamento	45 DAA			55 DAA		
22 ° C	2,99	b	B	5,97	a	A
-18 °C	2,62	b	B	5,88	a	A
sem armazenamento	7,83	a	A	3,42	b	B
Idade	**com secagem**			**sem secagem**		
45 DAA	6,62	a	A	2,33	b	B
55 DAA	4,78	b	B	5,40	a	A
coef. var. (%)	21,60					

Letras minúsculas comparam colunas, maiúsculas comparam linhas.

Independentemente da idade, sementes secas e não secas, sem armazenamento, não mostraram diferença estatística. A secagem prévia ao armazenamento ocasionou redução de 43% dos valores iniciais de ciclitóis nos cotilédones de pau-brasil e as que não foram secas apresentaram redução total dos níveis de ciclitóis.

Interação tripla entre os fatores analisados foi observada para os cotilédones, apenas nos açúcares glucose e frutose e os resultados são mostrados na tabela 10.

Nos cotilédones de sementes de 45 DAA foram encontradas 67% mais glucose do que nos mesmos tecidos de sementes com 55 DAA. Com a secagem, os cotilédones de sementes maduras apresentaram aumento deste açúcar, sendo que o armazenamento a -18 °C foi o que propiciou o maior aumento (77%). A secagem não modificou os teores de glucose nos cotilédones das duas idades. Já o armazenamento de sementes secas ocasionou incremento de 111% a 22 °C e 65% a -18 °C nos teores de glucose de

cotilédones de sementes maduras, enquanto nos cotilédones de 45 DAA armazenados em temperatura ambiente houve aumento de 7% e decréscimo de 33% no armazenamento a -18 °C.

Tabela 10. Teor de açúcares individuais (mg g^{-1} MS) nos cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias à 22 °C e -18 C.

Glucose																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	0,64	a	A	*a*	0,00	b	B	*b*	0,72	a	A	*a*	0,58	ab	A	*a*
-18 °C	0,40	b	A	*a*	0,00	b	B	*b*	0,56	a	A	*a*	0,71	a	A	*a*
sem armazenamento	0,60	ab	A	*a*	0,67	a	A	*a*	0,34	b	A	*b*	0,40	b	A	*b*
coef. var. (%)	23,07															
Frutose																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	0,50	b	A	*a*	0,00	b	B	*b*	0,51	a	A	*a*	0,44	ab	A	*a*
-18 °C	0,51	b	A	*a*	0,00	b	B	*b*	0,41	ab	A	*a*	0,58	a	A	*a*
sem armazenamento	0,83	a	A	*a*	0,68	a	A	*a*	0,22	b	A	*b*	0,28	b	A	*b*
coef. var. (%)	25,92															

Letras minúsculas comparam armazenamento, maiúsculas comparam secagem e itálicas comparam idade.

O teor de frutose nos cotilédones também foi maior (59%) nas sementes com 45 DAA do que o encontrado nos cotilédones de 55 DAA. Após o armazenamento de sementes maduras, houve aumento no teor de frutose, sendo maior nas armazenadas a -18 °C (107%).

A secagem de sementes com 45 e 55 DAA não influenciou no teor de frutose nos cotilédones, no entanto, com o armazenamento das sementes secas, os cotilédones de 45 DAA apresentaram redução de 40% e os cotilédones de 55 DAA apresentaram aumento de até 132%, a -18 °C.

Os teores dos açúcares sacarose e rafinose de cotilédones sementes de pau-brasil apresentaram pela análise estatística interações duplas (idade x armazenamento, idade x secagem) e suas quantificações são apresentadas na tabela 11.

A sacarose foi o açúcar solúvel encontrado em maior quantidade também nos cotilédones de sementes de *C. echinata*. Inicialmente, os cotilédones com 55 DAA apresentaram 100% a mais que o valor encontrado nos cotilédones com 45 DAA. Com o armazenamento, os cotilédones de sementes imaturas apresentaram redução de, em média, 66%, enquanto os teores de sacarose dos cotilédones de sementes recém-dispersas aumentaram, em média, 74%.

Os teores de sacarose nos cotilédones das sementes com diferentes idades associados à secagem indicaram que as sementes de 55 DAA apresentaram maior teor de sacarose quando submetidas à secagem, enquanto os cotilédones de 45 DAA apresentaram os maiores valores quando não submetidos à secagem.

O teor de rafinose nos cotilédones de sementes imaturas foi cerca de 70% maior do que nos cotilédones de sementes recém-dispersas e o armazenamento de sementes imaturas ocasionou a redução de quase 50% em relação ao teor inicial, enquanto o armazenamento de sementes de 55 DAA ocasionou o aumento de até 168%.

A secagem de sementes imaturas propiciou o aumento no teor de rafinose em 158%, enquanto que para sementes recém-dispersas, a secagem não modificou os teores deste oligossacarídeo nos cotilédones.

A análise estatística de estaquiose apresentou três interações duplas entre os fatores analisados (secagem x armazenamento, idade x armazenamento, idade x secagem) e os resultados podem ser vistos na tabela 12.

Tabela 11. Teor de açúcares individuais (mg g^{-1} MS) nos cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias à 22 °C e -18 C.

Sacarose							
Armazenamento	**45 DAA**				**55 DAA**		
22 ° C	2,53	b	B		23,50	a	A
-18 °C	2,05	b	B		24,51	a	A
sem armazenamento	6,79	a	B		13,82	b	A
Secagem	**45 DAA**				**55 DAA**		
sem secagem	5,67	a	B		19,38	b	A
com secagem	1,91	b	B		21,83	a	A
coef. var. (%)	18,78						
Rafinose							
Armazenamento	**45 DAA**				**55 DAA**		
22 ° C	0,65	b	B		1,10	a	A
-18 °C	0,30	b	B		0,75	ab	A
sem armazenamento	1,35	a	A		0,41	b	B
Secagem	**45 DAA**				**55 DAA**		
sem secagem	0,43	b	B		0,84	a	A
com secagem	1,11	a	A		0,67	a	B
coef. var. (%)	47,57						

Letras minúsculas comparam colunas, maiúsculas comparam linhas.

A secagem de sementes de pau-brasil, independentemente da idade, ocasionou aumento no teor de estaquiose, antes do armazenamento. Com o armazenamento de sementes secas houve redução dos teores de estaquiose nos cotilédones de pau-brasil em 300%, enquanto sem a secagem, os teores deste açúcar mantiveram-se constantes.

Independentemente da secagem, os cotilédones de sementes com 45 DAA apresentaram maior teor de estaquiose antes do armazenamento. Após, no entanto, este açúcar não foi observado. Os cotilédones de sementes de 55 DAA não apresentaram modificações nos teores de estaquiose em função do armazenamento.

Tabela 12. Teor de estaquiose (mg g^{-1} MS) nos cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias à 22 °C e -18 C.

Armazenamento	**com secagem**			**sem secagem**		
22 ° C	0,03	b	B	0,06	a	A
-18 °C	0,03	b	A	0,06	a	A
sem armazenamento	0,12	a	A	0,06	a	B
Armazenamento	45 DAA			55 DAA		
22 ° C	0,01	b	B	0,08	a	A
-18 °C	0,00	b	B	0,09	a	A
sem armazenamento	0,12	a	A	0,06	a	B
Idade	**com secagem**			**sem secagem**		
45 DAA	0,07	a	A	0,02	b	B
55 DAA	0,05	a	B	0,10	a	A
coef. var. (%)	36,49					

Letras minúsculas comparam colunas, maiúsculas comparam linhas.

Levando-se em consideração apenas idade e secagem, os teores de estaquiose só apresentaram diferença estatística analisando-se as sementes não submetidas à secagem, sendo que os cotilédones de 55 DAA apresentaram 400% mais estaquiose do que os cotilédones de 45 DAA.

Os teores de proteína foram analisados nas frações globulina, prolamina e glutelina. No entanto, só serão apresentados os resultados das duas primeiras frações, tendo em vista que não foi possível quantificar o teor de proteínas da terceira fração, devido à incompatibilidade do tampão de extração e do reagente para quantificação.

Na tabela 13 estão os valores de globulina nos eixos embrionários e nos cotilédones de pau-brasil, nas diferentes idades e tratamentos aplicados.

Os eixos embrionários de sementes das duas idades apresentaram maior quantidade de globulina do que os cotilédones e os eixos de sementes de 55 DAA possuem 12,5% a mais de proteína do que os eixos de 45 DAA. Em função da secagem, os eixos embrionários de sementes maduras apresentaram flutuações no teor de globulina. Quando armazenadas em temperatura ambiente, o teor de globulina reduziu 6%, quando armazenadas a -18 °C, aumentou 12,5%. Com a secagem, os teores de globulina nos eixos embrionários de sementes de 45 DAA aumentaram 13,5%, enquanto que nos eixos de sementes recém-dispersas, o teor de proteína não foi alterado, da mesma forma que o armazenamento. Nos eixos embrionários de sementes de 45 DAA, o armazenamento a -18 °C não modificou o teor de globulina, mas o armazenamento a 22 °C provocou a redução de 28% deste teor.

Tabela 13. Teor de proteínas na fração globulina (mg g^{-1} MS desengordurada) nos eixos embrionários e cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias à 22 °C e -18 C.

Eixo embrionário																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	9,12	b	A	*b*	0,00	b	B	*b*	13,15	a	A	*a*	11,96	b	A	*a*
-18 °C	11,00	a	A	*b*	0,00	b	B	*b*	12,52	a	B	*a*	14,36	a	A	*a*
sem armazenamento	12,68	a	A	*a*	11,17	a	B	*b*	13,33	a	A	*a*	12,77	ab	A	*a*
coef. var. (%)	8,65															
Cotilédone																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	5,80	a	A	*a*	0,00	b	B	*b*	4,87	b	A	*b*	5,07	a	A	*a*
-18 °C	5,46	a	A	*b*	0,00	b	B	*b*	6,05	a	A	*a*	5,06	a	B	*a*
sem armazenamento	5,21	a	A	*a*	5,47	a	A	*a*	4,33	b	A	*b*	4,81	a	A	*b*
coef. var. (%)	8,08															

Letras minúsculas comparam armazenamento, maiúsculas comparam secagem e itálicas comparam idade.

Nos cotilédones foi observado maior teor de globulina em sementes de 45 DAA (12% a mais). Com o armazenamento, os cotilédones de sementes não secas de 55 DAA não apresentaram modificação nos teores de globulina, da mesma forma que o armazenamento de sementes secas de 45 DAA. O armazenamento a -18 °C de sementes secas de 55 DAA ocasionou o aumento de 40% no teor de globulina.

Os teores de prolamina foram maiores do que os de globulina e as quantificações desta fração proteica podem ser observadas na tabela 14.

Eixos embrionários de sementes de 45 e 55 DAA apresentaram as mesmas quantidades (média de 20,6 mg g^{-1} MS desengordurada) e com a secagem das sementes

de 55 DAA, esse valor não foi alterado. A secagem e o armazenamento também não influenciaram os teores de prolamina nos eixos e cotilédones das sementes das duas idades.

O perfil proteico das frações globulina das sementes imaturas e recém-dispersas de *C. echinata* está mostrado na figura 2. Tanto cotilédones quanto eixos embrionários das duas idades apresentaram diversas bandas, com peso molecular variando de 14 a 97 kDa. De uma maneira geral, as bandas presentes nos cotilédones foram as mesmas das encontradas nos eixos embrionários.

Os cotilédones de sementes com 45 DAA não apresentaram alteração no perfil de bandas em função da secagem, no entanto, o armazenamento em ambiente de sementes imaturas secas (45 DAA CS Amb) ocasionou a redução da intensidade das proteínas com peso molecular entre 66 e 97 kDa, enquanto que para as armazenadas a -18 ºC, as bandas I e II (peso molecular aproximado de 97 kDa) mantiveram-se fortes e as de menor peso molecular abaixo destas, apresentaram redução.

Tabela 14. Teor de proteínas na fração prolamina (mg g^{-1} MS desengordurada) nos eixos embrionários e cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA, após secagem ou não e armazenamento por 30 dias à 22 °C e -18 C.

Eixo embrionário																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	20,18	a	A	*a*	0,00	b	B	*b*	21,00	a	A	*a*	23,97	a	A	*a*
-18 ºC	19,80	a	A	*b*	0,00	b	B	*b*	23,59	a	A	*a*	21,63	a	A	*a*
sem armazenamento	19,20	a	A	*a*	20,72	a	A	*a*	20,92	a	A	*a*	20,48	a	A	*a*
coef. var. (%)	10,11															
Cotilédone																
Armazenamento	**45 DAA**								**55 DAA**							
	com secagem				**sem secagem**				**com secagem**				**sem secagem**			
22 ° C	16,44	a	A	*b*	0,00	b	B	*b*	21,45	a	A	*a*	22,13	a	A	*a*
-18 ºC	16,01	a	A	*b*	0,00	b	B	*b*	19,41	a	A	*a*	19,84	a	A	*a*
sem armazenamento	15,31	a	A	*b*	16,18	a	A	*a*	19,77	a	A	*a*	19,02	a	A	*a*
coef. var. (%)	12,49															

Letras minúsculas comparam armazenamento, maiúsculas comparam secagem e itálicas comparam idade.

As bandas IIIA e IIB (66 kDa) estavam presentes nos dois tecidos analisados, com as duas idades e em todos os tratamentos, no entanto, esta foi menos intensa nos eixos embrionários de sementes com 55 DAA. A proteína referente à banda IVA também apresentou redução de intensidade após o armazenamento das sementes imaturas.

As bandas V, VI, VII (peso molecular entre 31 e 45 kDa) e IX apareceram em igual intensidade nos dois tecidos das sementes com 45 e 55 DAA e não foram alteradas em função da secagem e do armazenamento.

Os cotilédones de 55 DAA apresentaram bandas com peso molecular próximo a 45 kDa mais intensas do que os cotilédones de 45 DAA; as demais bandas não se alteraram ou intensificaram um pouco.

O perfil de bandas dos cotilédones de 55 DAA não foi modificado em função da secagem ou do armazenamento, assim como para o encontrado para os cotilédones imaturos. Da mesma forma, os eixos não foram alterados com os tratamentos, com exceção dos eixos de sementes secas, antes do armazenamento em que as bandas apareceram um pouco mais intensas.

Na figura 3 observam-se os perfis das proteínas da fração prolamina das sementes imaturas e recém-dispersas de *C. echinata* após secagem e armazenamento.

Nesta análise não puderam ser incluídas amostras de cotilédones de 45 DAA com secagem e de eixos sem secagem, assim como das de eixos embrionários de 55 DAA com secagem e armazenamento em ambiente por falta de material em quantidade suficiente.

Comparando-se o perfil de globulinas e prolamina, sementes de pau-brasil apresentaram menor quantidade de proteínas na segunda fração, sendo observadas cerca de seis bandas. A maior parte das proteínas apresentaram peso molecular de 14 a 31 kDa, no entanto, nas duas idades e nos dois tecidos, observou-se uma banda de peso aproximado de 66 kDa, porém de baixa intensidade, sendo esta mais intensa nos eixos embrionários de sementes com 45 DAA que foram secas.

De maneira geral, a secagem não modificou o padrão de bandas, no entanto o armazenamento diminuiu a intensidade dessas proteínas, com exceção da banda IIIB, que foi intensificada com o congelamento, principalmente no eixo embrionário.

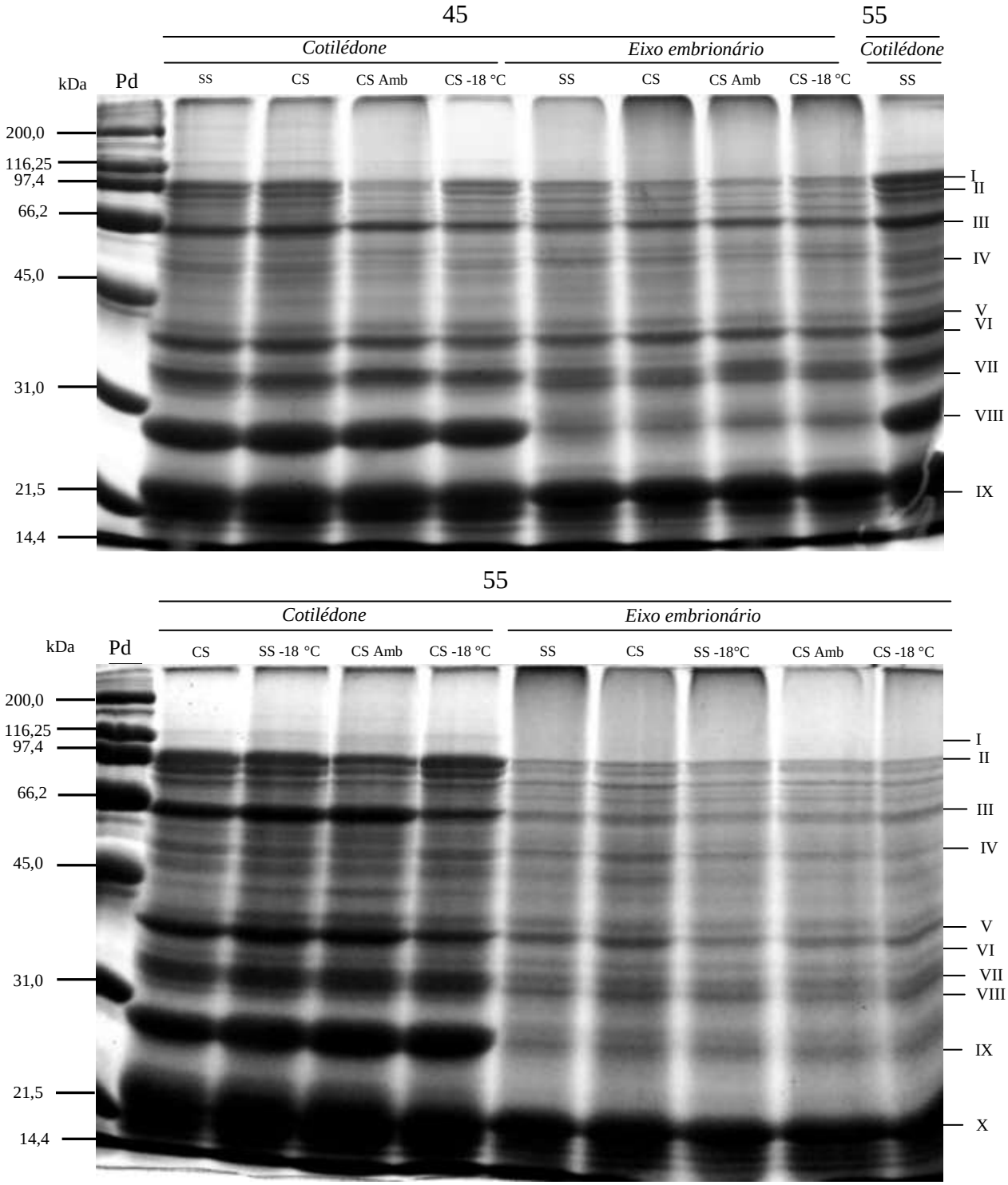


Figura 2. Perfil proteico das frações globulina de eixos embrionários e cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA recém coletadas (SS), após secagem (CS) e armazenadas a 22 e -18 °C.

A banda IIA (31 kDa) diminuiu de intensidade nos cotilédones quando as sementes com 45 DAA foram congeladas, assim como a banda III.

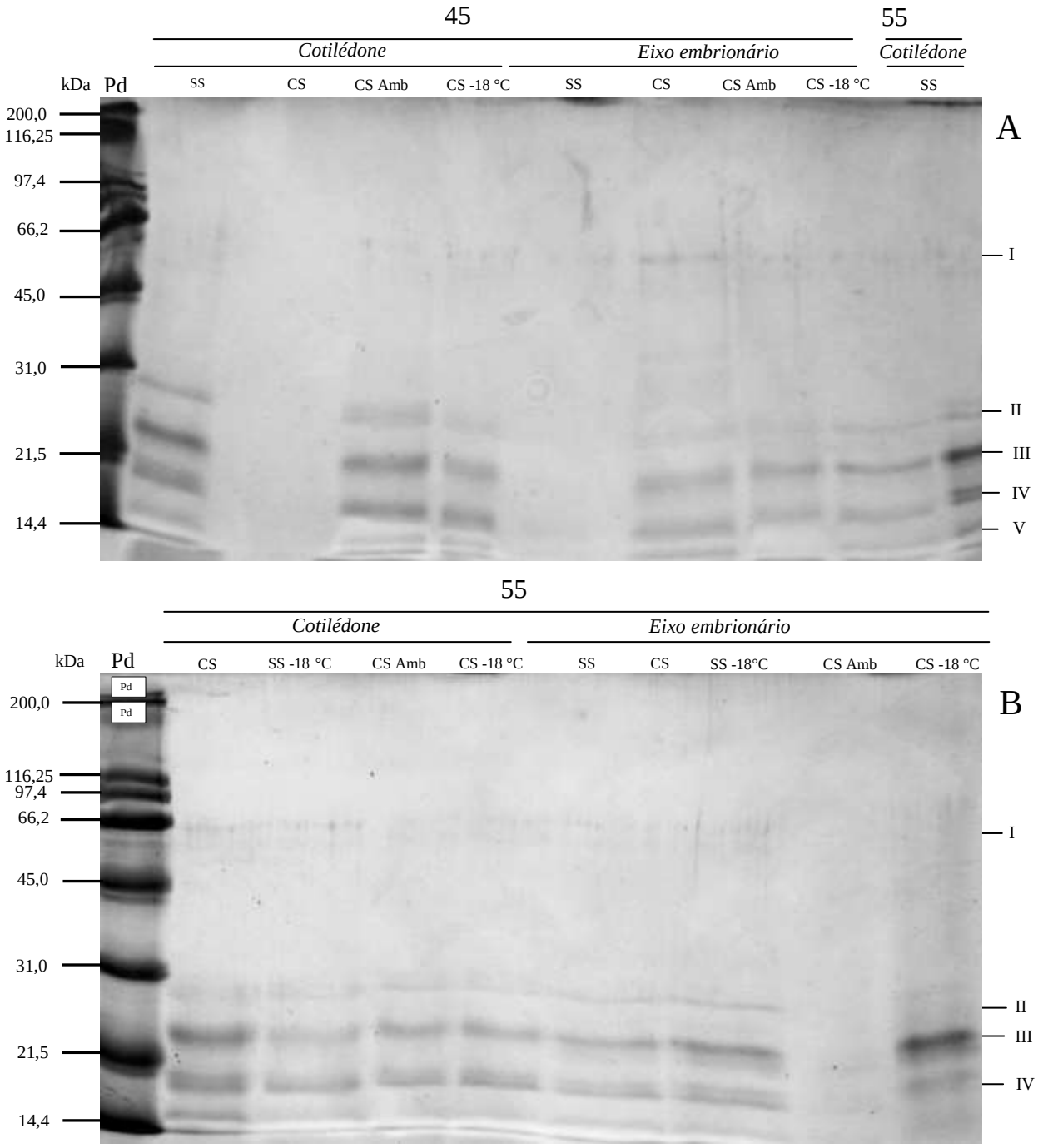


Figura 3. Perfil proteico da fração de prolaminas de eixos embrionários e cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA recém coletadas (SS), após secagem (CS) e armazenadas a 22 e -18 °C.

Discussão

Sementes de 45 e 55 DAA apresentaram porcentagens de germinação e desenvolvimento de plântulas estatisticamente iguais, no entanto essas sementes não toleraram a dessecação, principalmente as mais imaturas. Leduc *et al.* (2012) observaram que sementes com 45 DAA, após secagem apresentaram 28% de germinação e as com 55 DAA, 100%. No entanto, as sementes utilizadas pelos autores eram procedentes de Mogi-Guaçu (SP), onde a maturação das sementes se estende por cerca de 65 dias (Borges *et al.* 2005), enquanto que as sementes do presente estudo foram coletadas em Jaú (SP), onde a fase de maturação é antecipada, em média, por 10 dias (dados não mostrados). Desta forma, as sementes recém-dispersas utilizadas no presente trabalho não podem ser comparadas às maduras do trabalho de Leduc *et al.* (2012).

Nota-se que as sementes utilizadas neste trabalho não apresentavam excelente qualidade, uma vez que não foram obtidos 100% de germinação no lote maduro e a secagem foi prejudicial. Sementes de pau-brasil são armazenadas de forma mais adequada quando submetidas à secagem até 8-10% do teor de água e congeladas a -18 °C, tolerando mais de dois anos nessas condições, com elevada qualidade fisiológica (Hellmann *et al.* 2008), desde que sejam utilizadas sementes com máxima qualidade inicial.

Embora baixa, a germinação das sementes recém-dispersas secas armazenadas a -18 °C foi igual a inicial e superior àquelas armazenadas a 22 °C, o que confirma que o congelamento é importante para a manutenção da viabilidade das sementes de pau-brasil. Uma vez que as sementes com 55 DAA não apresentaram resultados satisfatórios em relação à secagem, os obtidos para as sementes de 45 DAA foram plenamente justificados.

As sementes recém-dispersas apresentaram teores de carboidratos solúveis superiores às imaturas, uma vez que estas ainda não haviam completado o período de maturação. No entanto, a quantificação destes compostos, em sementes com 45 DAA foi similar ao encontrado em sementes maduras de pau-brasil, segundo dados obtidos por Mello *et al.* (2011). Esses autores verificaram, ainda, que a secagem das sementes não modificou os teores de carboidratos solúveis, assim como observado para eixos

embrionários e cotilédones de sementes recém-dispersas do presente estudo. Por outro lado, o armazenamento ocasionou redução destes compostos, fato também observado por Mello *et al.* (2011) para sementes de pau-brasil com o menor nível de hidratação. O armazenamento igualmente reduziu os teores de açúcares redutores nos eixos embrionários

Estresses ambientais ocasionam aumento de carboidratos solúveis, servindo estes como estabilizantes de componentes celulares (Hincha *et al.* 2006), além de atuarem como osmoprotetores, auxiliando na formação do estado vítrio (Crowe *et al.* 1998). As sementes de pau-brasil não apresentaram incremento destes carboidratos em função dos tratamentos empregados, no entanto, estas apresentaram quantidade superior ao reportado para a espécie, tanto para as sementes imaturas, quanto para as recém-dispersas (Borges *et al.* 2005, Mello *et al.* 2010, Leduc *et al.* 2012).

Somente a presença de grandes quantidades de carboidratos solúveis não conferiu qualidade fisiológica às sementes de pau-brasil, sendo que os tratamentos com os melhores resultados de germinação figuraram entre os que apresentaram os menores teores de carboidratos solúveis. Da mesma forma, as alterações observadas nos teores de amido aparentemente não foram relacionadas com a qualidade das sementes, sendo encontrados valores discrepantes deste polissacarídeo entre os melhores resultados de germinação.

Dentre os açúcares relacionados com a tolerância à dessecação e a baixas temperaturas destacam-se os ciclitóis galactosilados, a sacarose e os oligossacarídeos da série da rafinose (Pammenter & Berjak 1999). As sementes de pau-brasil apresentaram grandes quantidades dos dois primeiros e apenas traços de OSR, confirmando trabalhos anteriores (Mello *et al.* 2010, 2011, Leduc *et al.* 2012). A secagem aparentemente afetou o metabolismo de OSR, ora aumentando, ora diminuindo seus teores, sem, contudo estarem relacionados isoladamente com a capacidade de tolerar a dessecação e consequentemente, contribuir para a manutenção da viabilidade das sementes após o armazenamento.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que apenas a quantidade de carboidratos solúveis não poderia promover a tolerância à dessecação, podendo até mesmo ser associada ao baixo vigor apresentado pelas sementes estudadas. Em sementes de *Ulmus parvifolia*, Kim *et al.* (2011) verificaram que o envelhecimento artificial, realizado para simular os efeitos do armazenamento prolongado, ocasionou aumento de amido e açúcares totais solúveis e estes foram associados à redução do

vigor destas sementes, o que também poderia estar acontecendo com as sementes de pau-brasil.

Em leguminosas, as globulinas representam a maior parcela das proteínas de reserva (Derbyshire *et al.* 1976), no entanto, a maior proporção de proteínas encontradas nas sementes de pau-brasil foram as prolaminas, fato interessante, uma vez que esta fração já foi relatada como sendo exclusiva de cereais e gramíneas (Shewry *et al.* 1995).

Embora a quantificação de prolamina tenha sido superior à de globulina, o perfil proteico desta última fração foi mais rico em diversidade de proteínas. Em função da secagem e do armazenamento, as sementes com 45 e 55 DAA não apresentaram grandes mudanças no perfil proteico de globulina, contudo, nos eixos embrionários de sementes com 55 DAA, após secagem e congelamento, uma proteína de aproximadamente 22 kDa se destacou. Vale destacar que neste tratamento foi obtido o melhor resultado da germinação, com exceção do tempo inicial.

Uma proteína de peso molecular próximo a 66 kDa também foi observada em sementes secas de pau-brasil, na fração prolamina, além de diversas bandas próximas a este peso molecular. Praxedes-Garcia *et al.* (2012) isolaram uma serina protease em sementes de pau-brasil, que possivelmente atua na mobilização de proteínas de reserva durante a germinação. Possivelmente esta seja uma das proteínas observadas no perfil proteico de *C. echinata* do presente estudo.

Estudando *Brassica napus*, Downing *et al.* (1992) observaram o acúmulo de uma proteína de peso molecular de 22 kDa em folhas adaptadas à seca e constataram ainda que seus transcritos foram induzidos pelo tratamento com ABA. Embora não seja possível afirmar que a proteína observada na fração prolamina seja a mesma do estudo de Downing e colaboradores, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que uma proteína de peso molecular similar a esta esteja relacionada à dessecação e ao congelamento, uma vez que só foi observada quando as sementes maduras foram secas e armazenadas a -18 °C.

A tolerância à dessecação é provavelmente controlada pela interação de mecanismos e processos, e não pela uma ação isolada de uma substância (Franchi *et al.* 2011). Carboidratos, proteínas, lipídios e outros compostos juntos contribuem para determinar as respostas das sementes frente às adversidades, iniciando esses processos ainda durante a maturação, quando as sementes estão sendo formadas. Deve-se lembrar que as condições ambientais nas quais as sementes estão se formando podem influenciar o tempo de maturação, as reservas depositadas e, portanto, a qualidade das sementes. O

eventual sucesso do armazenamento depende, inicialmente, da qualidade das sementes utilizadas, uma vez que este serve para atrasar o processo natural de deterioração das mesmas, não sendo possível incrementar a qualidade destas.

Referências bibliográficas

Amaral, L. I. V., Gaspar, M., Costa, P. M. F., Aidar, M. P. M. & Buckeridge, M. S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. Hoehnea 34: 425-431.

Arora, R. & Wisniewski, M. E. 1994. Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch.). II. A 40-kilodalton bark protein in cold-acclimated tissues of peach is heat stable and related to the dehydrin family of proteins. Plant Physiology 105: 95-101.

Borges, I. F., Barbedo, C. J., Richter, A. A. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2006. Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae). Brazilian Journal of Plant Physiology 18: 475-482.

Borges, I. F., Giudice Neto, J. D., Bilia, D. A. C., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. & Barbedo, C. J. 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. Brazilian Archives of Biology and Technology 48: 851-861.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Bruni, F. & Leopold A.C. 1991. Glass transitions in soybean seed, relevance to anhydrous biology. Plant Physiology 96: 660-663.

Buckeridge, M.D., Aidar, M.P.M., Santos, H.P. & Tiné, M.A.S. 2004. Acúmulo de reservas. *In*: A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed, pp. 31-50.

Carvalho, E.M. & Nakagawa, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ª ed. Ed. Funep, Jaboticabal. 424p.

Crowe, J. H., Carpenter, J. F. & Crowe, L. M. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. Annual Review of Physiology 60: 73-103.

De Castro, R. D, Bradford, K. J. & Hilhorst, H. W. M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In:* A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed, pp. 51-67.

Derbyshire, E., Wright, D. J. & Boulter, D. 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry 15: 3-24.

Dionne, J., Castonguay, Y., Nadeau, P. & Desjardins, Y. 2001. Freezing tolerance and carbohydrate changes during cold acclimation of green-type annual bluegrass (*Poa annua* L.) ecotypes. Crop Science 41: 443-451.

Downing, W. L., Mauxion, F., Fauvarque, M.-O., Reviron, M.-P., Vienne, D., Vartanian, N. & Giraudat, J. 1992. A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Künitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. The Plant Journal 2: 685-693.

Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-355.

Franchi, G. G., Piotto, B., Nepi, M., Baskin, C. C., Baskin, J. M. & Pacini, E. 2011. Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal, and survival. Journal of Experimental Botany 62: 5267-5281.

Harris, G. C, Valerie, A., Cahn, M., Nevidomskyte, D. & Königer, M. 2006. Seasonal changes in photosynthesis, protein composition and mineral content in Rhododendron leaves. Plant Science 170: 314-325.

Hellmann, M. E., Mello, J. I. O., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Barbedo, C.J. 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. Revista Brasileira de Botânica 29: 93-101.

Hincha, D. R., Popova, A. V. & Cacela, A. 2006. Effects of sugars in the stability of lipids membranes during drying. *In:* Advances in Plant Lipid Bilayers and Liposomes (Ed. L. A. Leitmannova), vol. 3, Elservier, Amsterdam. pp. 189-217.

Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. & Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends in Plant Science 6: 431-438.

Hundertmark, M., Buitink, J., Leprince, O. & Hincha, D. K. 2011. The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. Seed Science Research 21: 165-173.

ISTA. 1985. International rules for seed testing. Seed Science and Technology 13: 356-513.

Kermode, A. R. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. Critical Reviews in Plant Sciences 9: 155-195.

Kim, D. H., Han, S. H. & Song, J. H. 2011. Evaluation of the inorganic compound leakage and carbohydrates as indicator of physiological potential of *Ulmus parvifolia* seeds. New Forests 41: 3-11.

Koster, K.L. & Leopold, A.C. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiology 88: 829-832.

Kuo, T. M., Van Middlesworrth, J. F. & Wolf, W. J. 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 36: 32-36.

Leduc, S. N. M., Silva, J. P. N., Gaspar, M., Barbedo, C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2012. Non-structural carbohydrates of immature seeds of *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) are involved in the induction of desiccation tolerance. Australian Journal of Botany 60: 42–48.

Lin, T. P. & Huang, N. H. 1994. The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. Journal of Experimental Botany 278: 1289-1294.

Marcos Filho, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq.

Mello J. I. O. & Barbedo C. J. 2007. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae – Caesalpinioideae). Revista Árvore 31: 645-655.

Mello, J. I. O., Barbedo, C. J., Salatino, A. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2010. Reserve carbohydrates and lipids from seeds of four tropical tree species with different sensivity to desiccation. Brazilian Archives of Biology and Technology 53:889-899.

Mello, J. I. O., Centeno, D. C., Barbedo, C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2011. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. Seed Science & Technology 39: 465-480.

Obendorf, R. L. 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. Seed Science Research 7: 63-74.

Pammenter, N. W. & Berjak, P. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. Seed Science Research 9: 13-37.

Peterbauer, T. & Richter, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. Seed Science Research 11: 185-197.

Praxedes-Garcia, P., Cruz-Silva, I., Gozzo, A. J., Nunes, V. A., Torquato, R. J., Tanaka, A. S., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Gonzalez, Y. G. & Araújo, M. S. 2012. Biochemical aspects of a serine protease from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) seeds: a potential tool to access the mobilization of seed storage proteins. The Scientific World Journal Volume 2012, Article ID 562715, 8 pages-doi: 10.1100/2012/562715).

Renaut, J. Hoffmann, L. & Hausman, J. -F. 2005. Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing in poplar plantlets. Physiologia Plantarum 125: 82-94.

Shewry, P. R., Napier, J. A. & Tatham, A. S. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. The Plant Cell 7: 945-956.

Vilella, F. A. & Peres, W. B. 2004. Coleta, beneficiamento e armazenamento. *In:* A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed, pp.265-282.

Williams, R.J. & Leopold, A.C. 1989. The glassy state in corn embryos. Plant Physiology 89: 977-981.

Capítulo III - Ácido abscísico em sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa* submetidas à dessecação e armazenamento

Resumo

Compostos como oligossacarídeos da série da rafinose (OSR), ciclitóis galactosilados, proteínas *LEA* e ácido abscísico (ABA) são acumulados durante o processo de maturação de sementes. Estes compostos vêm sendo relacionados com a tolerância das sementes aos estresses térmico e hídrico e seus teores variam ao longo do desenvolvimento das sementes. Sementes de *Caesalpinia echinata* são ortodoxas, apresentando tolerância à dessecação a partir de 45 dias após a antese (DAA), porém perdem a capacidade germinativa se armazenadas em temperatura ambiente, sendo sua viabilidade mantida se armazenadas em temperaturas sub-zero após redução do teor de água. Estas sementes contêm pequena quantidade de OSR e ciclitóis galactosilados e elevada porcentagem de sacarose. Por outro lado, sementes de *Erythrina speciosa*, também ortodoxas, apresentam quantidades maiores de OSR e sacarose, podendo ser armazenadas em temperatura ambiente por vários anos, sem perder e viabilidade e o vigor. No presente trabalho, sementes de *Erythrina speciosa* foram agrupadas visualmente em seis estádios de maturação e já no 3° estádio estas apresentavam alta capacidade germinativa e eram parcialmente tolerantes à dessecação. Os teores de ABA nas sementes imaturas foram até três vezes maiores do que nas maduras, sendo que a maior quantidade desse hormônio foi encontrada nos cotilédones. A secagem e o armazenamento aumentaram os níveis de ABA nas sementes imaturas, principalmente nas sementes armazenadas que perderam a viabilidade. Nas sementes de pau-brasil, os níveis de ABA foram maiores do que os encontrados em sementes maduras de eritrina e da mesma forma, a secagem ocasionou aumento de ABA, porém apenas nos cotilédones. Com o armazenamento, os cotilédones secos apresentaram teor deste hormônio similar ao encontrado inicialmente. Os dados obtidos até o momento não permitem afirmar se as alterações encontradas nos teores de carboidratos e ABA são decorrentes do processo de tolerância à dessecação ou se são responsáveis pelo comportamento de tolerância das sementes estudadas, uma vez que a tolerância à dessecação e a capacidade de armazenamento das sementes não são garantidas apenas pela presença de um ou outro composto, mas sim pela ação conjunta de dois ou mais

fatores. Estudos mais detalhados, em nível molecular poderão auxiliar futuramente na compreensão dos mecanismos de ação destes compostos.

Abstract

Compounds like the raffinose family oligosaccharides (RFO), galactosyl cyclitols, *LEA* proteins and abscisic acid (ABA) are accumulated during seed maturation. These compounds have been associated with seed tolerance, temperature and water stresses, and their levels vary throughout the development of seeds. *Caesalpinia echinata* seeds are ortodox, presenting desiccation tolerance since 45 days after anthesis (DAA), however they lose their germinability if stored at room temperature, remaining viable only when stored at sub-zero temperature after reduction of moisture content. Those seeds have low RFO and galactosyl cyclitols amounts but high proportion of sucrose. On the other hand, seeds of *Erythrina speciosa*, also orthodox, have larger amounts of sucrose and RFO, and may be stored at room temperature for several years, without losing viability. In this study, seeds of *Erythrina speciosa* were visually grouped into six maturity stages; at the 3rd stage they had already high germination capacity and were partially tolerant to desiccation. The ABA content in immature seeds was up to three times higher than in mature seeds, and the highest amount of this hormone was found in the cotyledons. Drought and storage increased ABA levels in immature seeds, mainly in seeds that lost the viability during storage. Seeds of brazilwood present ABA levels higher than those found in seeds of eritrina, and for this species, drying also resulted in an increase of ABA levels, only in the cotyledons. When stored at room temperature, dried cotyledons showed ABA levels similar to those found before treatment. The data obtained until now do not allow us to confirm whether the changes found in carbohydrates and ABA are involved in the process of desiccation tolerance or are responsible for the tolerance behavior of the studied seeds.

Introdução

Durante o processo de maturação, as sementes acumulam compostos como oligossacarídeos da série da rafinose (OSR), ciclitóis galactosilados, proteínas LEA e ácido abscísico. Estes compostos, além de servirem como fonte de energia e carbono e modularem a germinação, promovem tolerância a estresses como a dessecação (Pammenter & Berjak 1999, Peterbauer & Richter 2001, Hundertmark *et al.* 2011).

No entanto, os teores destes compostos apresentam oscilações durante o desenvolvimento das sementes. Quanto aos OSR, Rangel-Fajardo *et al.* (2011) observaram que durante a maturação de sementes de cacau, os maiores níveis de estaquiose foram encontrados aos 5 e 6 meses após a floração, diminuindo no final do desenvolvimento. Já a rafinose apresentou um pico aos 6 meses e a sacarose aos 5 meses.

Além dos carboidratos, pode haver o acúmulo de proteínas da família *LEA* (*Late embryogenesis abundant*), que receberam esse nome por de serem depositadas tardiamente durante o processo de maturação. Essas proteínas são conhecidas por agirem como estabilizadoras de proteínas, protetoras de membranas, tampões hidratantes, antioxidantes e quelantes de íons (Tunnacliffe & Wise 2007, Battaglia *et al.* 2008), protegendo, portanto, as sementes de estresses hídricos e auxiliando na manutenção da longevidade (Chatelain *et al.* 2012).

O ácido abscísico (ABA) é um regulador de desenvolvimento que também tem importante papel nas respostas a estresses ambientais em plantas e sementes, como a seca, o frio e a alta salinidade. Em sementes ortodoxas, os níveis de ABA começam a aumentar no final da fase de histodiferenciação, sendo os teores máximos atingidos ao longo da fase de maturação, quando os compostos de reserva são acumulados, e posteriormente, decaem ao final do desenvolvimento, durante a fase de dessecação (Blöchl *et al.* 2005). Além do papel na proteção contra estresses, o ABA está envolvido em processos como a dormência das sementes, germinação e senescência (Seiler *et al.* 2011).

Sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil, Leguminosae) são tolerantes à dessecação e podem ser armazenadas por mais de 2 anos, com teor de água próximo a 8% e temperatura de -18 ºC. O tempo de maturação de suas sementes é de cerca de 65 dias, mas aos 55 dias já apresentam máxima germinação e tolerância à dessecação (Barbedo *et al.* 2002, Borges *et al.* 2005, Hellmann *et al.* 2006).

Cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* apresentam cerca de 15% de carboidratos solúveis em sua composição, sendo a sacarose e os ciclitóis galactosilados os açúcares majoritários, além de grande quantidade de amido (Mello *et al.* 2010, 2011). A quantificação de ABA durante a maturação de sementes de *C. echinata* ainda permanece inconclusiva, embora Silva (2010) tenha analisado este hormônio em sementes dessa espécie em diferentes estágios do desenvolvimento.

Outra leguminosa que apresenta sementes ortodoxas é *Erythrina speciosa*. Não foram encontrados na literatura estudos sobre a maturação de sementes dessa espécie, no entanto, para *Erythrina crista-galli* a maturação completa ocorre em 70 dias (Lazarotto *et al.* 2011). Sementes de *E. speciosa* apresentam apenas traços de amido, no entanto, seus eixos embrionários contêm cerca de 30% de carboidratos solúveis e seus cotilédones, 16%, sendo que os açúcares predominantes são os oligossacarídeos da série da rafinose (Mello *et al.* 2010, 2011).

As duas espécies foram estudadas quanto a composição de carboidratos de reserva e lipídios (Mello *et al.* 2010, Mello *et al.* 2011), além de lecitinas em *E. speciosa* (Konozy *et al.* 2003). No entanto, a relação entre o conteúdo de ABA e a tolerância à dessecação e ao congelamento nestas espécies ainda não foi investigada.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar os teores de ABA em sementes imaturas e maduras das duas espécies, secas e armazenadas, visando associar a composição bioquímica destas com a tolerância à dessecação e a longevidade. Adicionalmente, as sementes de eritrina foram avaliadas visando determinar o momento de aquisição da tolerância à dessecação durante o processo de maturação, tendo em vista que o processo de tolerância de sementes de pau-brasil durante o desenvolvimento já foi caracterizado.

Material e Métodos

Erythrina speciosa

Frutos de *Erythrina speciosa* Andrews em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados de cerca de 10 matrizes existentes ao longo da Avenida dos Bandeirantes, no município de São Paulo (SP) no mês de outubro de 2009.

Frutos com diferentes colorações foram coletados e levados ao laboratório, onde foram separados manualmente de acordo com as características visuais. Após abertura dos frutos, as sementes também foram agrupadas de acordo com características físicas, a fim de serem classificadas por estádios de maturação.

Cada estádio de maturação constituiu um lote, que foi analisado quanto ao teor de água, potencial hídrico, massas seca e fresca, além da porcentagem de germinação, conforme descrito adiante.

Sementes imaturas de *E. speciosa* foram submetidas à secagem artificial em estufa (40 °C) para redução do teor de água até 10%, valor próximo ao encontrado em sementes da espécie no momento da dispersão. Após dessecação, foram realizados testes para caracterização fisiológica como especificados adiante.

De posse do teor de água inicial do lote de sementes e calculado o valor de matéria seca deste, por diferença de peso, monitorou-se a perda de peso das amostras, estimando o peso que estas deveriam atingir para se obter o teor de água desejado. Uma vez que a matéria seca não é alterada, a diferença de peso no decorrer da secagem é resultado da perda de água das amostras. O peso estimado para atingir determinado teor de água foi calculado por meio da fórmula de Hong & Ellis (1996).

Para averiguar a partir de que estádio de maturação as sementes de eritrina são tolerantes à dessecação, sementes nos diferentes estágios de maturação foram escolhidas após os resultados iniciais de germinação e estas foram submetidas à dessecação até 8-10% de água. As sementes secas foram então novamente analisadas quanto ao potencial hídrico, teor de água e germinação.

Após a obtenção dos resultados de germinação das sementes dessecadas que apresentaram tolerância média, com redução de cerca de 20% de germinação, estas foram submetidas ao pré-condicionamento osmótico. Para tanto, foram utilizadas soluções de polietileno glicol (PEG) 6000, com três potenciais hídricos distintos e

inferiores aos das sementes (-1,5; -2,0; -2,5 MPa), conforme fórmula de Michel & Kaufman (1973), por 24 ou 48 horas de incubação para produzir secagem lenta, num esquema fatorial 3X2 (potencial hídrico da solução X tempo de incubação). Após incubação, as sementes foram submetidas à secagem em estufa, conforme realizado anteriormente. Este teste foi planejado com a finalidade de verificar se o pré-condicionamento otimizaria a secagem de sementes imaturas.

Caesalpinia echinata

Com base nas informações de Borges *et al.* (2005), frutos com aproximadamente 55 DAA de *C. echinata* foram coletados de cerca de 50 matrizes localizadas em propriedade privada no município de Jaú/SP, em 2010. Após abertura manual dos frutos, as sementes foram separadas em lotes, sendo um para avaliação do tempo zero e outro para armazenamento em temperatura ambiente (22 °C) por 30 dias. Outro lote foi seco em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C até atingir teor de água próximo a 8%, sendo armazenado em temperatura ambiente por 30 dias.

Após cada tratamento, as sementes foram avaliadas quanto ao teor de água, capacidade germinativa e teor de ácido abscísico, conforme descrito a seguir.

Germinação e teor de água

Amostras das duas espécies espécie foram avaliadas quanto à germinabilidade, sendo feitas semeaduras em rolo de papel saturado com água (Mello & Barbedo 2007), com quatro repetições de 15 sementes. Os testes de germinação foram realizados em germinadores Marconi MA400 com circulação interna de água (que mantém a umidade relativa interna da câmara em, aproximadamente, 100%), a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Sementes de *E. speciosa* nos últimos estádios de maturação foram escarificados manualmente com auxílio de um bisturi, na região contrária ao hilo. As avaliações foram feitas a cada três dias, registrando-se os números de sementes que emitiram raiz primária (maior que 2 mm) e de plântulas com desenvolvimento normal da parte aérea e radicular. Com esses dados foram calculados o índice de velocidade de germinação, tempo médio e variação do tempo médio de germinação.

O teor de água inicial foi determinado segundo procedimento recomendado pelas regras internacionais (ISTA 1985), em estufa com circulação interna de ar, por 17 horas a 103 °C. O potencial hídrico das sementes foi medido por equipamento Decagon WP4 (USA) com base na temperatura do ponto de orvalho (Decagon Devices 2001), sendo as sementes cortadas ao meio no sentido longitudinal. Ambos os testes foram realizados com quatro repetições de cinco sementes cada.

Extração de ABA

As sementes recém-coletadas de *E. speciosa* (imaturas – estádio 4 e maduras – estádio 6), sementes imaturas secas até 8% de água e sementes imaturas com teor de água inicial armazenadas a -18 °C por 30 dias foram analisadas quanto aos teores de ABA. Sementes recém-dispersas, provenientes de propriedade privada de Jaú (SP), coletadas em 2009, foram analisadas quanto aos teores de ABA logo após coleta e após secagem até 8% e após armazenamento em temperatura ambiente por 30 dias.

A extração de ácido abscísico foi realizada conforme López-Ráez *et al.* (2010), com pequenas modificações, no laboratório de Fisiologia de Plantas, da Universidade de Wageningen, Holanda, sob a supervisão do Dr Henk Hilhorst. Foram utilizadas três repetições de 50 mg de matéria seca de sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*. As amostras foram adicionadas de 1 mL de metanol, sendo então colocadas em banho ultrassônico por 15 min, seguido de agitação em câmara fria por 30 min. Após agitação, as amostras foram centrifugadas por 10 min e o sobrenadante coletado em frasco de vidro. Ao resíduo foi adicionado 1 mL de metanol, seguido de agitação em câmara fria, por 2 horas. Ao final da extração, as amostras foram novamente centrifugadas e os sobrenadantes reunidos. Estes foram secos em centrífuga a vácuo sendo a seguir adicionados 50 µL de metanol e 3 mL de água deionizada. A purificação das amostras foi realizada em colunas C18 pré-condicionadas com 25 µL de metanol e 1,5 mL de água deionizada. Ao término da filtragem das amostras, foi adicionado 1 mL de metanol às colunas, sendo o filtrado coletado e evaporado até secura. Adicionou-se 200 µL de uma solução de acetonitrila:água deionizada:ácido fórmico (25:75:0,1%) para re-solubilização do ABA e então as amostras foram filtradas em filtros microssatélite tipo Minisart SRP4 (Santorius, USA) de 0,2 µm, sendo armazenadas em frascos plásticos a -18 °C para análises por LC-MS.

Quantificação de ABA

As análises foram realizadas utilizando-se espectrômetro de massas Waters Micromasss Quattro Premier XE (Waters, Milford, MA, USA), equipado com uma fonte de "electrospray" ionizante e acoplado a um sistema Acquity UPLC (Waters). A separação cromatográfica foi realizada usando coluna UPLC BEH C_{18} (150 x 2,1 mm, 1,7 µm) (Waters), aplicando-se um gradiente de acetonitrila-água, iniciando com 0% de acetonitrila por 2 min, aumentando para 50% de acetonitrila (v: v) em 8 min, seguido por um gradiente de acetonitrila (v:v) 90% por 0,1 min e seguido por gradiente de acetonitrila 0% por 0,2 min antes de iniciar a corrida seguinte. A coluna foi então equilibrada com essa combinação de solventes por 2,8 min. O tempo total de corrida foi de 10 min. A coluna foi operada a 50 °C com fluxo de 0,4 mL min^{-1} e o volume de amostra injetada foi de 20 µL. O espectrômetro de massas foi operado em modo ESI positivo. Os fluxos de gás de nebulização e de-solvatação foram 50 e 800 L h^{-1}, respectivamente. A voltagem do capilar foi de 2,7 kV, a do cone foi 10 V, a temperatura da fonte foi de 120 °C e a temperatura do gás de de-sovatação foi 450 °C. A fragmentação foi realizada pela dissociação induzida de colisão com argônio a 3,0 x 10^{-3} mbar. Monitoração de múltipla reação foi usada para quantificação de ABA. Transições "parents-daughter" foram realizadas de acordo com espectro MS/MS obtido pelos padrões internos ABA e [$_2H^6$]-ABA. As transições foram selecionadas baseadas na mais abundante e específica fragmentação de íons para o qual a energia de colisão foi otimizada. O ácido abscísico foi quantificado usando a curva de calibração com quantidades conhecidas de padrões e baseado na razão da área somada de transição de múltipla reação monitorada para ABA para [$_2H^6$]-ABA. A aquisição de dados e análises foram realizadas usando software Masslynx (Waters).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de 12 sementes para os testes de germinação e 4 repetições de 5 sementes para avaliação do teor de água e 3 repetições para as análises bioquímicas. Os resultados foram submetidos à análise de variância empregando-se o teste F em nível de 5%.

Resultados

Erythrina speciosa

Apenas a coloração dos frutos de *E. speciosa* não foi suficiente para separar sementes com diferentes graus de maturação, uma vez que foram encontradas sementes com até três estádios distintos de desenvolvimento em um mesmo fruto (em frutos castanhos, por exemplo). As sementes obtidas foram separadas em seis categorias, com base em informações visuais: verdes miúdas, verdes graúdas, verdes com poucas manchas castanhas, verdes com muitas manchas castanhas, castanhas úmidas e castanhas secas (Figura 1).

Sendo assim, foram nomeados os estádios de maturação de 1 a 6, de acordo com a cor ou o tamanho das sementes, sendo 1 o estádio mais imaturo e 6 o mais maduro, próximo ao ponto de dispersão. Dados da caracterização fisiológica das diferentes amostras encontram-se na tabela 1.

Variações no potencial hídrico só foram observadas a partir do 5º estádio de maturação, quando as sementes apresentaram redução do potencial hídrico de 24,5 vezes do 4º para o 5º estádio. Ao final da maturação, a diferença entre o potencial hídrico inicial e final foi de 33,2 vezes.

O teor de água não acompanhou o padrão estatístico observado para o potencial hídrico, sendo que do 1º estádio para o 2º já houve queda na quantidade de água das sementes. Os 3º e 4º estádios, assim como os estádios 5 e 6, não diferiram estatisticamente quanto ao teor de água.

Figura 1. Aspectos gerais das sementes de *Erythrina speciosa* em diferentes fases de maturação. (A) estádio 1 – verdes miúdas, (B) estádio 2 – verdes graúdas, (C) estádio 3 – verdes com poucas manchas castanhas, (D) estádio 4 – verdes com muitas manchas castanhas, (E) estádio 5 – castanhas úmidas e (F) estádio 6 – castnhas secas. Estádio 1 representa o estádio mais imaturo e estádio 6, o mais maduro.

Tabela 1. Potencial hídrico (- MPa), teor de água (%) e matérias fresca e seca (mg) de sementes de *Erythrina speciosa* coletadas em diferentes fases de maturação.

Estádio de maturação	ΨH_2O (-MPa)		Teor de água (%BU)		Massa fresca (mg)		Massa seca (mg)	
Band1	1,89	c	88,1	a	86	c	10	d
Band2	1,11	c	76,4	b	699	a	168	c
Band3	1,14	c	62,7	c	737	a	275	b
Band4	1,57	c	57,9	c	745	a	312	b
Band5	38,52	b	15,1	d	429	b	364	a
Band6	62,74	a	10,4	d	342	b	307	ab
c.v. (%)	17,84		5,19		13,48		14,85	

Letras minúsculas comparam as fases de maturação.

Houve incremento de 712% na quantidade de matéria fresca entre os estádio 1 e 2. No entanto do 2º ao 4º estádio, estes valores não diferiram (média de 727 mg

semente^{-1}). Os estádios 5 e 6 também não apresentaram diferença estatística para o parâmetro matéria fresca (média de 385,5 mg semente^{-1}) .

A massa seca diferiu em todos os estádios analisados, com exceção dos estádios 3 e 4, sendo que no geral houve variação de 10 a 364 mg semente^{-1}, com massa seca máxima atingida no 5º estádio de maturação.

Embora apresentassem características físicas distintas, as sementes dos estádios 3 e 4 não apresentaram diferença nas análises fisiológicas realizadas.

A figura 2 apresenta os resultados de germinação e desenvolvimento de plântulas de *Erythrina speciosa* nas diferentes fases de desenvolvimento.

Sementes dos estádios 1 e 2 apresentaram pouca ou nenhuma germinação, não diferindo estatisticamente. Dos estádios 3 a 6 a germinação foi superior a 90%, enquanto o desenvolvimento de plântulas foi superior a 80%, não apresentando diferença estatística entre os estádios.

A partir dos resultados obtidos, foram definidos os estádios das sementes a serem analisadas quanto à dessecação e congelamento, sendo selecionadas apenas sementes imaturas (estádio 4) e maduras (estádio 6) para a continuidade dos trabalhos.

Dessecação de sementes imaturas de *Erythrina speciosa*

Inicialmente as sementes de *E. speciosa* nos estádios 2, 3 e 4 foram submetidas à secagem em estufa até terem o teor de água reduzido a cerca de 10% de água, valor este similar ao encontrado nas sementes dispersas. Os valores de potencial hídrico e teor de água, antes e após a secagem encontram-se na figura 3.

Amostras de sementes nos três estádios de desenvolvimento foram colocadas para germinar antes e após a secagem e as porcentagens de germinação e desenvolvimento de plântulas são mostradas na figura 4. O estudo de tolerância à dessecação foi realizado com um novo lote de sementes, o que pode ser observado pela diferença nos resultados de germinação, principalmente das sementes dos estádios 2 e 3 (figuras 2 e 4). Sementes dos três estádios apresentaram diferença estatística na porcentagem de germinação tanto antes como após a secagem. Com a secagem, as sementes do estádio 2, que inicialmente apresentavam cerca de 30% de germinação, não

sobreviveram. No estádio 3 houve redução da porcentagem de germinação e no estádio 4 não houve diferença estatística com a dessecação até 10% de água.

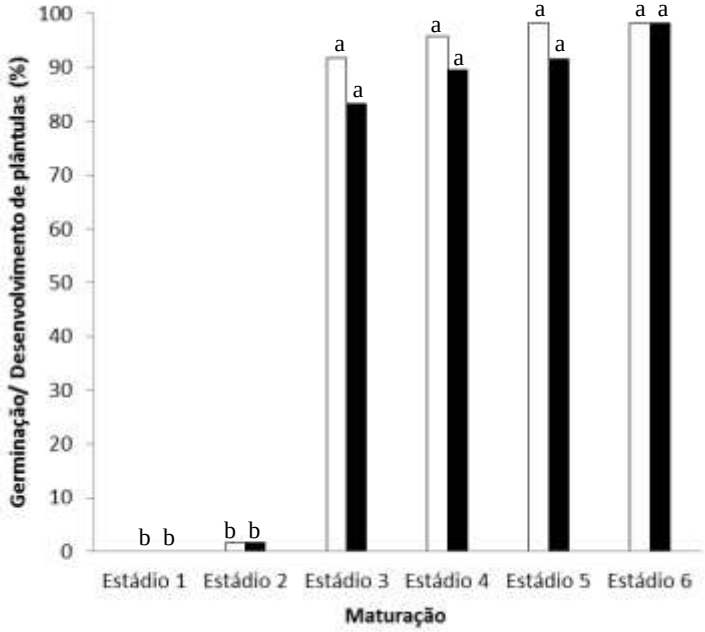


Figura 2. Germinação (%, barra branca) e desenvolvimento de plântulas (%, barra preta) de sementes de *Erythrina speciosa* em diferentes estádios de maturação. As letras minúsculas comparam as fases de maturação.

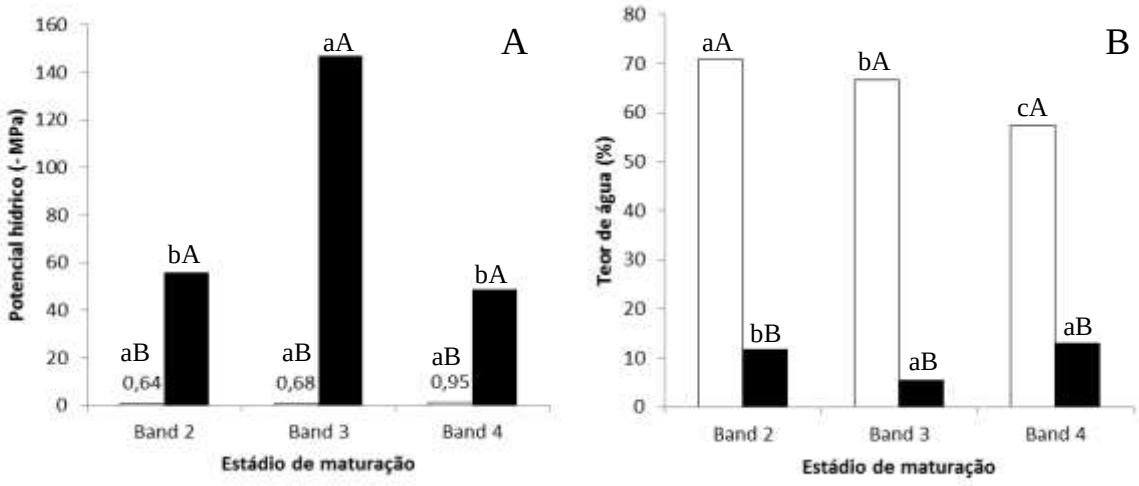


Figura 3. Potencial hídrico (*A*) e teor de água (*B*) de sementes de *Erythrina speciosa* submetidas (barra preta) ou não a secagem (barra branca) artificial em estufa. Letras minúsculas comparam idade, maiúsculas tratamento de secagem.

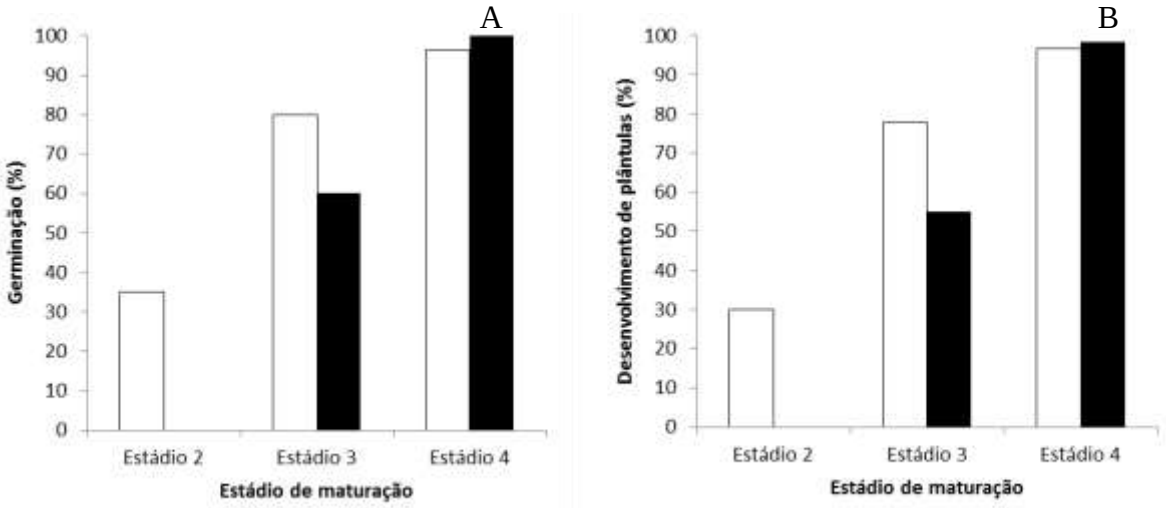


Figura 4. Germinação (*A*) e desenvolvimento de plântulas (*B*) de sementes de *Erythrina speciosa* submetidas (barra preta) ou não a secagem (barra branca) artificial em estufa. Letras minúsculas comparam idade, maiúsculas tratamento de secagem.

De maneira semelhante, o desenvolvimento de plântulas foi reduzido nos estádios 2 e 3 e não se alterou no estádio 4, demonstrando que nesta fase, as sementes de *E. speciosa* já são totalmente tolerantes à dessecação.

Estresse osmótico em sementes de *Erythrina speciosa*

Uma vez que as sementes do estádio 3 se apresentaram parcialmente tolerantes à dessecação, estas foram submetidas a um pré-condicionamento osmótico com polietileno glicol (PEG) 6000, em três diferentes potenciais hídricos (-1,5; -2,0; -2,5 MPa) por 24 e 48 h, sendo posteriormente submetidas à dessecação em estufa até 10% de água.

Na figura 6 estão mostrados os potenciais hídricos (A) e teores de água (B) após 24 e 48 h de incubação em PEG. Em nenhuma avaliação realizada houve interação entre os fatores potencial hídrico da solução e tempo de incubação.

O potencial hídrico (Figura 5) de -1,5 MPa foi o único que propiciou aumento do teor de água das sementes no estádio 3, assim como foi o único que diminuiu o

potencial hídrico das mesmas, embora pela análise estatística não tenham apresentado diferença significativa.

A germinação das sementes do estádio 3 sem secagem era de 80%, sendo que após a secagem em estufa, este valor foi reduzido para 60%, como visto anteriormente. Com o pré-tratamento em PEG, seguido da secagem em estufa, esses valores variaram de 60 a 70% (Figura 6) nos diferentes tratamentos, não diferindo estatisticamente entre si.

No entanto, para sementes de *E. speciosa* o osmocondicionamento foi indiferente, permanecendo as porcentagens de germinação e de desenvolvimento de plântulas similares às obtidas anteriormente.

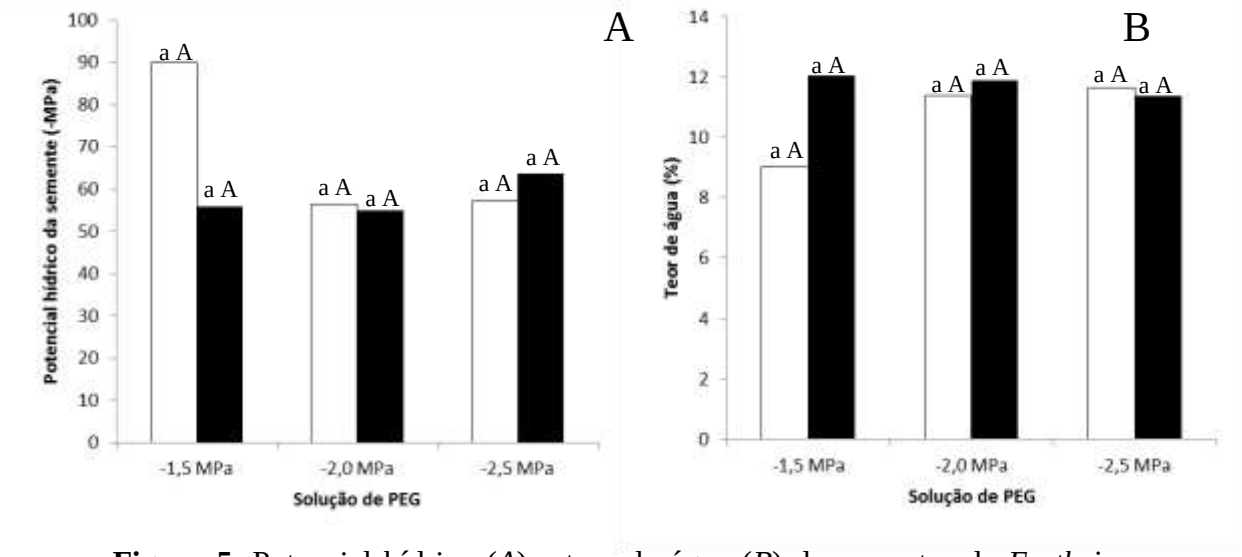


Figura 5. Potencial hídrico (*A*) e teor de água (*B*) de sementes de *Erythrina speciosa* osmocondicionadas em solução de polietileno glicol (PEG) em diferentes concentrações, por 24 (barra branca) ou 48 horas (barra preta) e posterior redução do teor de água até valores próximos aos encontrados em sementes maduras (±10%). Letras minúsculas comparam potencial hídrico das soluções, maiúsculas comparam tempo de incubação.

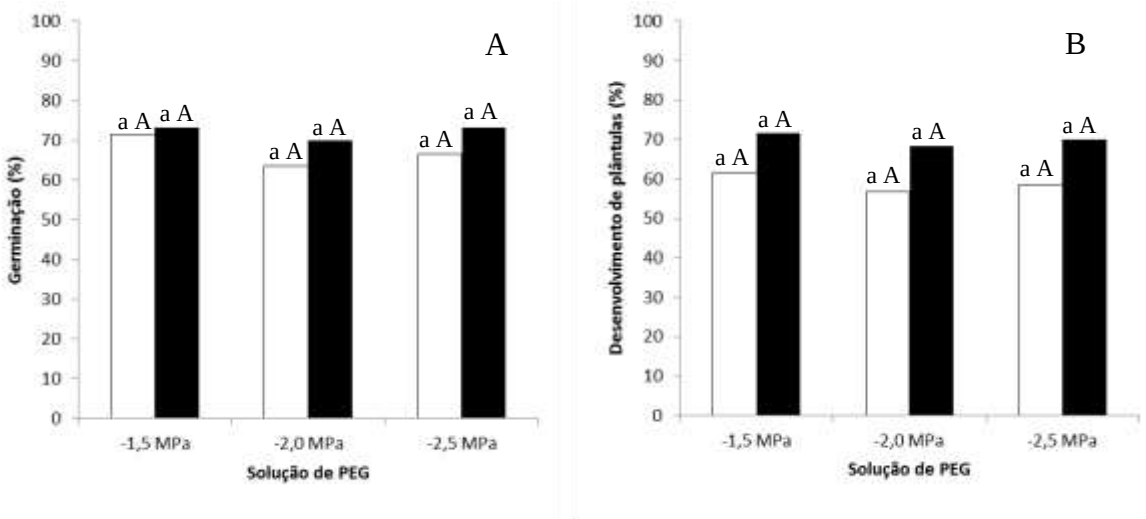


Figura 6. Germinação (*A*) e desenvolvimento de plântulas (*B*) de sementes imaturas de *Erythrina speciosa* osmocondicionadas em solução de polietileno glicol (PEG) em diferentes concentrações, por 24 (barra branca) ou 48 horas (barra preta) e posterior redução do teor de água até valores próximos aos encontrados em sementes maduras (±10%). Letras minúsculas comparam potencial hídrico das soluções, maiúsculas comparam tempo de incubação.

Ácido abscísico

A figura 8 mostra a quantificação de ABA nos cotilédones e eixos embrionários de sementes imaturas e maduras de eritrina. Nos dois estádios de desenvolvimento, o teor de ABA foi maior nos cotilédones, sendo esse valor reduzido cerca de 4 vezes entre o estádio 4 e 6. Nos eixos embrionários, esse comportamento também se repetiu.

Com a dessecação (Figura 8), houve uma tendência à redução dos teores de ABA nos cotilédones de sementes imaturas de *E. speciosa*, conforme observado na Figura 9. Por outro lado, nos eixos embrionários observou-se aumento desse hormônio em cerca de 30%, embora a porcentagem de germinação não tenha sido alterada em função da redução do teor de água das sementes.

Surpreendentemente, quando as sementes imaturas foram armazenadas a -18^{o}C por 30 dias, com teor de água original, os teores de ABA apresentaram incremento de7,5 vezes. Conforme esperado, a germinação das sementes foi nula nesse tratamento, evidenciando que o congelamento destas com alto teor de água (62%) foi prejudicial,embora essas sementes apresentassem o máximo valor de matéria seca.

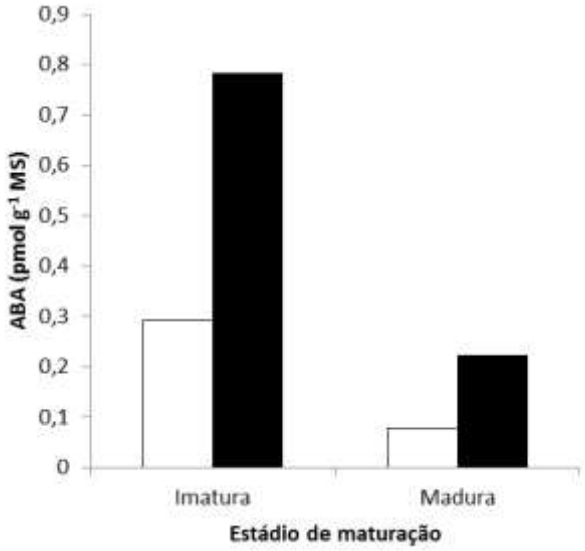


Figura 7. Teor de ácido abscísico (pmol mg^{-1} MS) nos eixos embrionários (barra branca) e nos cotilédones (barra preta) de sementes imaturas e maduras de *Erythrina speciosa*.

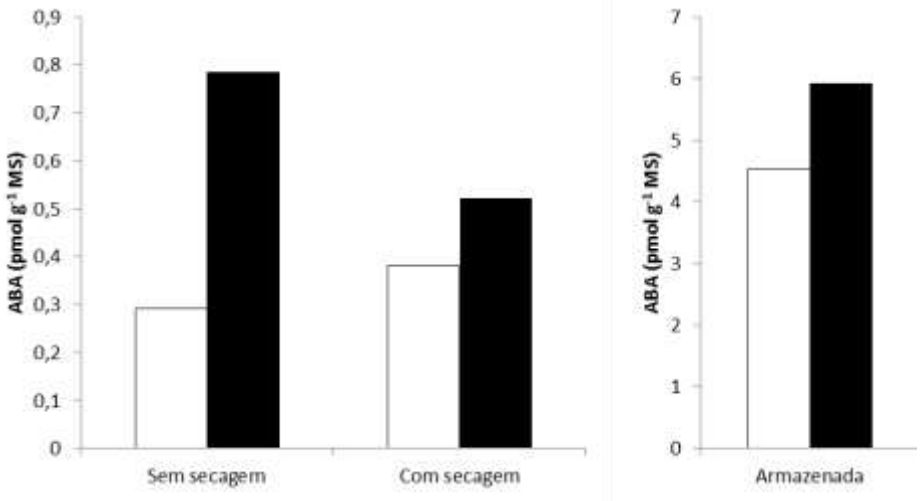


Figura 8. Teor de ácido abscísico (ABA – pmol mg^{-1} MS) nos eixos embrionários (barra branca) e cotilédones (barra preta) de sementes imaturas de *Erythrina speciosa* sem secagem, com secagem até 8% e sem secagem armazenadas a -18 °C por 30 dias.

Caesalpinia echinata

Diferentemente do trabalho realizado por Borges *et al.* (2005) com sementes provenientes de Mogi-Guaçu (SP), onde a maturação de *C. echinata* ocorreu cerca de 65 DAA, as sementes coletadas em Jaú (SP) já estavam iniciando a fase de dispersão aos 55 DAA com, aproximadamente, 45% de água e apresentavam cerca de 9% de água no início dos experimentos, após abertura espontânea dos frutos, em laboratório. Após tratamento em estufa (40 °C por cerca de 3h), o teor de água destas sementes foi reduzido para 8%.

A germinação, antes e após a secagem, foi superior a 80%, no entanto, o desenvolvimento de plântulas das sementes não secas foi nulo, devido a contaminação por microorganismos, especialmente fungos. No entanto, após a redução de apenas 1% no teor de água, houve o desenvolvimento de 40% de plântulas normais (Figura 9), possivelmente pelo efeito da temperatura de 40 °C empregada na secagem.

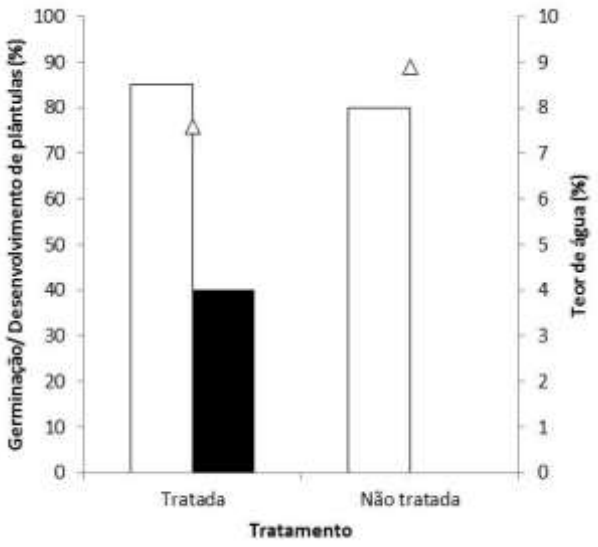


Figura 9. Germinação (%, barra branca), desenvolvimento de plântulas (%, barra preta) e teor de água (%, triângulo) de sementes tratadas e n de *Caesalpinia echinata*.

Com o armazenamento em temperatura ambiente por 30 dias, as sementes perderam completamente a capacidade germinativa, tanto as submetidas à dessecação quanto as não dessecadas (dados não mostrados).

O ABA também foi avaliado nos cotilédones e eixos embrionários de sementes maduras de *Caesalpinia echinata* secas artificialmente ou não e armazenadas em temperatura ambiente, sendo os resultados mostrados na figura 10.

Os eixos embrionários de sementes de pau-brasil apresentaram menor teor de ABA do que os cotilédones, em todos os tratamentos, com exceção daqueles de sementes secas e armazenadas.

Em função da secagem, os eixos embrionários de sementes não armazenadas (Figura 10A) não apresentaram alteração nos teores de ABA, sendo que nos cotilédones, nessas mesmas condições, houve aumento de 29%.

O armazenamento ocasionou aumento de cerca de 74% no teor de ABA nos eixos embrionários não secos e 45% nos cotilédones (Figura 10B). Já nas sementes submetidas à secagem, os eixos embrionários apresentaram incremento de 90% na quantidade de ABA, enquanto nos cotilédones secos, no entanto, os teores deste hormônio foram reduzidos em 37%.

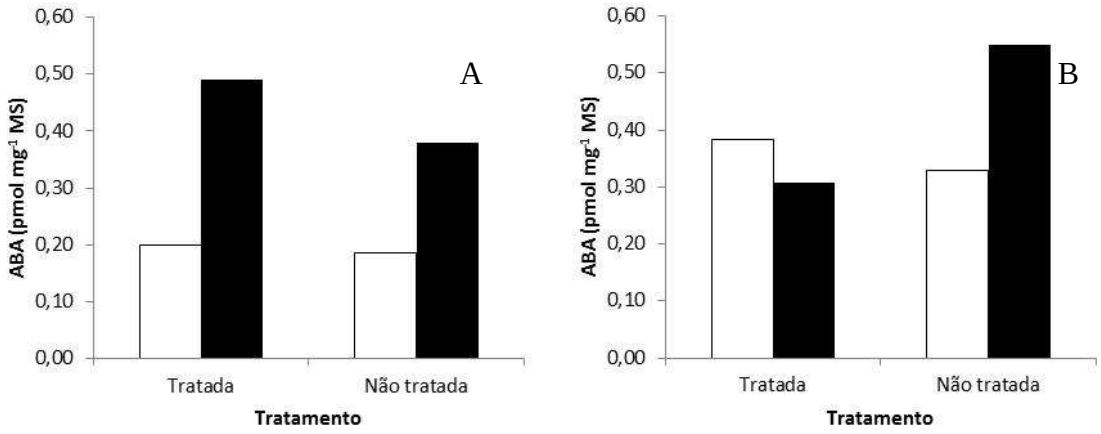


Figura 10. Teor de ácido abscísico (ABA – pmol mg^{-1} MS) em eixos embrionários (barra branca) e cotilédones (barra preta) de sementes de *Caesalpinia echinata*. A – Não armazenadas; B – Armazenadas.

Discussão

O tempo exato de maturação das sementes de *E. speciosa* não pôde ser definido, no entanto, aparentemente se encontra em torno de 60 dias, sendo inferior ao observado para *Erythrina crista-galli*, que é cerca de 70 dias (Lazarotto *et al.* 2011).

No presente trabalho, a separação das sementes em seis categorias pelo aspecto visual foi eficiente para identificar lotes com idades distintas, sendo que estas foram confirmadas após as análises de potencial hídrico, teor de água, matéria fresca, matéria seca e germinação. Com exceção dos estádios 3 e 4, que embora visualmente fossem diferentes, nos parâmetros fisiológicos analisados não diferiram estatisticamente.

A máxima germinação foi atingida já no estádio 3, quando as sementes apresentavam cerca de 60% de água e matéria seca próxima do valor máximo. Para sementes de *E. crista-galli*, as matérias seca e fresca foram máximas aos 56 DAA, coincidindo com o máximo de germinação, no entanto, esta foi de apenas 50% (Lazarotto *et al.* 2011), valor bem inferior ao apresentado por *E. speciosa*.

A tolerância à dessecação foi avaliada nos estádios 2, 3 e 4, quando as sementes apresentaram teor de água de 76 a 58%, matéria seca de 168 a 312 mg semente^{-1} e matéria fresca máxima. Ao serem submetidas à dessecação até 5,5-13% de teor de água, as sementes dos estádios 3 e 4, que apresentaram matéria seca estatisticamente igual, toleraram à dessecação, embora as do estádio 3 tenham apresentado 20% a menos de germinação, o que leva a crer que estas se apresentavam em diferentes estádios de maturação, corroborando a classificação feita considerando os dados visuais.

Sementes imaturas podem apresentar incremento da tolerância à dessecação quando tratadas osmoticamente, como foi o caso de *C. echinata* (Leduc *et al.* 2012). Todavia, o tratamento com polietilenoglicol não alterou o comportamento germinativo de sementes de eritrina no presente trabalho. Novas análises com diferentes potenciais hídricos e tempos de embebição poderão confirmar se estas são realmente indiferentes ao pré-condicionamento osmótico ou se a metodologia empregada não foi adequada.

Assim como reportado na literatura (Blöchl *et al.* 2005), a quantidade de ABA foi maior nos estágios iniciais do desenvolvimento de sementes de eritrina, reduzindo sua quantidade ao longo do processo de maturação.

As sementes imaturas de eritrina analisadas apresentaram matéria fresca máxima, conforme estudos anteriores. Segundo Walker-Simmons (1987), analisando cultivares de trigo, os maiores valores de ABA coincidem com os maiores valores de matéria fresca, associando-se esses altos valores à aquisição da tolerância à dessecação. Foi justamente nessa fase de maturação que as sementes de *E. speciosa* foram capazes de tolerar baixos teores de água, mantendo elevados valores de germinação.

Comparando-se os teores de ABA nos cotilédones e nos eixos embrionários de sementes maduras de *E. speciosa* e *C. echinata*, observa-se maior quantidade do hormônio nas sementes de pau-brasil, nos dois tecidos, sendo esses valores cerca de 70% e 140% superiores nos cotilédones e eixos embrionários, respectivamente.

Com o armazenamento por 30 dias à temperatura ambiente, as sementes de *Caesalpinia echinata* apresentaram aumento nos teores de ABA, tanto nos cotilédones, quanto nos eixos embrionários (Figura 11). Da mesma forma que o observado para *E. speciosa*, o aumento nos teores do hormônio foi acompanhado da morte das sementes, embora por causas distintas. O que pode ter acontecido é que as sementes aumentaram o metabolismo na tentativa de adaptação às novas condições e o aumento do ABA se deu neste momento, porém, a cristalização da água das sementes de eritrina e as altas taxas respiratórias das sementes de pau-brasil, entre outras possíveis causas, não foram controladas e as sementes morreram.

Ao serem submetidas à secagem, as sementes de *C. echinata* armazenadas à temperatura ambiente, apresentaram modificações nos teores de ABA, sendo que nos cotilédones houve redução de 62%, enquanto que nos eixos embrionários houve aumento de cerca de 90%, embora essas sementes já não germinassem.

Seiler *et al.* (2011) correlacionaram o aumento na quantidade de ABA com o aumento de amido em sementes de cevada sob estresse hídrico. Cotilédones de pau-brasil são ricos em amido (Hellmann *et al.* 2006, Mello *et al.* 2010 e 2011, Leduc *et al.* 2012) e para essas sementes, a dessecação ocasionou o aumento de amido em sementes maduras (capítulo anterior), no entanto não é possível afirmar que o balanço ABA/amido esteja relacionado no presente estudo, por se tratarem de lotes diferentes.

A adequação de um protocolo de dosagem de ABA mais apropriado para as sementes das espécies estudadas no presente trabalho é de extrema relevância, pois o conjunto dos dados obtidos até o momento sugere um importante papel deste regulador na tolerância à dessecação e no armazenamento de sementes de duas espécies. Contudo, é importante ressaltar que o ABA aparentemente não deve ser responsável direto pela

tolerância à dessecação, mas sim, acredita-se, que faça parte de um evento fisiológico durante o desenvolvimento, no qual há acúmulo de compostos (açúcares, LEAs, HSPs, etc) relacionados à tolerância à dessecação. Portanto, seus teores dependem do estágio de desenvolvimento, da quantidade de compostos acumulados e da sensibilidade de diferentes espécies a estes.

Referências bibliográficas

Barbedo, C. J., Bilia, D. A. C. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Revista Brasileira de Botânica 25: 431-439.

Battaglia, M., Oliveira-Carrillo, Y., Garciarrubio, A., Campos, F. & Covarrubias, A. A. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. Plant Physiology 148: 6-24.

Blöchl, A., March, G. G.-de, Sourdioux, M., Peterbauer, T. & Richter, A. 2005. Induction of rafinose oligosaccharide biosynthesis by abscisic acid in somatic embryos of alfafa (*medicago sativa* L.). Plant Science 168: 1075-1082.

Borges, I. F. , Del Giudice Neto, J., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Bilia, D. C. J. & Barbedo, C. J. 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brasilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. Arquivos de Biologia e Tecnologia 48: 851-861.

Chatelain, E., Hundertmark, M., Leprince, O, Le Gall, S., Satour, P., Deligny-Penninck, S., Rogniaux, H. & Buitink, J. 2012. Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. Plant, Cell & Environment 35: 1440-1455.

Decagon Devices, Inc. 2001. WP4 Dewpoint potentameter operator´s manual, Pullman, WA, Decagon Devices, Inc.

Hellmann, M. E., Mello, J. I. O., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Barbedo, C.J. 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. Revista Brasileira de Botânica 29: 93-101.

Hong, T. D & Ellis, R. H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. Rome: International Plant Genetic Resources Institute. (IPGRI Techical Bulletin, 1). 55p.

Hundertmark, M., Buitink, J., Leprince, O. & Hincha, D. K. 2011. The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. Seed Science Research 21: 165-173.

ISTA. 1985. International rules for seed testing. Seed Science and Technology 13: 356-513.

Konozy, E. H. E., Bernardes, E. S., Rosa, C., Faca, V., Greene, l. J. & Ward, R. J. 2003. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. Archives of Biochemistry and Biophysica 410: 222-229.

Lazarotto, M., Beltrame, R., Muniz, M, F. B. & Blume, E. 2011. Maturação fisiológica de sementes de *Erythrina crista-galli*. Ciência Florestal 21: 9-16.

Leduc, S. N. M., Silva, J. P. N., Gaspar, M., Barbedo, C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2012. Non-structural carbohydrates of immature seeds of *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) are involved in the induction of desiccation tolerance. Australian Journal of Botany 60: 42-48.

López-Ráez, J.Á, Kohlen W, Charnikhova T, Mulder P, Undas AK, Sergeant MJ, Verstappen F, Bugg TDH, Thompson AJ, Ruyter-Spira C & Bouwmeester H. 2010. Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? New Phytologist 187: 343-354.

Mello J. I. O. & Barbedo C. J. 2007. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae – Caesalpinioideae). Revista Árvore 31: 645-655.

Mello, J. I. O., Barbedo, C. J., Salatino, A. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2010. Reserve carbohydrates and lipids from seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. Brazilian Archives of Biology and Technology 53: 889-899.

Mello, J. I. O., Centeno, D. C., Barbedo, C . J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2011. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. Seed Science & Technology 39: 465-480.

Michel, B. E. & Kaufman, M. R. 1973. The osmotic potencial of polyethylene glicol 6000. Plant Physiology, v. 51, p. 914-916.

Pammenter, N.W. & Berjak, P. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. Seed Science Research 9: 13-37.

Peterbauer, T. & Richter, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. Seed Science Research 11: 185-197.

Rangel-Fajardo, M. A., Delgado-Alvarado, A., Córdova-Tellez, L., Zavaleta-Mancera, H. A., Villegas-Monter, A., López-Andrade, A. P. & Vidales-Fernandez, I. 2011.

Accumulation of sugars in cacao (*Theobroma cacao*) seeds of three genetic origins and its relationship to desiccation tolerance. Seed Science & Technology 39: 1-11.

Seiler, C., Harshavardhan, V. T., Reddy, P. S., Strickert, M., Rolletschek, H., Scholz, U., Wobus, U. & Sreenivasulu, N. 2011. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. Journal of Experimental Botany 62: 2615-2632.

Silva, J. P. N. 2010. Mecanismos de controle de tolerância à dessecação em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) e *Caesalpinia peltophoroides* Benth (sibipiruna). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 122p.

Tunnacliffe, A. & Wise, M. J. 2007. The continuing conundrum of the Lea proteins. Die Naturwisessenschaften 94: 791-812.

Walker-Simmons, M. 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. Plant Physiology 84: 61-66.

Capítulo IV - Mobilização de reservas durante a germinação de sementes de duas espécies de Leguminosae

Resumo

Os compostos armazenados durante a maturação de sementes servem como fonte de energia e carbono para o desenvolvimento do embrião até que este seja capaz de realizar fotossíntese. A germinação de sementes ortodoxas inicia-se com a hidratação e a retomada dos processos metabólicos, mobilização dos compostos acumulados durante a maturação e crescimento do embrião. Essas sementes perdem a capacidade de tolerar a dessecação assim que a germinação é desencadeada. Durante a germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) observou-se diminuição do teor de carboidratos solúveis nos cotilédones, sendo que nos eixos os teores se mantiveram estáveis, porém houve redução do teor de amido. Os níveis de açúcares redutores aumentaram ao longo da germinação nos cotilédones e eixo embrionário, enquanto os oligossacarídeos da série da rafinose (OSR) tiveram seu teor diminuído e a sacarose foi totalmente consumida. Nas sementes de *Erythrina speciosa* (eritrina) os teores de açúcares solúveis dos cotilédones diminuíram, enquanto os dos eixos aumentaram, da mesma forma que os ciclitóis galactosilados. O teor de sacarose foi reduzido e os OSR foram completamente consumidos. As globulinas foram mobilizadas durante a germinação das sementes de pau-brasil, sendo que nas sementes de eritrina houve grande mobilização de globulinas e prolaminas apenas nos eixos embrionários. O perfil proteico das globulinas dos cotilédones de pau-brasil evidenciou mobilização de proteínas de peso molecular entre 31 e 45 kDa e síntese de proteínas de 21 a 31 kDa. Nas sementes de eritrina as proteínas aparentemente assumem papel importante durante a germinação, sendo possível fazer uma relação entre os perfis proteicos observados e proteínas descritas na literatura como proteínas de reserva mobilizadas durante a germinação.

Abstract

The compounds stored during seed maturation are considered an energy source for embryo development until the seedling is able to perform photosynthesis. The orthodox seed germination starts with the hydration and restart of metabolic processes, mobilization of the compounds accumulated during the maturation phase and embryo growth. Those seeds lose the desiccation tolerance when germination begins. For *Caesalpinia echinata* (brazilwood) seeds, the soluble carbohydrates accumulated in cotyledons decreased during germination, while in the axis the levels remained stable and starch content decreased. Reducing sugar contents increased in cotyledons and embryo axis during germination, whereas raffinose family oligosaccharides (RFO) had their content decreased and sucrose was completely mobilized. In *Erythrina speciosa* (eritrina) seeds, soluble carbohydrate content decreased in cotyledons, while in the axis the levels increased, and the same profile was observed for galactosyl cyclitols. The sucrose content was reduced and RFOs were fully consumed. The globulins were mobilized during brazilwood seed germination, while in the seeds of eritrina globulins and prolamins were mobilized only in embryonic axes. The globulin profile in cotyledons evidenced the mobilization of proteins with molecular weight between 31 and 45 kDa and synthesis of low molecular weight (21 to 31 kDa) proteins. . Proteins seem to play an important role during eritrina seed germination, and it was possible to link the protein profiles observed with proteins described in the literature as storage proteins mobilized during germination.

Introdução

As sementes são a principal forma de propagação das espécies vegetais e geralmente acumulam compostos de reserva como carboidratos, lipídios e proteínas, consumidos durante a germinação como fonte de energia ou, ainda, como protetores celulares, em condições de estresse, incluindo baixas temperaturas e dessecação.

Ao longo da maturação de sementes ortodoxas (tolerantes à dessecação) podem ser acumulados oligossacarídeos da série da rafinose (OSR), proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), ácido ascórbico e lipídios. Além de suprirem as necessidades energéticas dessas sementes até que estas sejam capazes de sintetizar substâncias necessárias para o estabelecimento da planta, estes compostos podem evitar danos causados pela desidratação, oxidação, e desestruturação das membranas celulares (Frazen & Hass 1991, Hoekstra *et al.* 2001, Peterbauer & Richter 2001). Durante a germinação, as sementes podem apresentar diferentes estratégias de degradação dos compostos de reserva, dependendo da proporção relativa destes, variando de espécie para espécie (Borek *et al.* 2011).

Por outro lado, a capacidade de tolerar a desidratação é perdida nas sementes ortodoxas quando estas estão em processo germinativo (Faria *et al.* 2005). Nesta fase, ocorre o alongamento da radícula dentro da semente, resultante da embebição e reativação do metabolismo e do ciclo celular, podendo envolver tanto expansão como divisão celular, o que por sua vez pode estar vinculado à maior sensibilidade à dessecação ou perda de tolerância à dessecação durante o progresso do processo germinativo (Guimarães *et al.* 2011).

Caesalpinia echinata (pau-brasil) e *Erythrina speciosa* (mulungu ou eritrina-candelabro), ambas pertencentes à família Leguminosae, apresentam sementes ortodoxas com longevidade distinta e composição bioquímica diversa, motivo pelo qual foram escolhidas para avaliar a participação dos compostos de reserva no comportamento germinativo. Pau-brasil contém amido como principal composto de reserva, enquanto que em eritrina, tal polissacarídeo é quase ausente. A sacarose é o açúcar solúvel mais abundante em ambas, porém a quantidade de OSR das sementes das duas espécies é uma diferença marcante (Mello *et al.* 2010).

O presente estudo teve como objetivos analisar a mobilização dos compostos de reserva durante a germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*, visando a avaliar as modificações encontradas com a possível a perda de

tolerância à dessecação durante o processo germinativo, contribuindo para a compreensão do comportamento dessas sementes durante o armazenamento em condições naturais.

Material e Métodos

Sementes maduras de *Erythrina speciosa* Andrews e *Caesalpinia echinata* Lam. foram coletadas em 2010, de cerca de 10 matrizes localizadas no Instituto de Botânica de São Paulo (SP) e na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (Mogi-Guaçu/SP), respectivamente, e após beneficiamento foram semeadas em rolo de papel embebido em água destilada e colocadas para germinar em câmaras do tipo BOD a 25° C, sob luz contínua por 3, 5 e 8 dias (para *E. speciosa*) e por 1, 2, 3, 4, 5 e 7 dias (para *C. echinata*). Esses tempos foram escolhidos com base no tempo médio de germinação das sementes de *C. echinata* (Mello & Barbedo 2007). As sementes de *E. speciosa* foram escarificadas com auxílio de esmeril, por cerca de 5 segundos para cada semente (conforme Mello *et al.* 2010), a fim de quebrar a dormência física causada pelo tegumento (Carvalho *et al.* 1980, Molizane 2012). Em cada ponto da curva de germinação foram coletados separadamente os cotilédones e eixo embrionário, sendo congelados em nitrogênio líquido, macerados, liofilizados e submetidos à extração e análise de carboidratos solúveis, amido e proteínas, conforme descrito a seguir.

Extração e quantificação de carboidratos

A partir das amostras pulverizadas e liofilizadas, 100 mg de cotilédone e cerca de 10 mg de eixo embrionário/raízes foram utilizados para a extração de carboidratos solúveis. As extrações foram realizadas em banho-maria a 80 °C, por 15 min, utilizando-se 1 mL ou 0,5 mL (cotilédones e eixos embrionários, respectivamente) de etanol 80% por amostra, sendo o precipitado re-extraído duas vezes e os sobrenadantes agrupados. O açúcar total foi quantificado pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), usando glucose como padrão. Os resultados foram expressos em mg por g de massa seca (mg g^{-1} MS).

Os carboidratos solúveis neutros foram analisados por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) após

deionização em coluna de troca iônica Dowex-1 (forma Cl^-) e Dowex-50W (forma H^+). O sistema de HPAEC/PAD (Dionex ICS-3000) usado consistiu de uma coluna CarboPac PA-1, com 4x250 mm e eluição com gradiente de 150 mM de hidróxido de sódio (eluente B) e água (eluente A), com a seguinte programação: 0-25 min, 66,7% eluente B; 25,1-30 min, 100% eluente B, 30,1-35 min, 66,7% eluente B, com fluxo de 0,2 mL min^{-1}.

Parte do extrato etanólico foi evaporada e re-suspendida em água destilada e utilizada para quantificação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson (Somogyi 1945), utilizando-se glucose como padrão.

O resíduo das extrações de carboidratos solúveis foi submetido à determinação enzimática de amido de acordo com Amaral *et al.* (2007).

Extração e quantificação de proteínas

Amostras pulverizadas de eixo embrionário e cotilédone das duas espécies foram desengorduradas por extração com cinco volumes de acetona. O material vegetal desengordurado (100 mg – cotilédones, 20 mg - eixos embrionários) foi submetido à extração fracionada de proteínas de reserva segundo o método de Landry *et al.* (2000), com modificações. Para a extração das globulinas (primeira fração), foi adicionado NaCl 0,5 M, na proporção 2:5 (p:v). A extração foi realizada a 4 °C, por 1h. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado a -20 °C. Repetiu-se a extração com NaCl e centrifugação. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20 °C. Lavou-se o resíduo com 500 µL de H_2O MQ e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 min, para retirada da fração albumina. Nova lavagem foi realizada e o resíduo foi seco e pesado.

A extração da fração prolamina foi realizada no resíduo da 1ª extração, utilizando-se solução de isopropanol 55% e β Mercaptoetanol (βMe) 0,4% (1:4, p:v) por uma noite. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 min (temperatura ambiente). Recolheu-se o sobrenadante e armazenou-se a -20 °C. A extração foi repetida por 2h e os sobrenadantes das duas extrações foram reunidos.

As glutelinas foram extraídas a partir do resíduo da 2ª extração, utilizando-se SDS 5%, βMe 2,5% em tampão Tris HCl 100 mM pH 7,5 por 2h em temperatura ambiente, após o que, as amostras foram fervidas a 100 °C por 5 min e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -20 °C.

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), usando-se albumina de soro bovino como padrão (BioRad).

Eletroforese de proteínas – SDS-PAGE

A análise comparativa do perfil proteico das duas frações foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). O gel de resolução foi preparado a partir de 8 mL de uma solução estoque de acrilamida e bis-acrilamida (29,2:0,8 p/p), 5 mL de tampão Tris HCl 3M pH 8,8, 200 µL de SDS 10% e 6,7 mL de H_20 deionizada, e vertido em placas de vidro separadas por espaçadores de 2 mm, imediatamente após a adição dos catalizadores da reação, 100 µl de PAM 10% e 10 µl de TEMED. Após o período de polimerização do gel, adicionou-se o gel de empacotamento 4% consistindo de 2,6 mL de acrilamida e bis acrilamida (29,2:0,8, p/p), 5 mL de tampão Tris HCl 0,5M pH 6,8, 200 µL de SDS 10% e 12 mL de H_2O deionizada. Também foram adicionados 100 µL de PAM e 10 µL de TEMED para catalisação da reação de polimerização.

Alíquotas correspondentes a 7,5 µg de proteínas foram utilizadas para cada ponto experimental, sendo desnaturadas por 5 min a 100 °C, na presença de 60 µL de tampão de amostra, contendo H_20 deionizada, Tris HCl 0,5M pH 6,8, glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 0,5% e βMe 5%. A corrida eletroforética foi realizada em sistema Mini-Protean II (Bio-Rad, USA) contendo tampão Tris-Glicina (solução estoque, 1L, 10x concentrada contendo: 33,3 g de TrisBase, 144 g de glicina e 10 g de SDS). A voltagem aplicada foi de 50mA, até a saída do azul de bromofenol do gel.

Os géis foram fixados em solução de ácido acético, etanol e H_2O deionizada (1:4:5, v/v/v) por 1 hora, corados em solução de 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R-250 por 1 hora e descorados em solução de ácido acético, metanol e H_2O deionizada (1:2:7, v/v/v), durante uma noite e, após o que, a solução foi trocada por ácido acético, metanol, H_2O deionizada (1:3:6, v/v/v), onde permaneceu por cerca de 2 horas ou até que o excesso de corante fosse completamente removido. Alternativamente, para os géis cujas bandas apresentaram fraca coloração com Coomasie, foi realizada coloração com prata, utilizando o kit Silver Stain Plus (Bio-Rad), segundo instruções do fabricante. Utilizou-se como padrão uma mistura de proteínas com pesos moleculares de ampla gama (Bio-Rad, USA).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições para os testes bioquímicos. Os resultados foram submetidos à análise de variância empregando-se o teste F em nível de 5%.

Resultados

Sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) apresentam tegumento permeável e embebem rapidamente, atingindo equilíbrio higroscópico com o meio em cerca de 20 minutos (Leduc 2007) e apresentam pico de germinação aos 3 dias (Mello & Barbedo 2007). Por outro lado, sementes de *Erythrina speciosa* (eritrina) apresentam tegumento impermeável à água (Carvalho *et al.* 1980), sendo necessária a realização de escarificação para que as sementes iniciem o processo de embebição e posterior germinação (Molizane 2012). Neste trabalho, a autora verificou que o equilíbrio hídrico das sementes de eritrina escarificadas ocorre após 48h de embebição e o pico de germinação após 4 dias de semeadura.

Desta forma, devido ao tempo médio de embebição das sementes de pau-brasil ser menor do que o de sementes de eritrina, as coletas de sementes germinantes de pau-brasil foram realizadas com 1 e 2 dias após a instalação do experimento, para garantir que as primeiras modificações dos compostos de reserva pudessem ser detectadas, enquanto para eritrina a primeira coleta foi realizada aos 3 dias após a embebição.

Inicialmente, os cotilédones das sementes de *C. echinata* apresentavam cerca de 180 mg g^{-1} MS de carboidratos solúveis, enquanto os eixos embrionários apresentavam cerca de 300 mg g^{-1} MS. Após cerca de 48 h de semeadura, os eixos embrionários apresentaram redução desses valores, mantendo-se constantes até o quarto dia. Por outro lado, os cotilédones apresentaram redução nos valores de carboidratos solúveis apenas após o quarto dia de germinação (Figura 1).

Cerca de 35% da matéria seca dos cotilédones de pau-brasil é constituída de amido. Durante o processo germinativo, houve aumento de cerca de 5% no teor de amido, porém este incremento não foi significativo pela análise estatística. Nos eixos embrionários, por outro lado, embora tenham apresentado menor teor de amido (ca. 3% MS) este valor oscilou significativamente durante o período analisado, atingindo pico

aos 2 dias de germinação (56 mg g^{-1} MS) e apresentando o menor valor (9 mg g^{-1} MS) aos 4 dias (Figura 1).

As sementes de *E. speciosa* apresentaram teor de carboidratos solúveis semelhantes entre cotilédones e eixos embrionários (230 mg g^{-1} MS e 288 mg g^{-1} MS, respectivamente). Durante o tempo de germinação analisado, os eixos embrionários não apresentaram mudanças no teor de açúcares totais, enquanto que nos cotilédones houve redução no seu teor após o quinto dia (Figura 2). O teor de amido não foi analisado nas sementes de *E. speciosa* no presente trabalho pois estas apresentam pequena quantidade desse polissacarídeo, conforme previamente constatado (Mello *et al.* 2010; 2011).

O teor de açúcares redutores aumentou durante a germinação das sementes de *C. echinata*, tanto nos eixos como nos cotilédones, principalmente após o 4° dia de germinação (Figura 3). Nos eixos embrionários estes valores variaram de 12,9 mg g^{-1} MS a cerca de 1 g g^{-1} MS e nos cotilédones, de 17,7 a 287,4 mg g^{-1} MS.

O teor de açúcares redutores nos cotilédones de *E. speciosa* não se alterou durante o processo germinativo, permanecendo entre 39 e 57 mg g^{-1} MS, enquanto nos eixos embrionários houve um aumento de 2 vezes os valores iniciais, ao 5º dia de germinação (Figura 4).

A figura 5 mostra a variação nos teores dos principais açúcares solúveis dos eixos embrionários e cotilédones de sementes de *C. echinata*, quantificados a partir da análise dos extratos alcoólicos por HPAEC/PAD. O açúcar predominante em ambos os tecidos é a sacarose, representando 62% dos açúcares solúveis nos eixos embrionários e 76% nos cotilédones. Outros açúcares que se destacaram pela quantidade nas sementes de pau-brasil foram os ciclitóis, representando 31% nos eixos embrionários, e 20% nos cotilédones (Figura 5).

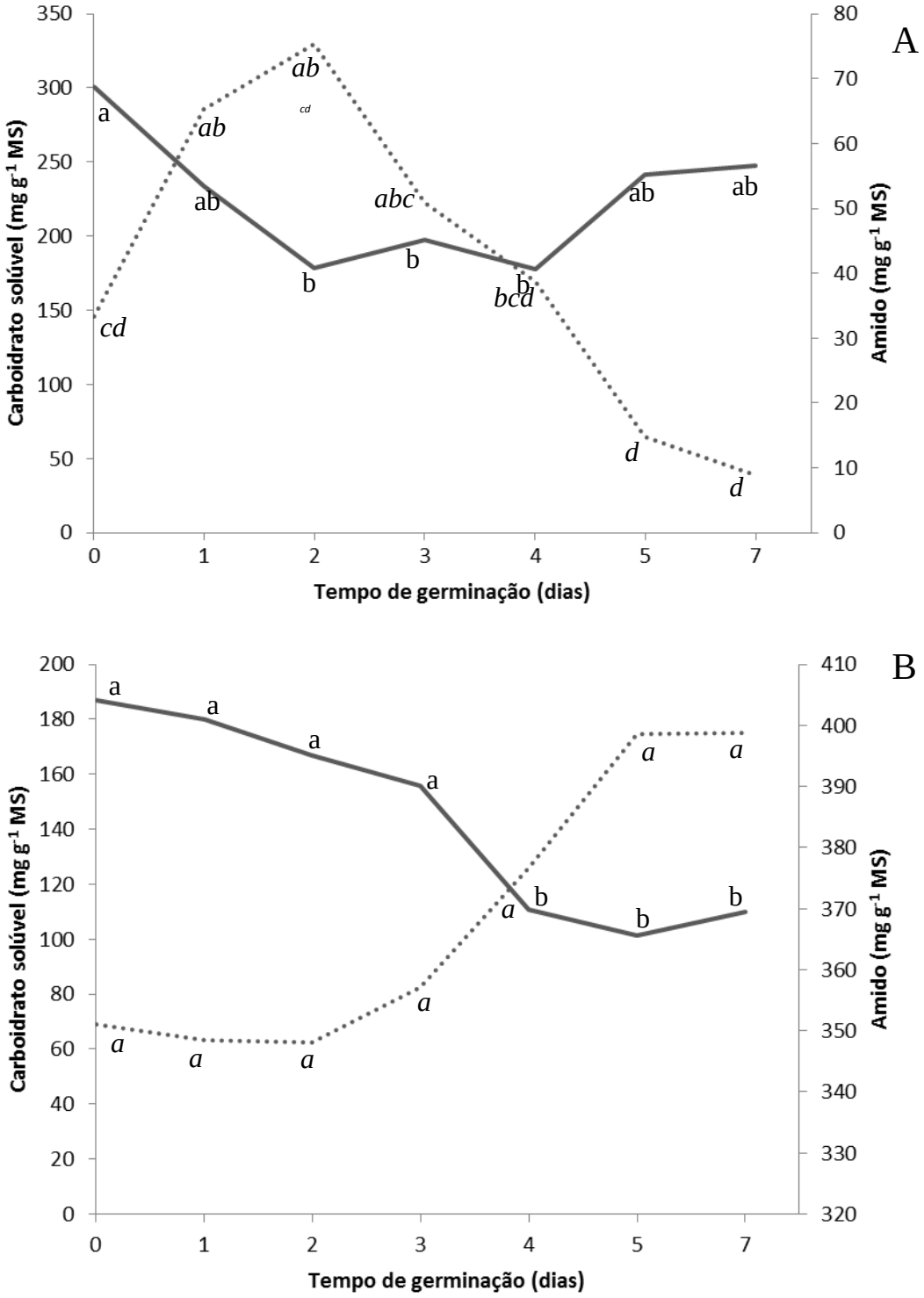


Figura 1. Teores de carboidratos solúveis (mg g^{-1} MS, linha cheia) e amido (mg g^{-1} MS, linha pontilhada) de eixos embrionários/raízes (A) e cotilédones (B) de sementes de *Caesalpinia echinata* durante a germinação.

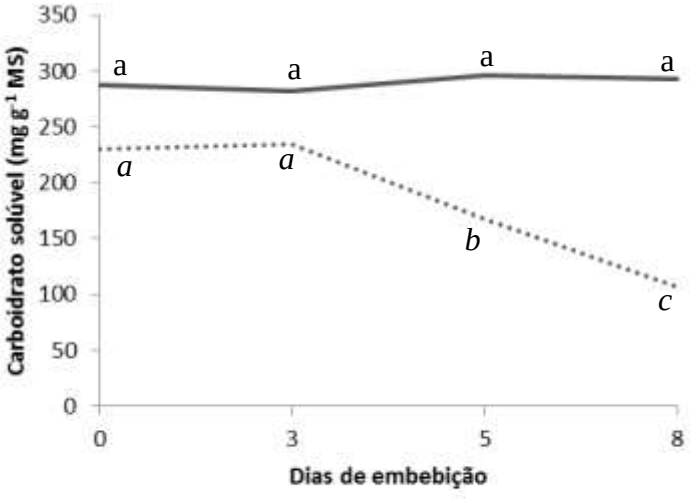


Figura 2. Teor de carboidratos solúveis nos eixos embrionários/raízes (linha cheia) e cotilédones (linha pontilhada) de sementes de *Erythrina speciosa* durante a

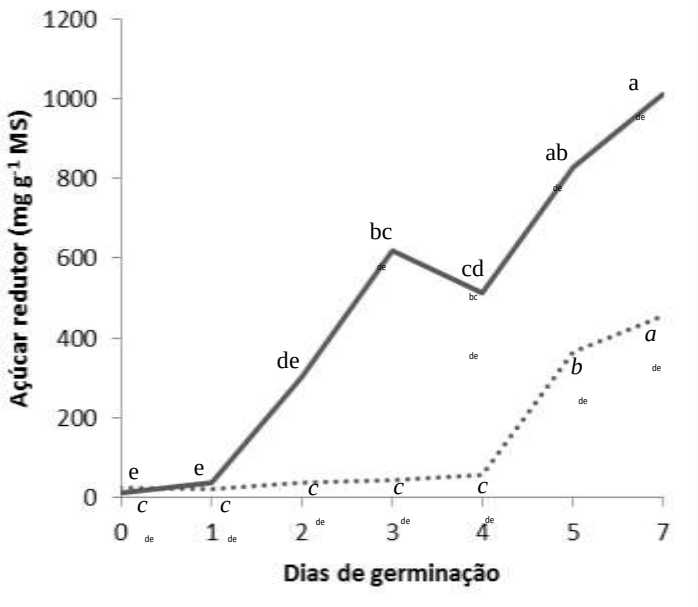


Figura 3. Quantificação de açúcar redutor (mg g^{-1} MS) nos eixos embrionários/raízes (linha cheia) e cotilédones (linha pontilhada) de sementes de *Caesalpinia echinata* durante a germinação.

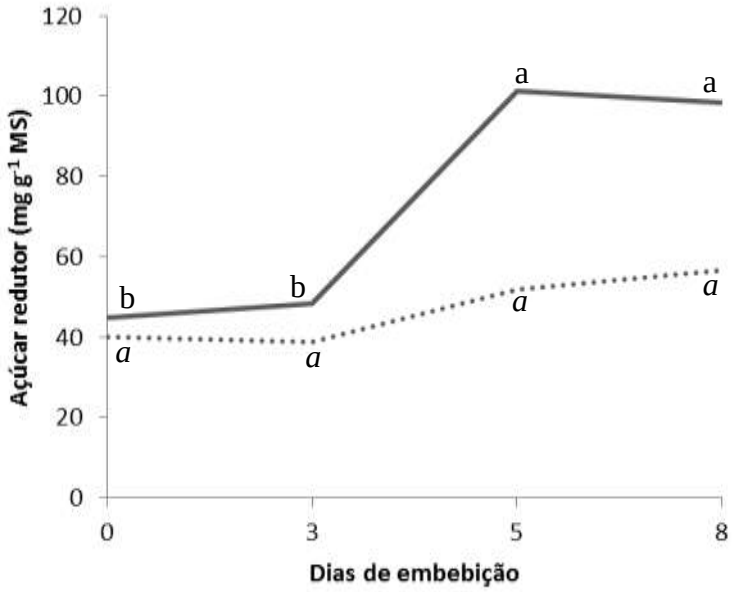


Figura 4. Quantificação de açúcar redutor (mg g^{-1}) nos eixos embrionários/raízes (linha cheia) e cotilédones (linha pontinhada) de sementes de *Erythrina speciosa* durante a germinação.

Os monossacarídeos, glucose e frutose, representaram juntos de 2 a 3% dos açúcares das sementes de pau-brasil, em ambos os tecidos analisados, enquanto os oligossacarídeos da série da rafinose constituíram de 3 a 4% dos açúcares solúveis.

As maiores alterações individuais nos teores dos açúcares nas sementes de pau-brasil foram observadas nos eixos embrionários, onde nota-se aumento inicial de ciclitóis e estaquiose, seguido de redução até níveis próximos aos iniciais de ciclitóis e consumo de estaquiose a partir do 4º dia de germinação. Os conteúdos de glucose e frutose aumentaram significativamente nos eixos embrionários a partir do 2º e 3º dias, respectivamente.

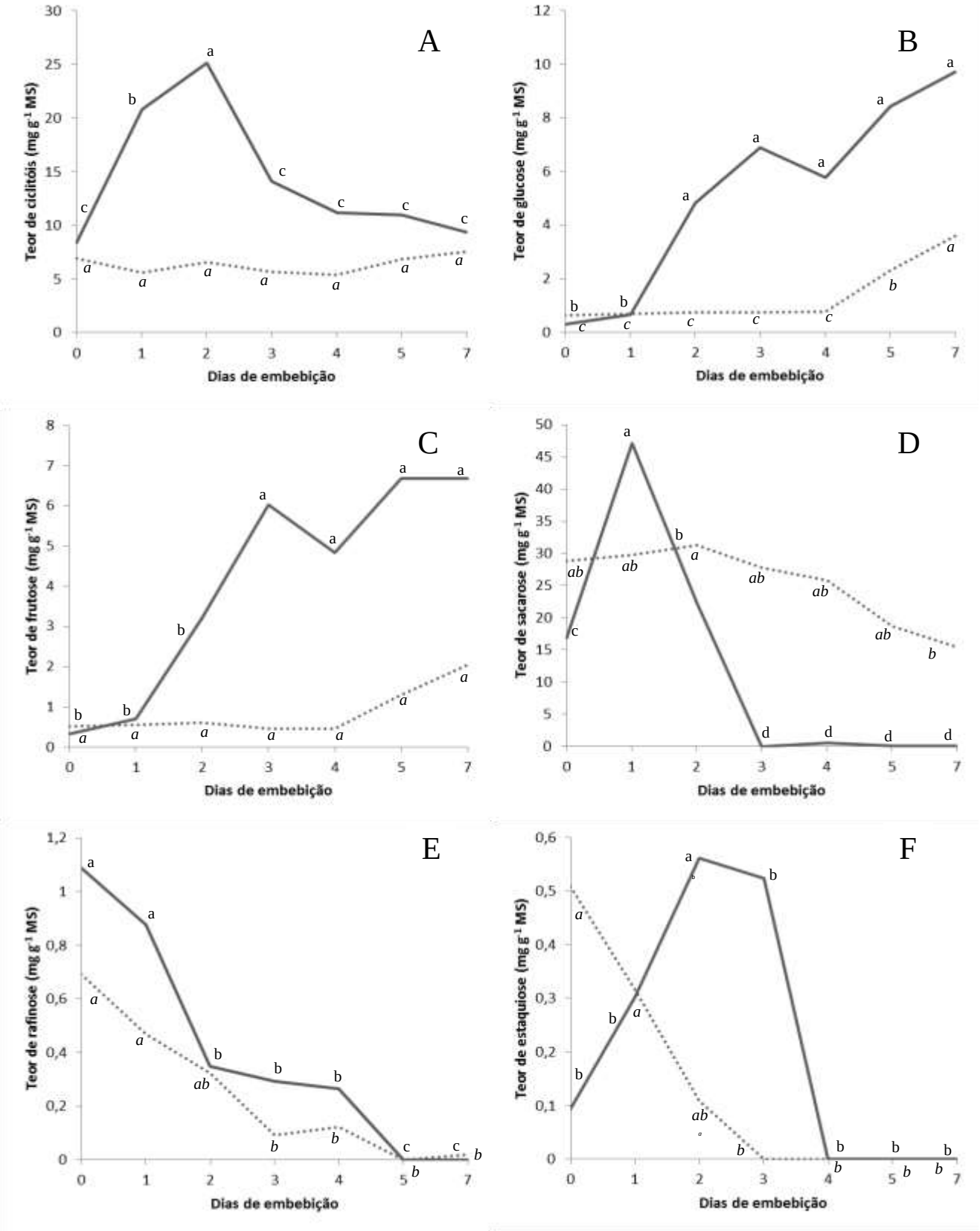


Figura 5. Quantificação de ciclitóis (A), glucose (B), frutose (C), sacarose (D), rafinose (E) e estaquiose (E) nos eixos embrionários (linha cheia) e cotilédones (linha pontilhada) de sementes de *Caesalpinia echinata* durante a germinação.

A quantidade de sacarose aumentou 2,7 vezes no 1º dia de germinação nos eixos embrionários, decaindo a zero a partir do 3º dia (Figura 5D). A rafinose nos eixos embrionários apresentou redução desde o 1º dia de germinação, mantendo-se estável (0,4-0,27 mg g^{-1} MS) entre o 2º e 4º dias de análise, sendo completamente metabolizada no final do período analisado.

Nos cotilédones de pau-brasil (Figura 5), os níveis de ciclitóis mantiveram-se estáveis durante todo experimento, enquanto glucose e frutose apresentaram pequeno aumento após o 4º dia de germinação, no entanto, as alterações observadas nos teores de frutose não foram significativas. A sacarose reduziu após o 2º dia de germinação. Os oligossacarídeos da série da rafinose encontrados nos cotilédones de sementes de pau-brasil diminuíram com a germinação, sendo o consumo de estaquiose mais rápido do que o de rafinose.

Os principais açúcares encontrados nas sementes de *E. speciosa* são os oligossacarídeos da série da rafinose e a sacarose, que constituem de 80 a 89% e de 10 a 18% dos açúcares solúveis, respectivamente (Figura 6).

Os teores de ciclitóis, glucose e frutose nos eixos embrionários permaneceram baixos e estáveis até o 8º dia de experimento. Não houve mudança nos níveis de sacarose nos eixos embrionários de eritrina até o 5° dia de germinação, quando os oligossacarídeos da série da rafinose também diminuíram drasticamente, chegando a valores próximos de zero no final do período (Figura 6).

Nos cotilédones de eritrina foram observadas poucas modificações nos teores de ciclitóis, glucose e frutose, com tendência a aumentar após o 3° dia de germinação. Já os açúcares majoritários (Figura 6E,F) apresentaram redução significativa, sendo que a reserva de sacarose foi a que demorou mais para ser metabolizada. A partir do 5º dia, os níveis de oligossacarídeos da série da rafinose atingiram os menores valores.

A quantificação de proteínas foi realizada analisando-se separadamente as frações globulina, proteínas de reserva abundantes em leguminosas e prolamina, comumente encontradas em sementes de gramíneas. Os eixos embrionários de pau-brasil (Figura 7A) apresentaram grande quantidade das duas frações proteicas (acima de 500 mg g^{-1} MS desengordurada). No entanto, no decorrer da germinação, os teores de globulina foram reduzidos a partir do 3º dia, indicando degradação das reservas de globulina, enquanto os níveis de prolamina apresentaram pequenas oscilações, porém não significativas, mantendo-se elevados ao longo de todo o processo (Figura 7).

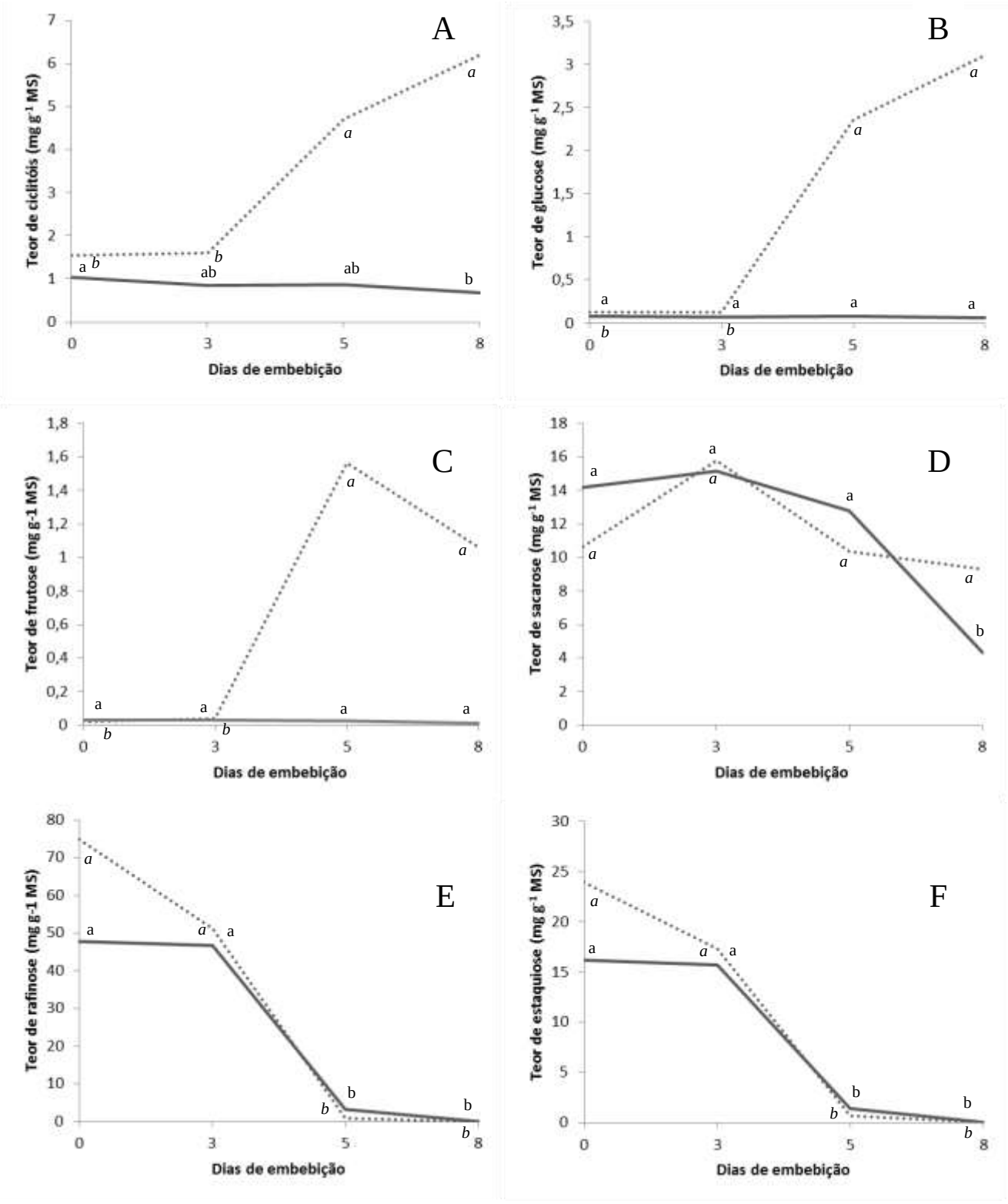


Figura 6. Quantificação de ciclitóis (A), glucose (B), frutose (C), sacarose (D), rafinose (E) e estaquiose (F) nos eixos embrionários/raízes (linha cheia) e cotilédones (linha pontilhada) de sementes de *Erythrina speciosa* durante a germinação.

Por outro lado, os cotilédones de pau-brasil (Figura 7B) apresentaram grande diferença nos teores de globulina e prolamina, sendo a primeira fração bem superior à da segunda.

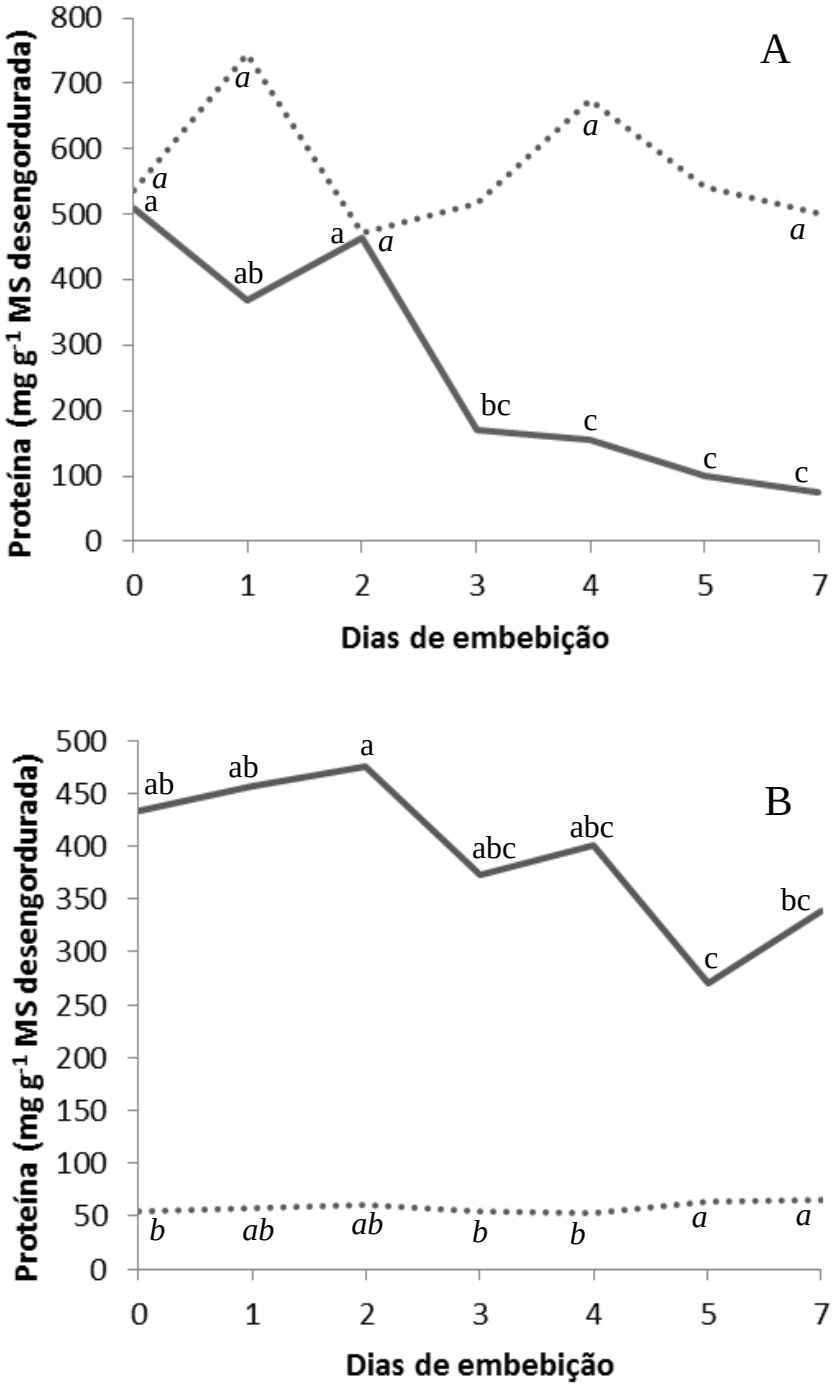


Figura 7. Quantificação (mg g^{-1} MS desengordura) de globulina (linha cheia) e prolamina (linha pontilhada) nos eixos embrionários/raízes (A) e cotilédones (B) de sementes de *Caesalpinia echinata* durante a germinação.

Nos cotilédones, o teor de globulina atingiu valor máximo no 2º dia de germinação, sendo que a partir do 3º dia houve queda no teor desta fração de proteínas (Figura 7B). A quantidade de prolamina nos cotilédones foi aproximadamente 10 vezes menor e apresentou aumento gradual ao longo da germinação das sementes de pau-brasil, estabilizando no 5º dia.

Como observado em sementes de pau-brasil, sementes de *E. speciosa* também apresentaram maior proporção de globulina do que prolamina, tantos nos eixos embrionários, quanto nos cotilédones (Figura 8).

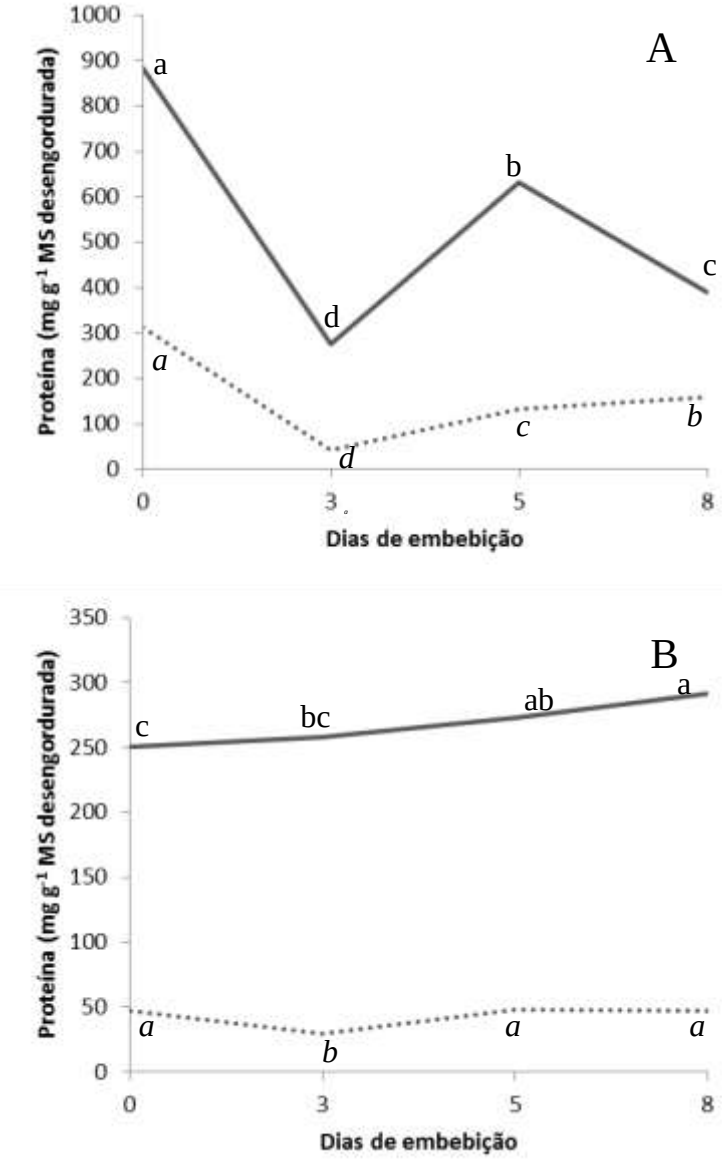


Figura 8. Quantificação (MG g^{-1} MS desengordurada) de globulina (linha cheia) e prolamina (linha pontilhada) nos eixos embrionários/raízes (A) e cotilédones (B) de sementes de *Erythrina speciosa* durante a germinação.

Nos eixos embrionários, houve grande oscilação nos teores de globulina durante a germinação, sendo que na semente quiescente, foi observada a maior concentração (ca. 880 mg g^{-1} MS desengordurada), declinando rapidamente aos 3 dias de germinação, sendo neste ponto encontrada a menor concentração de globulina (275 mg g^{-1} MS desengordurada). No 5º dia, o teor de globulina voltou a subir, diminuindo novamente aos 8 dias de germinação (Figura 8A).

A fração prolamina dos eixos embrionários de eritrina também apresentou o maior teor na semente quiescente, enquanto o menor valor foi encontrado no 3º dia de germinação, assim como observado para a fração globulina. Nos dias subsequentes, os teores de prolamina voltaram a se elevar, porém de forma sutil (Figura 8A).

Nos cotilédones de sementes quiescentes de *E. speciosa*, foi observada a menor quantidade de proteína da fração globulina, aumentando gradativamente nos demais dias, estabilizando ao 5º dia (Figura 8B). Os teores de prolamina nos cotilédones de eritrina foram baixos e apresentaram diferença significativa apenas no 3º dia de germinação.

As frações globulina e prolamina, de eixos embrionários e cotilédones, das duas espécies, foram analisadas por SDS-PAGE para verificação do perfil proteico durante a germinação.

Os perfis eletroforéticos das globulinas nos eixos embrionários e cotilédones de *C. echinata* podem ser observados na figura 9. Na fração globulina dos eixos embrionários foi possível visualizar proteínas com massa molecular variando entre 14 kDa e 97 kDa, após coloração com prata. Seis proteínas que apresentaram bandas de coloração mais intensa estão indicadas na figura 9A.

A banda I, de aproximadamente 97 kDa, não estava presente nos eixos embrionários de sementes quiescentes e com o início da embebição, esta foi observada, intensificando-se no 2º e 3º dias de germinação. Existem duas bandas de peso molecular pouco acima de 21 kDa, que foram indicadas como II e III. A banda II só é perceptível a partir do 3º dia de germinação, sendo que a banda III está presente em todo o período germinativo, sem alteração de intensidade. Por outro lado, a banda IV diminuiu de intensidade, sendo esta diminuição bem nítida a partir 3º dia de germinação. A banda V, no entanto, ausente no início da germinação, apareceu após o 5º dia, ficando mais intensa no 7º dia. Já a banda VI presente desde o início da germinação, apresentou diminuição de intensidade, não sendo detectada a partir do 3º dia de germinação.

O perfil proteico da fração globulina dos cotilédones de sementes de pau-brasil apresentou maior quantidade de bandas do que o perfil de eixos embrionários (Figura 9B), no entanto, observa-se também proteínas com peso molecular entre 97 e 21 kDa,

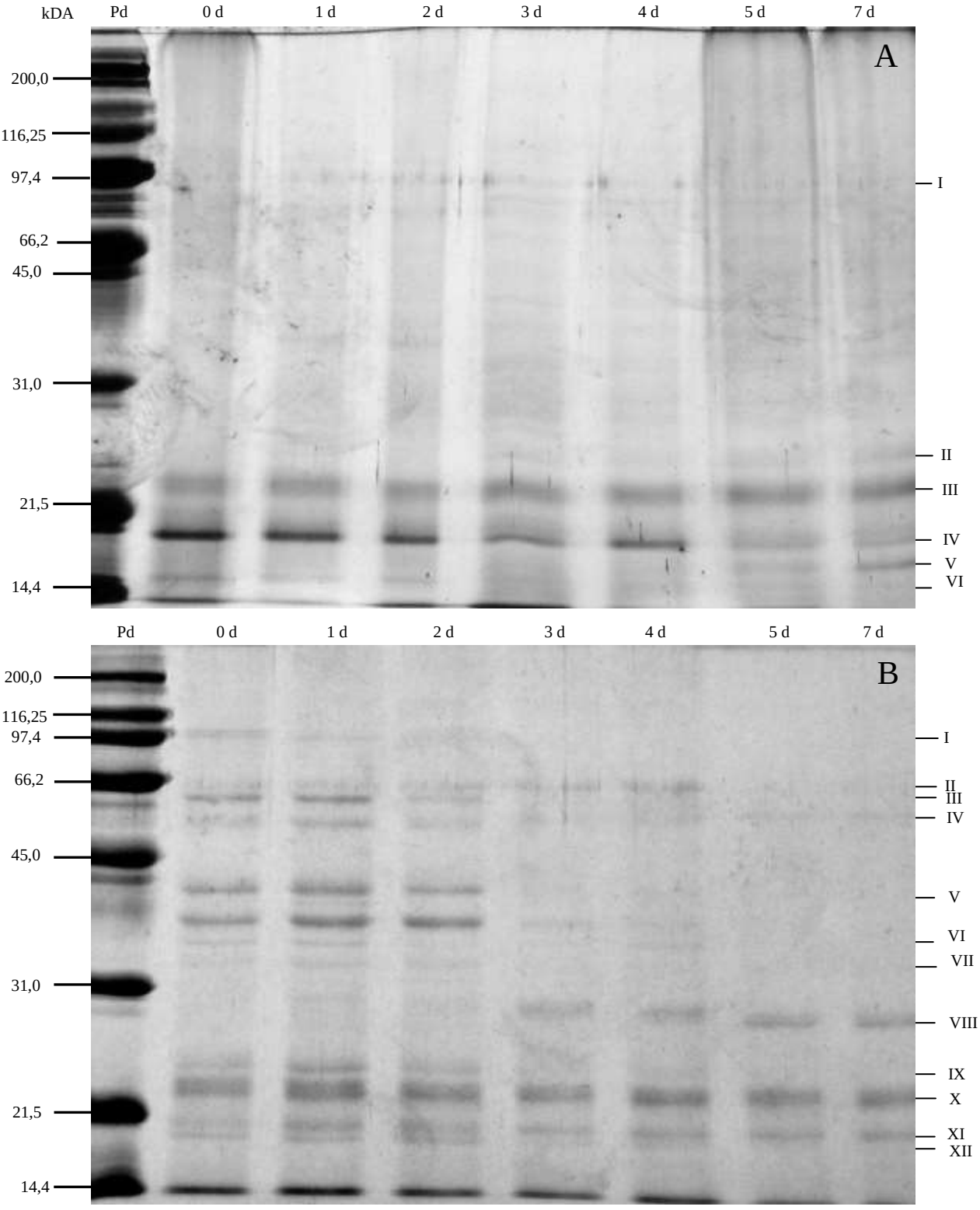


Figura 9. Perfil proteico da fração globulina nos eixos embrionários/ raízes (A) e cotilédones (B) de sementes de *Caesalpinia echinata* durante a germinação.

sendo mais nítidas as bandas de maior peso molecular neste tecido.

No início do experimento, observou-se maior número de bandas visíveis na fração globulina de cotilédones de pau-brasil (aproximadamente 14), sendo que algumas diminuíram de intensidade ao longo da germinação, sugerindo sua degradação, sendo as diferenças mais visíveis entre o 2º e 3º dia. A banda I, indicada na figura 9B, de aproximadamente 97 kDa, desapareceu com o início da embebição das sementes, não sendo mais visível no 2º dia de germinação. A banda II, inicialmente fraca, intensificou-se até o 4º dia, após o qual, desapareceu novamente. A banda III estava presente no cotilédone da semente quiescente, todavia, no 2º dia perdeu intensidade e nos demais dias do experimento quase não foi perceptível, da mesma forma que a banda IV.

As quatro bandas de massa molecular entre 31 e 45 kDa (bandas V, VI e VII) seguiram o perfil descrito acima. A banda VIII, de peso molecular próximo a 30 kDa, apareceu após o 3º dia de germinação, permanecendo até o 7º dia. A banda IX seguiu o padrão das bandas de peso molecular entre 31 e 45 kDa. As bandas X a XII, de peso molecular entre 21 e 14 kDa aparecem constantes durante o experimento e são similares às encontradas nos eixos.

Somente a fração prolamina de cotilédones de pau-brasil pôde ser analisada por SDS-PAGE, uma vez que a quantidade de proteína dos eixos embrionários foi insuficiente para as análises. O perfil de proteínas da fração prolamina dos cotilédones de *C. echinata* pode ser observado na figura 10. A fração prolamina apresentou o menor número de bandas (4 no total), variando entre 14 e aproximadamente 21 kDa.

A banda I diminuiu de intensidade a partir do 4º dia (Figura 10). A banda II, presente na semente quiescente, diminuiu de intensidade no início da germinação, mas, a partir do 2º dia, voltou a aumentar de intensidade nos dias 2 e 3, após o qual, novamente diminuiu a intensidade. A banda III teve sua intensidade aumentada com um dia de germinação, permanecendo até o 3º dia, desaparecendo praticamente após esse período. A banda IV foi intensa do 1º até o 4º dia, sendo que ao 5º dia, esta banda desapareceu.

Na figura 11A estão representados os perfis da fração globulina de cotilédones e eixos embrionários das sementes de *E. speciosa* ao longo da germinação e na figura 11B, os perfis de prolamina. De forma similar ao observado em sementes de pau-brasil, a fração globulina foi a que apresentou o maior número de bandas, em ambos os tecidos analisados. Ao contrário do que foi observado nas sementes de pau-brasil, as bandas

protéicas dos cotilédones de eritrina aumentaram de intensidade ou mantiveram-se constantes ao longo da germinação, estando presentes durante o processo.

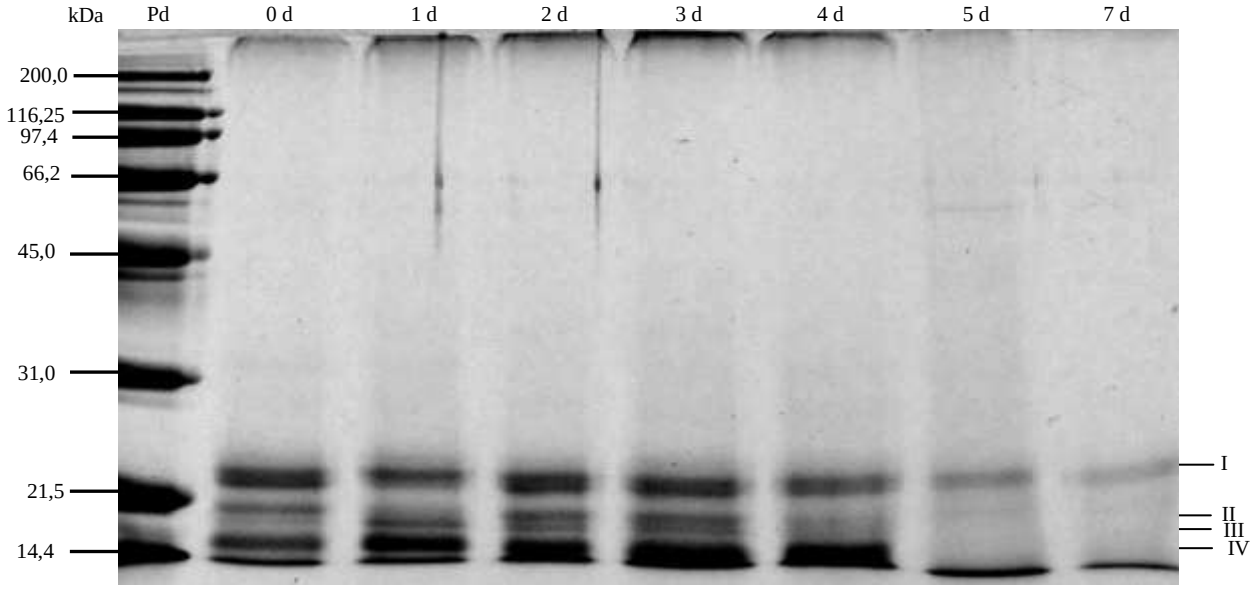


Figura 10. Perfil proteico da fração prolamina de cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* durante a germinação.

Nos cotilédones, a fração globulina apresentou cerca de 19 bandas, mas são destacadas na figura 11A, dez bandas. A banda I (97 kDa) está presente desde as sementes quiescentes, até o fim do experimento, assim como a banda II (66 kDa), porém apresentou coloração mais intensa no 3º dia de germinação.

A banda 3, com peso molecular entre 45 e 66 kDa, mostrou-se intensa durante todo o experimento, enquanto que as bandas de IV até IX intensificaram-se com o início da germinação, mantendo-se constantes até o final. A banda X, por outro lado, mostrou-se mais forte a cada dia analisado.

Bandas de maior peso molecular (aproximadamente 31 kDa) foram visíveis somente no perfil dos cotilédones de sementes germinadas por 5 dias.

A fração prolamina das sementes de eritrina (11B) apresentou menor quantidade de bandas quando comparada aos cotilédones de sementes de pau-brasil, destacando-se uma banda com valor aproximado de 20 kDa. Nos cotilédones, essa banda ficou mais intensa no decorrer da germinação, já nos eixos embrionários, ocorreu

o inverso. Bandas de maior peso molecular (aproximadamente 31 kDa) foram visíveis somente no perfil dos cotilédones de sementes germinadas por 5 dias.

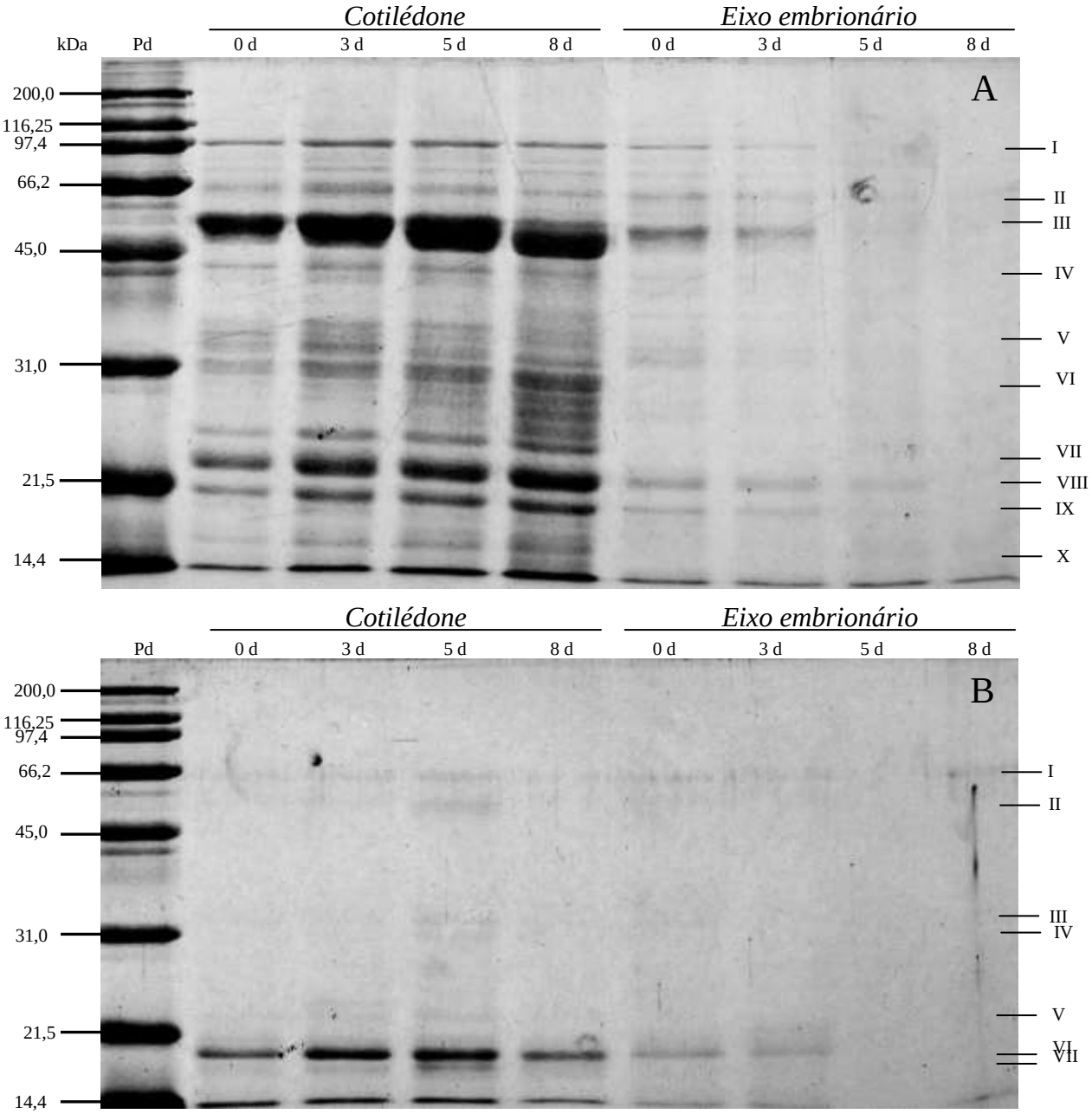


Figura 11. Perfil proteico das frações globulina (A) e prolamina (B) de sementes de *Erythrina speciosa* durante a germinação.

Discussão

Os teores de carboidratos solúveis dos cotilédones de sementes quiescentes das duas espécies foram bastante similares e apresentaram redução ao longo da germinação, sendo 62,5% em pau-brasil e 46,4% em eritrina, porém ao final do processo as duas espécies apresentaram teores semelhantes. Quanto aos eixos embrionários, apenas os de pau-brasil apresentaram redução no teor de carboidratos solúveis (17,7%) ao longo da germinação. Ao contrário do que foi observado neste trabalho, em *Erythrina caffra* houve aumento de cinco vezes nos teores de carboidratos solúveis (Nkang 2002), enquanto em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (sibipiruna) também houve redução de mais de três vezes nesses compostos (Corte *et al.* 2006) ao longo da germinação.

Em sementes de milho, nas primeiras 24 horas de embebição, não foram observadas alterações nos teores de açúcares redutores (Sánchez-Linares *et al.* 2012), da mesma forma que nas sementes de *C. echinata* e *E. speciosa*. Estas só foram perceptíveis para pau-brasil no 2º dia, nos eixos embrionários, e no 5º dia nos cotilédones. Por outro lado, em eritrina, houve incremento no teor de açúcares redutores no 5º dia nos eixos, não sendo observada alteração na quantidade destes açúcares nos cotilédones. Igualmente, Alencar *et al.* (2012) observaram aumento de açúcares redutores nos eixos de sementes de *Cereus jamacaru* (Cactaceae) ao 5º dia de germinação e ao 6º dia nos cotilédones, porém a mudança significativa nesses açúcares ocorreu exclusivamente nos eixos, apresentando um incremento final de 3 vezes os valores iniciais. Em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Leguminosae), também houve aumento nos teores de açúcares redutores dos eixos embrionários após o 3º dia de germinação (Pontes *et al.* 2002).

O aumento dos açúcares livres pode ser explicado pela hidrólise da sacarose, comprovada pela redução acentuada desse dissacarídeo, principalmente nos eixos embrionários de pau-brasil. De acordo com Sánchez-Linhares *et al.* (2012) a rápida redução nos teores de sacarose se deve ao fato dela ser eficientemente metabolizada, servindo provavelmente como fonte energética para o crescimento do eixo embrionário.

Os níveis de oligossacarídeos da série da rafinose (OSR) apresentaram redução nos cotilédones de pau-brasil a partir do 2º dia de germinação e nos eixos, após o 2º e 3º dias (rafinose e estaquiose, respectivamente). De acordo com Bewley & Black (1994) os OSR são rapidamente consumidos logo após a embebição das sementes, como

enfatizado por Górecki & Obendorf (1997) e evidenciado nos eixos embrionários de soja e ervilha nos dois primeiros dias de embebição.

É interessante destacar que em sementes de *E. speciosa*, que apresentam altos valores de OSR, estes foram mobilizados apenas após o 4° dia de germinação, sendo completamente consumidos no 5º dia.

Borges *et al.* (2006) relatam a ocorrência nas sementes de *C. echinata* de pinitol, D-*chiro*-inositol e *myo*-inositol entre os ciclitóis galactosilados e estes são geralmente consumidos durante o início da germinação (Górecki & Obendorf 1997); no entanto, não foram observadas alterações nesses açúcares nos cotilédones de *C. echinata* e nos eixos, os teores oscilaram e retornaram aos valores iniciais no final do período analisado. Eixos de eritrina apresentaram, ainda, aumento desses açúcares.

O amido, um dos principais constituintes das sementes de pau-brasil não foi alterado nos cotilédones durante a germinação e nos eixos embrionários diminuiu, após um aumento inicial, atingindo valores mínimos ao final do experimento. Aparentemente não houve hidrólise do amido cotiledonar, pois as reservas presentes nos eixos possivelmente foram suficientes para prover energia para o desenvolvimento inicial ou a hidrólise da sacarose e a degradação de proteínas foi suficiente para suprir a demanda energética.

Além do elevado teor de lipídio (ca. 16%), previamente reportado para as sementes das duas espécies (Mello *et al.* 2010), no presente trabalho foram encontradas grandes proporções de proteínas nessas sementes, sendo expressas por mg g^{-1} MS desengordurada. Em *C. echinata* há 7% de proteínas nos eixos embrionários e 17,6% nos cotilédones, enquanto que em *E. speciosa* há 12,3% nos eixos embrionários e 23,3% nos cotilédones. Esses valores são coerentes com os que foram encontrados em *C. peltophoroides*, em que 7,7% da massa seca dos cotilédones é constituída por proteínas (Corte *et al.* 2006). Em *E. fusca* e *E. indica* as proteínas constituem de 32-38% das sementes (Prakash & Misra 1987). É importante ressaltar que não foi realizada quantificação de proteínas totais no presente trabalho, sendo que uma das frações (glutelinas) não pode ser dosada, o que poderia resultar em valores ainda mais elevados de proteínas para as duas espécies estudadas.

Aparentemente essas proteínas são consumidas durante a germinação já que as globulinas diminuíram nas sementes de pau-brasil e nos eixos embrionários de eritrina. No entanto, nos cotilédones de eritrina estas aumentaram após o 3º dia de germinação, quando as sementes apresentavam-se germinadas. Em leguminosas, as globulinas

representam a maior parte das proteínas de reserva (Derbyshire *et al.* 1976 *apud* Amaral *et al.* 2001), sendo sua principal função, o fornecimento de aminoácidos ou nitrogênio para as plântulas em desenvolvimento (Mayer & Poljakoff-Mayber 1989). Desta forma, a alta quantidade de globulina encontrada no final do processo de germinação e no início do desenvolvimento das plântulas nas espécies estudadas, principalmente nos cotilédones, está de acordo com o esperado.

Os teores de prolamina não foram alterados durante a germinação de sementes de *C. echinata*, sendo observadas apenas pequenas flutuações nos cotilédones de *E. speciosa*. Alencar *et al.* (2012) e Dantas *et al.* (2008 a,b) também observaram poucas variações nos teores de prolamina durante a germinação das sementes de várias espécies de Leguminosae por eles estudadas.

A redução das globulinas em sementes de *C. echinata*, principalmente após o 3º dia de germinação foi observada, também, no perfil eletroforético destas, principalmente de proteínas com peso molecular acima de 31 kDa, nos cotilédones. Para cotilédones de *E. speciosa*, a quantificação de globulina também está de acordo com o encontrado no perfil proteico, onde se observa o aumento de intensidade das bandas com o passar da germinação e a redução destas nos eixos embrionários.

Por outro lado, o teor de prolaminas dos cotilédones não apresentou diferença estatística entre o início e o fim do experimento; no entanto, poucas bandas proteicas e de baixa intensidade foram observadas nos géis ao final do experimento. A quantificação de prolamina em eritrina apresentou pequenas flutuações, enquanto no perfil proteico, estas foram reduzidas ao longo da germinação.

O perfil dessas proteínas, especialmente das de baixo peso molecular é compatível com o observado em prolaminas de cereais extraídas com solução alcoólica na presença de agente redutor. Embora não seja relatada a presença de prolaminas em leguminosas, e alguns autores descrevam as prolaminas como exclusivas de cereais e gramíneas (Shewry *et al.* 1995), estas foram bastante abundantes em sementes de pau-brasil e apresentaram o perfil típico desta classe de proteínas com predominância de proteínas com peso molecular entre 14 e 27 kDa.

Abbade & Takaki (2012), analisando proteínas totais durante a germinação de *Tabebuia roseo-alba* (ipê), observaram aumento nas proteínas de 88, 41 e 13 kDa e redução de proteínas de 36 e 15 kDa. Embora não seja possível afirmar que estas mesmas proteínas tenham sido observadas no presente estudo, em eixos de pau-brasil, uma proteína de aproximadamente 15 kDa também apresentou redução e em

cotilédones desta mesma espécie, uma proteína de peso molecular aproximado de 41 kDa mostrou resultado contrário ao observado em ipê por esses autores.

Já para eritrina, nos cotilédones também foi possível fazer uma associação com a proteína de 88 kDa reportada por Abbade & Takaki (2012) e a encontrada no presente estudo, assim como a de 41 kDa. Uma proteína com peso molecular aproximado de 36 kDa, foi reduzida em quantidade ao longo da germinação das sementes de ipê, enquanto a de eritrina mostrou incremento. Stacey *et al*. (2002) relataram, após isolar uma proteína de 41 kDa de *Hordeum vulgare* (cevada), que esta estaria relacionada com a mobilização de proteínas de reserva em sementes durante a germinação, o que também poderia ocorrer nas espécies analisadas no presente trabalho.

Num panorama geral, como era esperado, as maiores alterações durante a germinação de sementes de pau-brasil, ocorreram nos cotilédones, havendo redução de sacarose, com consequente aumento de carboidratos solúveis e redução expressiva de globulinas. Os cotilédones de eritrina, por outro lado, apresentaram redução de carboidratos solúveis e um pequeno aumento de globulina, enquanto nos eixos embrionários, as maiores alterações foram observadas nos teores de proteínas, tanto das globulinas, quanto das prolaminas.

Em ambas as espécies, as reservas cotiledonares foram mobilizadas tardiamente durante a germinação, provavelmente para o desenvolvimento das plântulas, o que ocorre nas duas espécies por volta do 10º dia de germinação. Dentre as reservas consumidas preferencialmente no início da germinação destaca-se a sacarose em pau-brasil e as globulinas, em eritrina.

Sementes de pau-brasil e eritrina são tolerantes à dessecação, mas esta tolerância é possivelmente perdida com o início da germinação, passando a se comportar como sementes recalcitrantes, como sugerido por Faria *et al*. (2005) para sementes de *Medicago truncatula*. O alongamento radicular decorrente da embebição e reativação do metabolismo e do ciclo celular podem resultar na sensibilidade à dessecação ou a perda total desta durante o processo germinativo (Guimarães *et al*. 2011).

Sementes de *C. echinata* no início do processo germinativo (radícula de até 4 mm) são capazes de tolerar a dessecação e continuar o crescimento radicular quando re-hidratadas. Esse tamanho de raiz primária é observado a partir de 26h de embebição, estendendo-se até cerca de 44h, quando as radículas de quase 100% do lote germinante atingem esse comprimento. No entanto, essa capacidade de sobreviver à retirada de

água após o início da germinação é perdida rapidamente nessas sementes. Com 5 mm de radícula, a taxa de sobrevivência das sementes germinantes cai drasticamente (Silva 2010). Uma vez que o tempo de embebição e o início da germinação das sementes de pau-brasil são muito rápidos, o tempo necessário para as radículas passarem de 4 mm de comprimento para 5 mm é extremamente curto, o que faz com que o processo de perda de tolerância à dessecação seja muito rápido e de difícil detecção.

Embora não se saiba o momento em que as sementes de eritrina perdem a tolerância à dessecação após o início da germinação, este não deve ser muito diferente do observado para sementes de pau-brasil, uma vez que as duas apresentaram desenvolvimento muito semelhantes (dados não mostrados). A grande quantidade de OSR nas sementes de eritrina poderia aumentar a tolerância à dessecação, já que esses açúcares protegem sementes de outras espécies durante o processo de dessecação natural (Peterbauer & Richter 2001). No presente trabalho observou-se que os OSR das sementes de *E. speciosa* foram completamente metabolizados somente após cerca de 4-5 dias de germinação. Desta forma, levanta-se a hipótese de que as sementes de *E. speciosa* apresentam maior tolerância à perda da capacidade de sobreviver à dessecação após o início da germinação e este fato poderia estar associado às reservas de carboidratos, lipídios e proteínas dessas sementes.

Referências bibliográficas

Abbade, L. C. & Takaki, M. 2012. Mobilisation of reserves during germination of seeds of *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniacea). Seed Science & Technology 40: 259-264.

Alencar, N. L. M., Innecco, R., Gomes-Filho, E., Gallão, M. I., Alvarez-Pizarro, J. C., Prisco, J. T. & Oliveira, A. B. 2012. Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of *Cereus* jamacaru D.C. ssp. *Jamacaru* (Cactaceae). Anais da Academia Brasileira de Ciências 84: 823-832.

Amaral, L. I. V., Gaspar, M., Costa, P. M. F., Aidar, M. P. M. & Buckeridge, M. S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. Hoehnea 34: 425-431.

Amaral, L. I. V., Pereira, M. F. D. A. & Cortelazzo, A. L. 2001. Formação das substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L. – Bixaceae). Acta Botanica Brasilica 15: 125-132.

Bewley, J. D. & Black, M. 1994. Seeds: Physiology of development and germination. Plenum Press, New York, London.

Borges, I. F., Barbedo, C. J., Richter, A. A. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. F. 2006. Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of Brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae). Brazilian Journal of Plant Physiology 18: 475-482.

Borek, S., Kubala, S., Kubala S. & Ratajczak L. 2011. Comparative study of storage compound breakdown in germinating seeds of three lupine species. Acta Physiol Plant 33: 1953-1968.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Carvalho, N. M., Demattê, M. E. S. P. & Graziano, T. T. 1980. Germinação de sementes de essências florestais nativas. I. suinã ou mulungu (Erythryna speciosa Andr.). Revista Brasileira de Sementes 2:81-7.

Corte, V. B., Lima e Borges, E. E., Pontes, C. A., Leite, I. T. A., Ventrella, M. C. & Mathias, A. A. 2006. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). Revista Árvore 30: 941-949.

Dantas, B. F., Correia, J. S., Marinho, L. B. & Aragão, C. A. 2008. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.). Revista Brasileira de Sementes 30: 221-227.

Dantas, B. F., Soares, F. S. J., Lúcio, A. A. & Aragão, C. A. 2008(b). Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). Revista Brasileira de Sementes 30: 214-219.

Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-355.

Faria, J. M. R., Buitink, J., van Lammeren, A. A. M. & Hilhorst, H. W. M. 2005. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. Journal of Experimental Botany 56: 2119–2130.

Franzen, J. J. & Haas, M. M. 1991. Vitamin E content during development of some seedlings. Phytochemistry 30: 2911-2913.

Górecki R. J. & Obendorf, R. L. 1997. Galactosyl cyclitols and rafinose family oligosaccharides in relation to desiccation tolerance of pea and soybean seedlings. In: Ellis, R. H., Black, M., Murdoch, A. J. & Hong, T. D. (eds). Basic and applied aspects of seed biology, pp. 119-128.

Guimarães, C. C., Rocha, J. M. F., Oliveira, J. M. & Silva, E. A. A. 2011. Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. Revista Brasileira de Sementes 33: 207-215.

Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. & Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends in Plant Science 6: 431-438.

Landry, J., Delhaye, S. & Damerval, C. 2000. Improved method for isolating and quantitating alpha-amino nitrogen as nonprotein, true protein, salt-soluble proteins, zeins and true glutelins in maize endosperm. Cereal Chemistry 77: 620-626.

Mayer, A. M. & Poljakoff-Mayber, A. 1989. The germination of seeds. Pergamon Press, McMillan, New York. 270p.

Mello, J. I. O. & Barbedo, C. J. 2007. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae – Caesalpinioideae). Revista Árvore 31: 645-655.

Mello, J. I. O., Barbedo, C. J., Salatino, A. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2010. Reserve carbohydrates and lipids from seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. Brazilian Archives of Biology and Technology 53:889-899.

Mello, J. I. O., Centeno, D. C., Barbedo, C . J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2011. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. Seed Science & Technology 39: 465-480.

Molizane, D. M. 2012. Estabelecimento e superação de dormência em sementes de *Erythrina speciosa* Andrews. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 77p.

Nkang, A. 2002. Carbohydrate composition during seed devlopment and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). Journal of Plant Physiology 159: 473-483.

Peterbauer, T. & Richter, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. Seed Science Research 11: 185-197.

Pontes, C. A., Lima e Borges, E. E., Borges, R. C. G. & Soares, C. P. B. 2002. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. (garapa) durante a embebição. Revista Árvore 26: 593-601.

Prakash, D. & Misra, P. S. 1987. Protein and amino acid composition of some wild leguminous seeds. Plant Foods for Human Nutrition 37: 29-32.

Sánchez-Linares, L., Gavilanes-Ruíz, M., Díaz-Pontones, D., Guzmán-Chávez, F.,*et al.* Calzada-Alejo, V., Zurita-Villegas, V., Luna-Loaiza, V., Moreno-Sánchez, R., Bernal-Lugo, I. & Sánchez-Nieto, S. S. 2012. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. Journal of Experimental Botany 63(12): 4513-4526.

Shewry, P. R., Napier, J. A. & Tatham, A. S. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. The Plant Cell 7: 945-956.

Silva, J. P. N. 2010. Mecanismos de controle de tolerância à dessecação em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) e *Caesalpinia peltophoroides* Benth (sibipiruna). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 122p.

Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. Journal of Biological Chemistry 160: 61-63.

Stacey, G., Koh, S., Granger, C. & Becker, J. M. 2002. Peptide transport in plants. Trends in Plant Science 7: 257-263.

Considerações finais

O congelamento de sementes de pau-brasil possibilitou a manutenção da viabilidade destas por 5 anos, resultado extremamente importante uma vez que a espécie apresenta produção anual de sementes, que pode variar em quantidade e qualidade de um ano para outro, bem como em diferentes populações e regiões distintas.

A espécie símbolo do país não é encontrada naturalmente no Estado de São Paulo, no entanto, esta é a região em que foi observado o maior número de iniciativas de conservação da espécie e de onde foram coletadas sementes para o presente trabalho. Estas foram obtidas de populações plantadas existentes em duas regiões do Estado de São Paulo, com distintas condições climáticas (Rocha 2004), o que pode ter afetado a maturação e outras características fisiológicas das sementes.

Em Mogi-Guaçu, as sementes de pau-brasil foram dispersas com cerca de 65 dias, enquanto que as de Jaú foram dispersas com cerca de 55 dias. Além da diferença no tempo de dispersão, a porcentagem de germinação das sementes dispersas na população de Jaú foi inferior à encontrada nas sementes de Mogi-Guaçu. Os principais compostos de reserva dessas sementes (carboidratos solúveis, amido e proteínas) também diferiram em quantidade e dinâmica durante o armazenamento em temperaturas ambiente e sub-zero.

Sementes de pau-brasil provenientes de Jaú apresentaram maior teor de carboidratos solúveis e maior proporção de prolamina do que globulina, o que não foi observado nas sementes de Mogi-Guaçu, assim como em sementes de outras espécies leguminosas já estudadas (Derbyshire *et al.* 1976). Destaca-se, também, um padrão diferente nas alterações de carboidratos em função da secagem e do armazenamento, quando comparadas sementes das duas procedências.

As condições climáticas encontradas na região de Jaú podem ter afetado o desenvolvimento completo das sementes de pau-brasil, sendo estas dispersas ainda em estágio imaturo, o que explicaria a intolerância à dessecação e baixa germinabilidade observadas em dois anos de avaliação nessa localidade.

Sementes de *E. speciosa* foram menos estudadas do que as sementes de pau-brasil e mostraram-se interessantes para os estudos de tolerância à dessecação, devido a presença de elevadas quantidades de oligossacarídeos da série da rafinose (cerca de 75% dos açúcares solúveis), maturação relativamente curta (cerca de 2 meses) e rápida

germinação (aproximadamente 10 dias para início do desenvolvimento de plântula) e almpla estabilidade fisiológica durante o armazenamento em diferentes condições.

Dessa forma, a análise comparativa entre sementes de pau-brasil e eritrina realizada neste trabalho foi interessante e evidenciou que os compostos de reserva de ambas foram consumidos inicialmente de maneira diferente, podendo ser um indicativo de que as proteínas, em eritrina, e os carboidratos solúveis, em pau-brasil, estão relacionados com a aquisição e a perda da tolerância à dessecação nessas espécies, como amplamente sugerido na literatura para outras sementes (Bewley & Black 1994).

No presente trabalho foram quantificados os teores de ácido abscísico em sementes recém-dispersas de pau-brasil e eritrina. Tal regulador representa outro importante componente relacionado à tolerância à dessecação de sementes, sendo necessário, contudo, uma análise completa de ABA nas espécies estudadas a fim de avaliar o papel deste regulador no comportamento ortodoxo e na armazenabilidade das sementes. Igualmente, a presença de proteínas específicas durante a germinação e armazenamento das sementes de pau-brasil e eritrina evidenciou a importância dessas na estabilidade do embrião e na necessidade da presença de compostos protetores nos processos de dessecação e re-hidratação.

Resumo geral

Compostos como proteínas, ácido abscísico (ABA) e carboidratos solúveis, incluindo os oligossacarídeos da série da rafinose (OSR) são acumulados nas sementes durante o processo de maturação, sendo utilizados como fonte de energia e carbono no início da germinação. Além disso, esses compostos podem conferir proteção e tolerância às sementes contra eventuais danos causados pela dessecação e armazenamento. O acúmulo destes e de outros compostos se dá a partir da fase intermediária do desenvolvimento das sementes, variando de quantidade ao longo da maturação. Sementes ortodoxas em estágio imaturo, com elevado teor de água, podem apresentar alta germinação e serem capazes de tolerar a dessecação. Contudo, após o início da germinação, essas sementes perdem a tolerância à dessecação. Sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) são ortodoxas, mas perdem a viabilidade em um mês, se armazenadas em temperatura ambiente. Essas sementes são melhor armazenadas quando secas até 8% de teor de água e mantidas em baixas temperaturas. A dispersão das sementes de pau-brasil, na região de Mogi-Guaçu (SP), se dá por volta de 65 dias após a antese (DAA), no entanto, aos 55 DAA já se apresentam tolerantes à dessecação e com alta porcentagem de germinação. No presente trabalho, a germinação das sementes de *C. echinata* (pau-brasil) armazenadas a 2 e 8 °C foi mantida por até 12 meses, havendo redução drástica de qualidade após este período. No entanto, essas sementes apresentaram cerca de 60% de germinação após 60 meses (5 anos) de armazenamento a -18 °C. Em outro experimento, sementes de *C. echinata* coletadas em Jaú (SP) já se encontravam próximo ao ponto de dispersão aos 55 DAA. A germinação de sementes das duas idades (45 e 55 DAA) foi superior a 95%. Ao serem submetidas à dessecação, essas sementes não sobreviveram, principalmente as imaturas. A análise dos compostos de reserva das sementes de Jaú (SP) mostrou quantidade superior à relatada na literatura no que se refere aos teores de carboidratos solúveis nas sementes das duas idades. Durante o armazenamento, houve redução desses teores. Foram constatadas altas concentrações de globulinas e prolaminas, destacando-se proteínas de 22 e 66 kDa, reportadas como importantes em processos de mobilização de proteínas de reserva e tolerância à dessecação. Sementes de *E. speciosa* (eritrina) também são ortodoxas e foram classificadas em 6 estádios durante a maturação. No 3° estádio, essas já apresentavam germinação máxima, no entanto foram parcialmente tolerantes à dessecação, enquanto que as sementes do estádio 4 eram totalmente tolerantes.

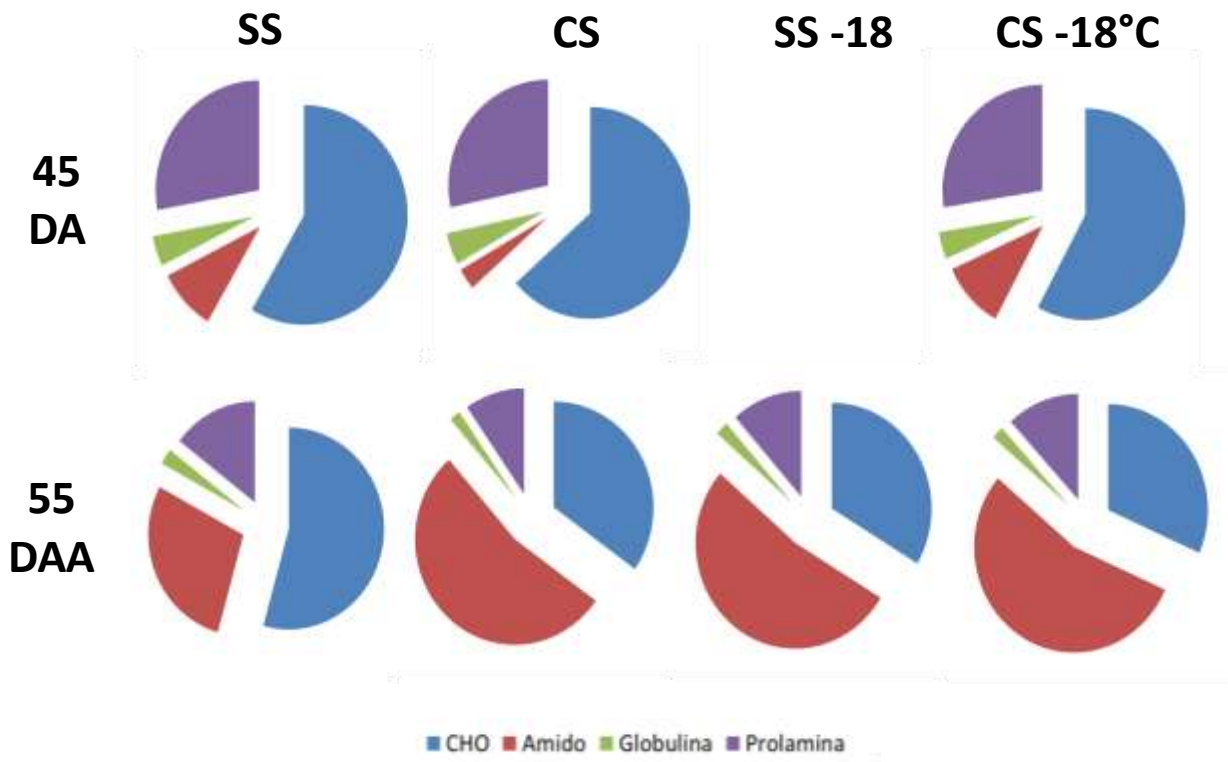
Analisando-se os teores de ABA nas sementes de eritrina nos estádios 4 e 6, as imaturas apresentaram quantidades superiores às maduras, sendo encontrados teores maiores nos cotilédones. Sementes do estádio 4 foram dessecadas, havendo redução nos teores de ABA nos cotilédones. O congelamento das sementes imaturas sem secagem ocasionou aumento de ABA, mas as sementes não sobreviveram. Sementes maduras de pau-brasil apresentaram teores de ABA superiores aos encontrados em eritrina, sendo aumentados após armazenamento em temperatura ambiente, sem, contudo haver germinação. Sementes de eritrina com alto teor de água não toleraram congelamento e as de pau-brasil não toleraram armazenamento em temperatura ambiente. As sementes das duas espécies foram estudadas quanto à mobilização dos compostos de reserva durante as etapas iniciais do processo germinativo. Em *C. echinata* os carboidratos solúveis acumulados nos cotilédones diminuíram ao longo da germinação, enquanto nos eixos houve redução do amido e dos OSR, e consumo total de sacarose. Nas sementes de eritrina os açúcares dos cotilédones diminuíram, enquanto os dos eixos aumentaram. A sacarose diminuiu e os OSR foram completamente consumidos. As globulinas foram mobilizadas durante a germinação das sementes de pau-brasil e em eritrina houve mobilização de globulinas e prolaminas apenas nos eixos embrionários.

Summary

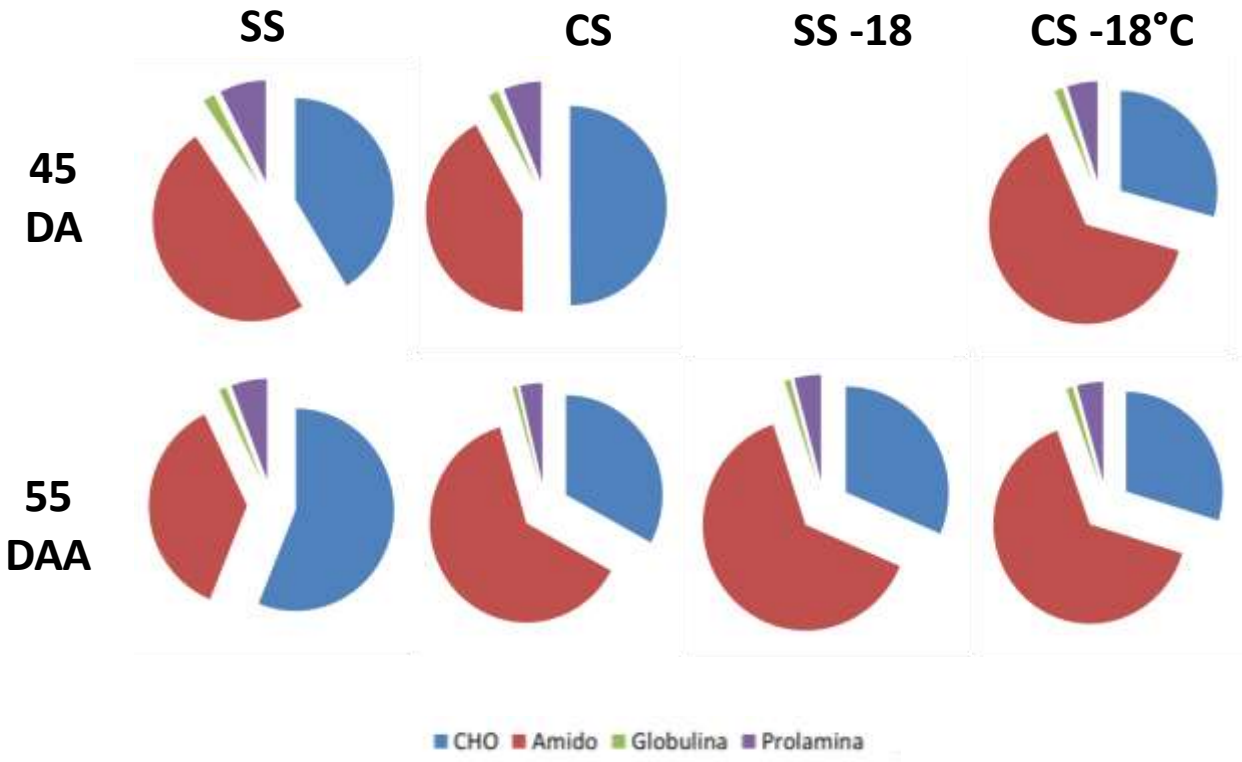
Compounds as proteins, abscisic acid (ABA) and soluble carbohydrates, including oligosaccharides raffinose series (OSR) are accumulated in seeds during the process of maturation, been used as energy and carbon source in the beginning of germination. Besides these compounds may provide protection to the seeds and tolerance against any damage caused by desiccation and storage. The accumulation of these and other compounds happens from the intermediate stage of seed development, varying quantities along the maturation, when seeds can be dispersed after reduction of the compound, such as ABA. Orthodox seeds in immature stage, with high water content, can have high germination and be able to tolerate desiccation. However, after initiation of germination the seeds lose desiccation tolerance. *Caesalpinia echinata* (brazilwood) are orthodox, but lose their viability in a month if stored at room temperature. These seeds are best stored when dried up to water content of 8% and maintained at low temperatures. Seed dispersal of brazilwood, in the region of Mogi-Guaçu (SP), occurs around 65 days after anthesis (DAA), however, at 55 DAA already have tolerant to desiccation and a high percentage of germination. In this study, the temperatures of +2 to +8 ° C maintained the germination of brazilwood for up to 12 months, with a drastic reduction in quality after this period. However, the brazilwood seeds showed about 60% germination after 60 months of storage in sub-zero temperatures (-18 ° C). In another experiment, *C. echinata* seeds collected in Jau (SP) were already near the point spread at 55 DAA, being considered mature when compared to 45-DAA seed of the same origin or with those of 65 DAA, collected in Mogi-Guaçu. The germination in both ages (45 and 55 DAA) was superior to 95%. When submetted to desiccation, those seeds did not survive, mainly the imamature seeds. The analysis of Jau seed compounds showed higher amount than that reported in the literature in relation to soluble carbohydrates in the seeds of both ages. During storage, these levels were reduced, it were also find high concentrations of globulins and prolamins, standing out molecular weight proteins near 22 and 66 kDa, reported in the literature as important in the processes of mobilization of storage proteins and desiccation tolerance. . *Erythrina speciosa* (eritrina) seeds are also orthodox and their seeds were classified into six stages during maturation. In the 3rd stage, these seeds showed maximum germination, however were partially tolerant to desiccation, while the seeds of stage 4 were totally tolerant. Analyzing the ABA contents in eritrina seeds in stages 4 and 6, the immature showed higher amounts to

mature, and higher levels in the cotyledons. Seeds of stage 4 were desiccated and with the removal of water, was observed a reduction in the ABA concentration in the cotyledons. The freezing of immature seeds without previous drying caused an increase in levels of ABA, but the seeds did not survive. In mature seeds of brazilwood, ABA levels were higher than those found in eritrina seeds and when stored at room temperature these seeds presented increase in the levels of ABA, without however having germination. Eritrina seeds with high water content did not tolerate freezing and mature seeds of brazilwood not tolerate storage at room temperature. The seeds of both species were studied for reserve compounds mobilization during the early stages of germination. In *C. echinata* seeds soluble carbohydrates accumulate in the cotyledon decreased during germination, while the axes were observed decreased the in the starch and OSR levels, and total consumption of sucrose. In cotyledon of eritrina seed soluble sugars decreased, while in the axis, those coumponds increased. The sucrose level decreased and OSR´s were completely consumed. The globulins were mobilized during germination of brazilwood´s, while in eritrina´s was great mobilization of globulins and prolamins only in embryonic axes.

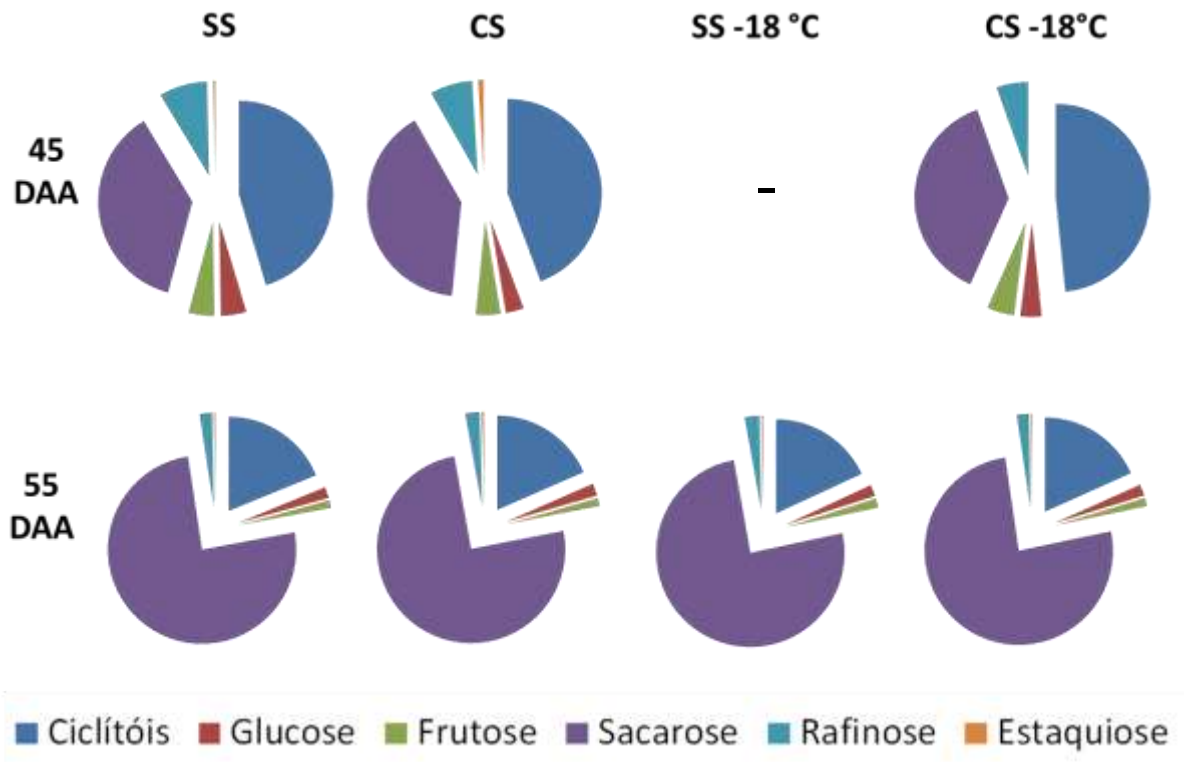
Anexos



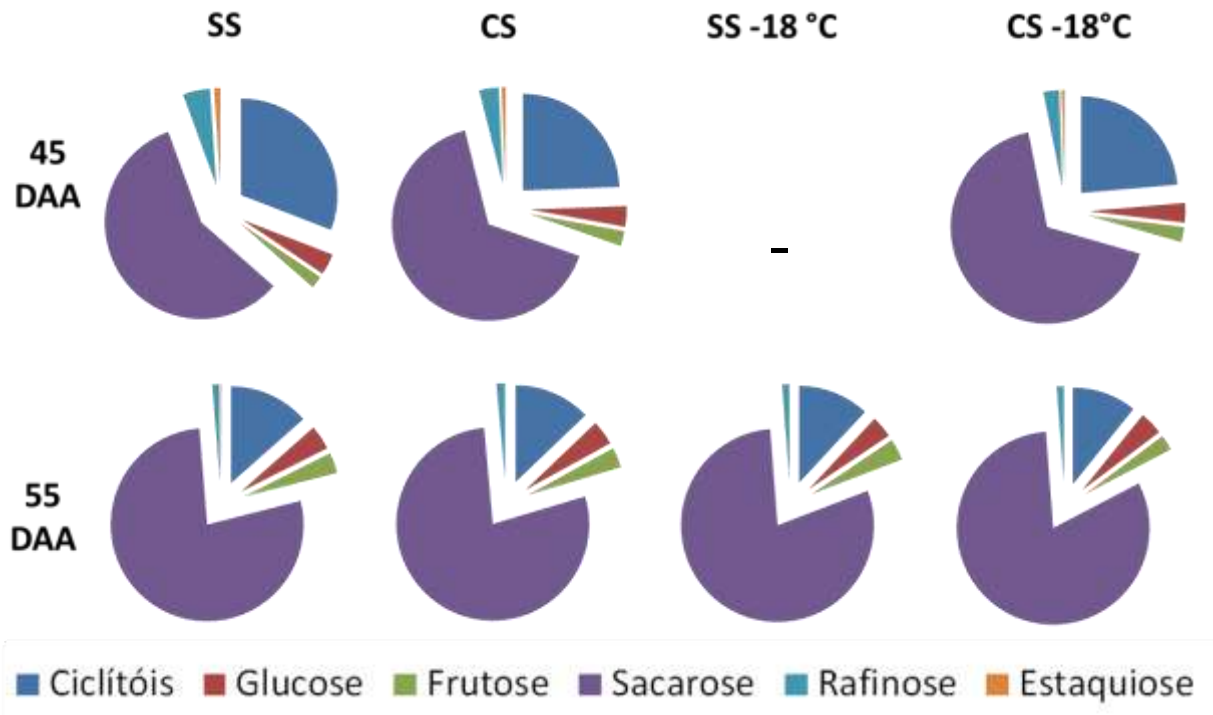
Anexo 1. Gráficos de proporção relativa de carboidratos solúveis totais (CHO), amido e frações globulina e prolamina de eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* com 44 e 55 DAA antes (SS) e após secagem (CS) e após armazenamento a -18 °C antes (SS -18 °C) e após secagem (CS -18 °C), referente ao capítulo II "Dinâmica dos compostos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* em duas fases de maturação armazenadas em temperatura sub-zero".



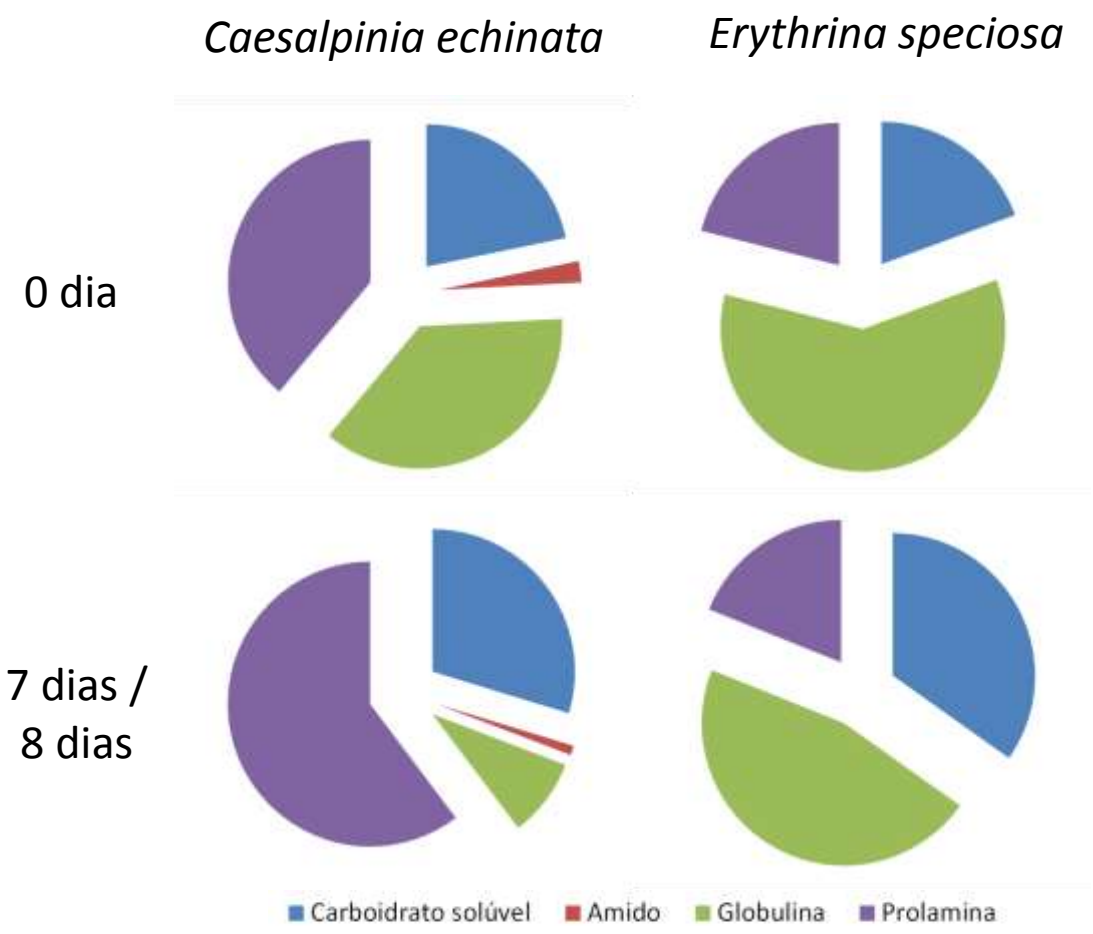
Anexo 2. Gráficos de proporção relativa de carboidratos solúveis totais (CHO), amido e frações globulina e prolamina de cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 44 e 55 DAA antes (SS) e após secagem (CS) e após armazenamento a -18 °C antes (SS -18 °C) e após secagem (CS -18 °C), referente ao capítulo II "Dinâmica dos compostos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* em duas fases de maturação armazenadas em temperatura sub-zero".



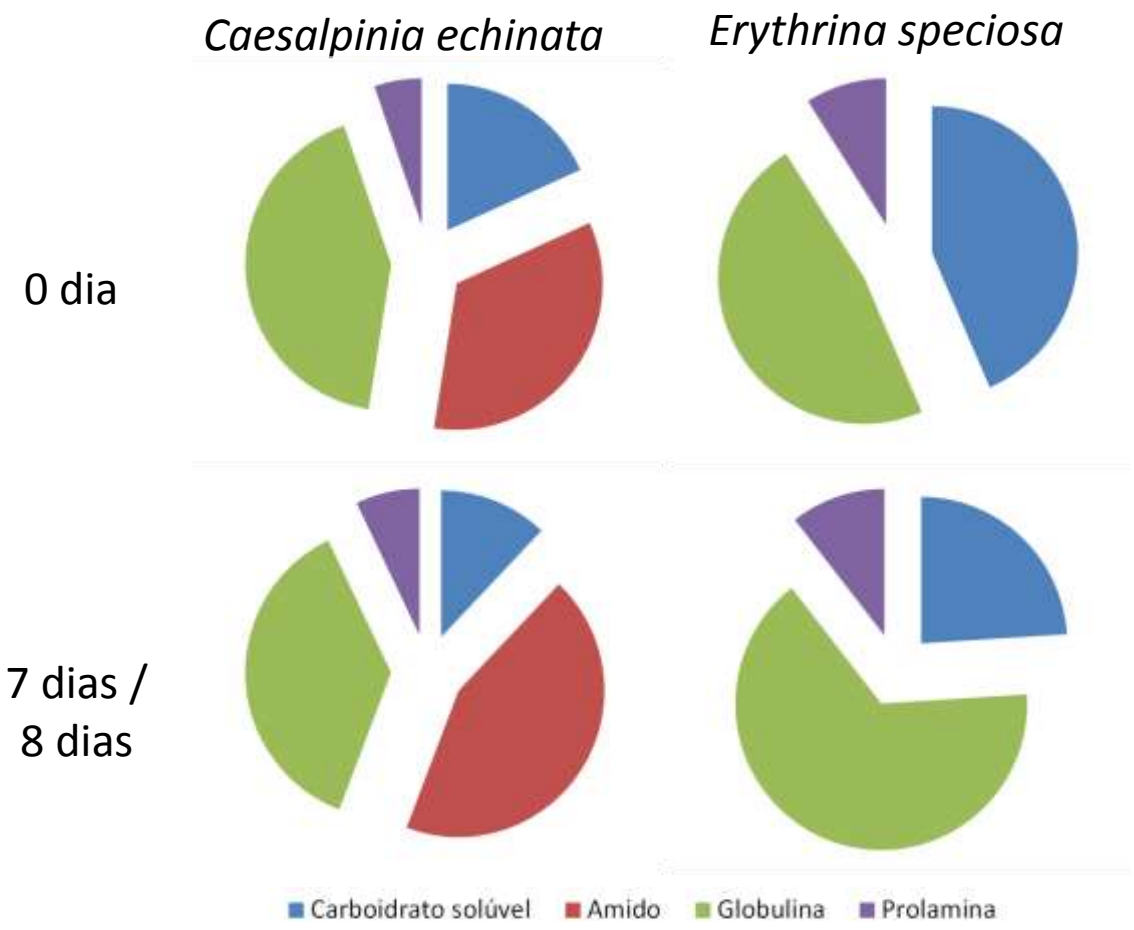
Anexo 3. Gráficos de proporção relativa de açúcares solúveis de eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* com 44 e 55 DAA antes (SS) e após secagem (CS) e após armazenamento a -18 °C antes (SS -18 °C) e após secagem (CS -18 °C), referente ao capítulo II "Dinâmica dos compostos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* em duas fases de maturação armazenadas em temperatura sub-zero".



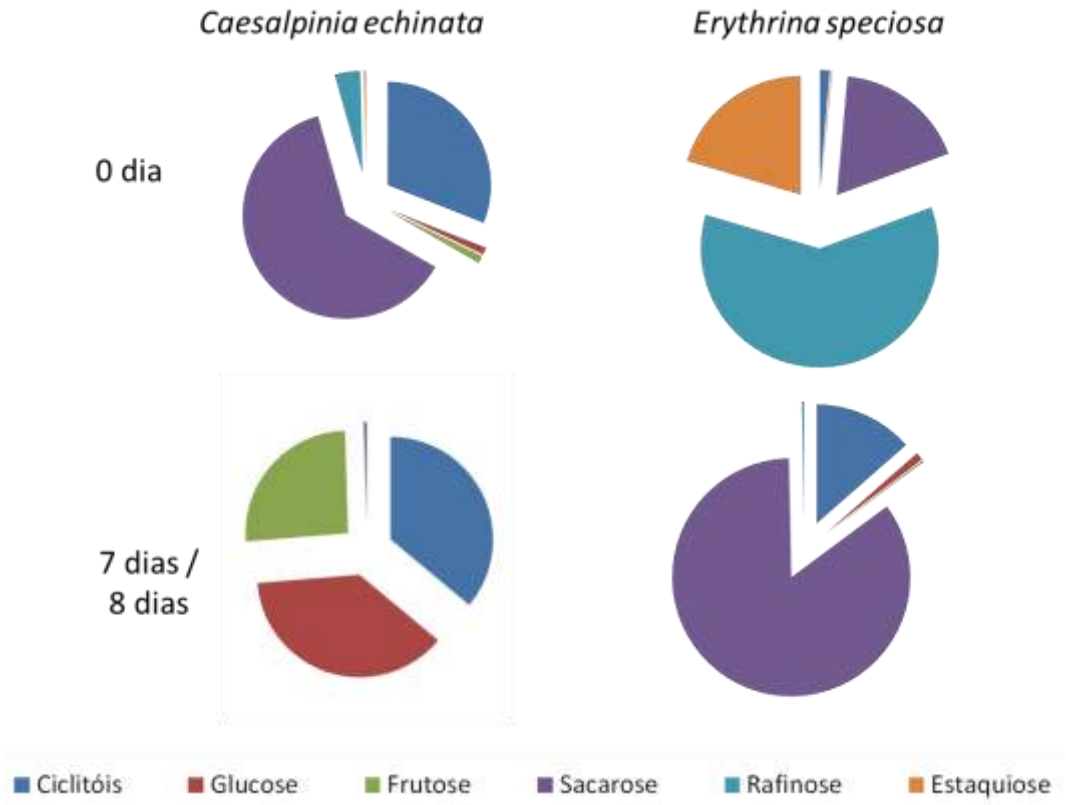
Anexo 4. Gráficos de proporção relativa de açúcares solúveis de cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 44 e 55 DAA antes (SS) e após secagem (CS) e após armazenamento a -18 °C antes (SS -18 °C) e após secagem (CS -18 °C), referente ao capítulo II "Dinâmica dos compostos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* em duas fases de maturação armazenadas em temperatura sub-zero".



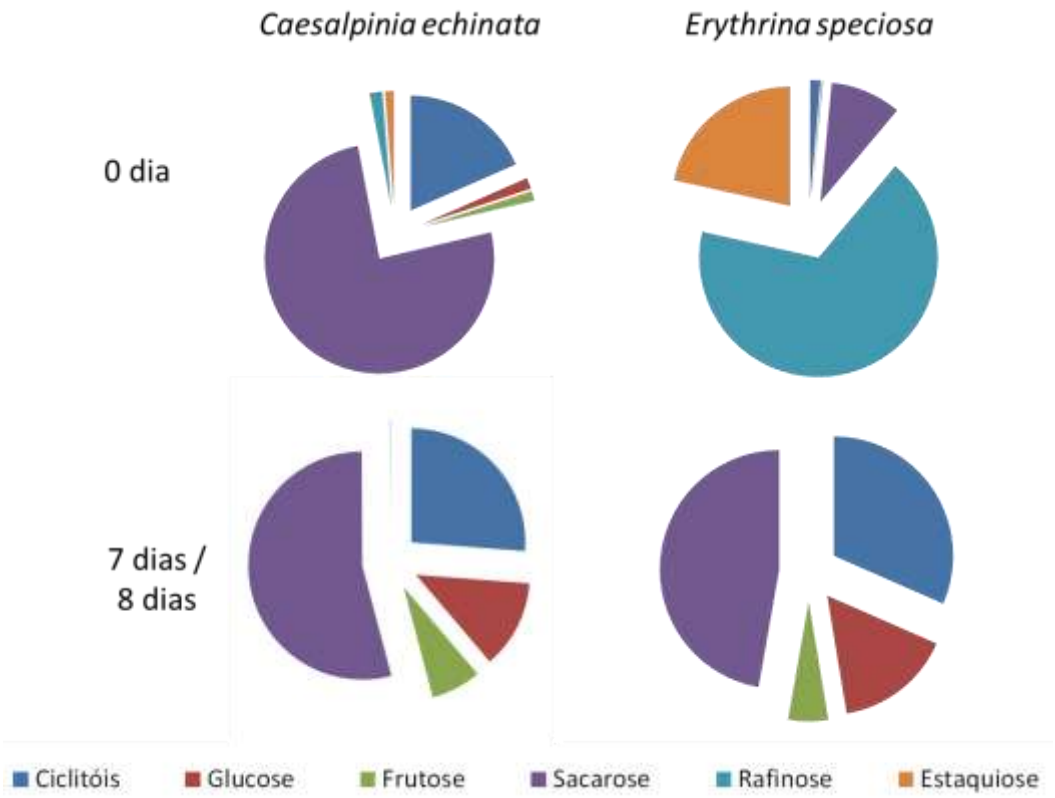
Anexo 5. Gráficos de proporção relativa de carboidratos solúveis totais, amido e frações globulina e prolamina de eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa* após 0 e 7/8 dias de germinação, referente ao capítulo IV "Mobilização de reservas durante a germinação de sementes de duas espécies de Leguminosae".



Anexo 6. Gráficos de proporção relativa de carboidratos solúveis totais, amido e frações globulina e prolamina de cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa* após 0 e 7/8 dias de germinação, referente ao capítulo IV "Mobilização de reservas durante a germinação de sementes de duas espécies de Leguminosae".



Anexo 7. Gráficos de proporção relativa de açúcares solúveis de eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa* após 0 e 7/8 dias de germinação, referente ao capítulo IV "Mobilização de reservas durante a germinação de sementes de duas espécies de Leguminosae".



Anexo 8. Gráficos de proporção relativa de açúcares solúveis de cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa* após 0 e 7/8 dias de germinação, referente ao capítulo IV "Mobilização de reservas durante a germinação de sementes de duas espécies de Leguminosae".