

TATIANA BOTELHO MESCIA

**Alterações Bioquímicas e Ultra-estruturais nas
Paredes Celulares de Sementes de *Caesalpinia
echinata* LAM. (Pau-Brasil) Durante a
Maturação e o Armazenamento**

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

SÃO PAULO

2008

TATIANA BOTELHO MESCIA

**Alterações Bioquímicas e Ultra-estruturais nas
Paredes Celulares de Sementes de *Caesalpinia
echinata* LAM. (Pau-Brasil) Durante a
Maturação e o Armazenamento**

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

ORIENTADORA: DRA. MÁRCIA REGINA BRAGA

Mescia, Tatiana Botelho
M578a Alterações bioquímicas e ultra-estruturais nas paredes celulares de sementes de *Caesalpinia echinata* LAM. (Pau-Brasil) durante a maturação e o armazenamento / Tatiana Botelho Mescia -- São Paulo, 2008.
73 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2008
Bibliografia.

1. Leguminosae/Caesalpinioideae. 2. Sementes. 3. Parede celular. I. Título

CDU : 582.736

“Todos os problemas se tornam infantis depois de explicados”

Sherlock Holmes – Os dançarinos
(Edgar Allan Poe)

Dedico

À Mara, Cintia, Katia, Tiago e Zizi. Em especial a meu Pai (*In memoriam*) pela grande herança deixada (minha família e o gosto pelo saber).

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Aos representantes do curso de Pós-Graduação do Instituto de Botânica de São Paulo, Dra. Sonia Dietrich e Dra. Solange Mazzoni-Viveiros, por propiciarem o início de um longo caminho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Márcia R. Braga primeiro, por confiar, e ao longo do caminho pelos ensinamentos, e pela grande paciência demonstrada na minha formação e nos momentos em que as minhas deficiências afloravam.

À Profa. Dra. Rita de Cássia L. Figueiredo-Ribeiro (IBot) pela oportunidade de trabalhar com as sementes de pau-brasil, pela valorosa revisão deste trabalho e por todos os valiosos ensinamentos ao longo desse caminho.

Ao Dr. Prof. Ricardo P. Louro (UFRJ) por dispor de seu tempo, pela enorme boa vontade e inestimável ajuda na fixação do material e obtenção de cortes para as análises ultra-estruturais, fundamentais para esse trabalho.

Aos funcionários da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, ao Dr. Marcos Mecca e em especial ao funcionário “Seu” Samuel, pela grande ajuda nas coletas.

À FAPESP pelo apoio financeiro através da bolsa de Mestrado e auxílios aos projetos temáticos (2000/06422-4 e 2005/04139-7) .

À minha família, que mesmo não entendendo o meu “Trabalho” e o objetivo dele, sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos queridos amigos e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, adquiridos nesses anos de Botânico.

À Juliana I.O. Mello grande AMIGA, que sempre esteve ao meu lado, ajudando ou atrapalhando mesmo. Os verdadeiros amigos nos são revelados nos momentos mais improváveis.

Ao Professor e amigo, Claudio Barbedo, pelos cafés, momentos nos quais aprendi valiosas lições profissionais e de vida. Obrigado por abrir as portas de sua casa e me apresentar a uma linda família, Adelianna, Laís e Artur, Vó Anita e Vô Alceu.

À Kelly Simões pela valiosa ajuda e amizade, durante a realização desse trabalho e por nunca ter perdido a paciência comigo, mesmo quando eu a importunava com minhas intermináveis dúvidas.

À grande amiga, guerreira, e agora mamãe Ludmila Raggi. Pelo apoio, incentivo e confiança e claro a sua amizade.

As eternas meninas da Fisiologia, Amanda’s Souza, Cinthya Murakamy, Claudia Alves, Fernanda M, Marina Martins, Roberta Moretto, Simone Leduc, Vanessa Oliveira, Vanessa

Costa, Vanessa Rebouças e Lourdes Amaral (minha primeira orientadora), que me apresentou as paredes celulares. Aos meninos: Dr Marco A. Tiné, por esclarecer as minhas numerosas dúvidas, Fabio Dalle Molle, Clóvis (C1), Rodrigo Caccere (companheiro de bancada e de dúvidas), João Paulo Naldi (obrigado pelos Cafés, pelo carinho e amizade). Obrigados a todos pela paciência, apoio e amizade, nesses mais de três anos de convivência.

À Amanda Asega, Vanessa Oliveira, Fernanda K e Paola Mitie (pazinha) pela valiosa ajuda, principalmente na execução dos cálculos matemáticos, e claro, pela amizade.

Aos queridos amigos do “Index”, Igor Borges, pela coleta dos frutos de pau-brasil, sem os quais esse trabalho não teria se iniciado, Moacir, pela ajuda nas coletas, Márcio, Lamarca e Carol pela amizade e ajuda no dia a dia do laboratório.

Aos amigos de longa (e de pequena) data que sempre estiveram ao meu lado. Daniela Nogueira, Alessandra Britto, Gilberto, Rossini, aos eternos amigos da faculdade (não irei detalhar nomes para não correr o risco de esquecer alguém) e a tantos outros que nunca deixaram de me apoiar e incentivar.

Aos meus queridos e eternos Professores, Nair Itaya, Érika Neiro, Michelangelo Juvenale, Flavio Molina e Alexandre. Pela minha formação como Bióloga, por acreditarem em mim e por sempre me incentivarem.

Aos meus gatos, Petit, Kitty, Morceginha, Irmão urso, Fofucho, Gordo, Vick (pipoca) e Francisco. Por sempre me recepcionarem em casa com carinho e me passarem uma energia enorme nos momentos mais difíceis durante a elaboração desse trabalho.

Sei que muitos serão esquecidos, não por que não foram importantes em algum momento e sim porque a minha memória nunca foi tão boa assim. Sintam-se parte disso, como todos os outros mencionados.

SUMÁRIO

Resumo	VII
Abstract	VIII
1. Introdução.....	1
Mata Atlântica e conservação	1
Semente – alterações durante a maturação e o armazenamento	2
Parede celular – estrutura e funções	7
<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (pau-brasil)	9
Objetivo	11
2. Material e Métodos	12
Material vegetal	12
Maturação	12
Armazenamento	13
Análises fisiológicas e bioquímicas	13
Análises ultra-estruturais	16
Delineamento experimental e Análise estatística	17
3. Resultados	18
Variações fisiológicas, bioquímicas e estruturais durante a maturação das sementes .18	
Variações fisiológicas, bioquímicas e estruturais durante o armazenamento das sementes .31	
4. Discussão	51
Variações fisiológicas, bioquímicas e estruturais durante a maturação das sementes ..51	
Variações fisiológicas, bioquímicas e estruturais durante o armazenamento das sementes .56	
5. Conclusão	61
6. Referências bibliográficas	62
7. Anexos	70
Análises Ultra-estruturais das sementes de paubrasil durante a maturação.....	70
Análises Ultra-estruturais das sementes de pau-brasil durante o armazenamento.....	72

RESUMO

Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) são tolerantes à dessecação, mantendo sua viabilidade até $0.08 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ de matéria seca, principalmente quando armazenadas em baixas temperaturas. Amido é a principal reserva dessas sementes e os carboidratos solúveis representam cerca de 15%, tendo papel na tolerância à dessecação. Em algumas espécies, a habilidade de sobreviver à dessecação parece depender também da composição da parede celular. Neste trabalho, foram analisadas as alterações na composição e ultra-estrutura da parede celular de sementes de pau-brasil durante a maturação e o armazenamento a diferentes temperaturas por diferentes períodos. Flores individuais foram marcadas no dia da antese e os frutos coletados de 45 a 65 dias após a antese (DAA). A análise das paredes celulares revelou mudanças na composição durante o desenvolvimento das sementes, com redução nos teores de pectinas ácidas (homogalacturonanos) e considerável aumento nos teores de arabinose nas frações extraídas em oxalato de amônio (pectinas) e NaOH 1N (hemiceluloses fracamente ligadas à celulose). Por microscopia eletrônica de transmissão, foi observado um padrão característico de dobramento da parede celular que é descrito, em outras espécies vegetais, como essencial para prevenir danos mecânicos aos tecidos durante a dessecação. Sementes maduras (65 DAA) secas a cerca de 7% foram armazenadas em três temperaturas (7, 25 e -18 °C) e após 30, 60 e 180 dias essas sementes tiveram o rendimento e a composição da parede celular avaliados. Sementes armazenadas nas mesmas condições por 338 dias foram utilizadas para análises ultra-estruturais. Com exceção da temperatura de congelamento, que reduziu o rendimento em parede celular, não foi observada alteração em relação à massa seca das sementes durante o armazenamento. Entretanto, a proporção relativa das frações de parede celular sofreu modificações ao longo do armazenamento, independentemente da temperatura. Foram observadas flutuações nas proporções relativas dos monossacarídeos componentes de cada fração, principalmente de arabinose e galactose, porém essas variações parecem não estar diretamente relacionadas à manutenção ou perda da capacidade germinativa das sementes durante o armazenamento. Considerando que polímeros ricos em arabinose têm sido encontrados em plantas que sobrevivem a períodos repetidos de dessecação e re-hidratação e que sua presença implica em aumento na flexibilidade da parede celular nessas plantas, nossos resultados sugerem as alterações que ocorrem na parede celular durante o desenvolvimento das sementes de pau-brasil podem contribuir para a manutenção da viabilidade durante o processo de dessecação que ocorre no final da maturação.

ABSTRACT

Seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) are tolerant to desiccation, keeping their viability up to $0.08 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DM}$, mainly when stored under low temperatures. Starch is the main reserve in these seeds and soluble carbohydrates make up for about 15%, playing a role in desiccation tolerance. In some species, the ability to survive desiccation seems also to be related with the cell wall composition. In the present work we report changes in cell wall structure and composition in brazilwood seeds during development and storage under different temperatures, aiming at a better understanding of the involvement of structural polysaccharides in the maturation and storability of these seeds. Individual flowers were tagged in the day of anthesis and pods were collected from 45 to 65 days after anthesis (DAA). Cell wall analysis revealed significant changes in composition during development, with a considerable decrease in acidic pectic polysaccharides (homogalacturonans) and increase in arabinose content in the ammonium oxalate-soluble (pectins) and weak (NaOH 1N) alkali fractions (hemicelluloses). By transmission electron microscopy, a characteristic pattern of cell wall folding was observed in brazilwood dry seeds that is ascribed as essential to prevent mechanical damage to the tissues during desiccation in other species. Mature seeds (65 DAA) dry up to 7% of water were maintained at 7, 25, and $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ and for 30, 60 e 180 days before analyzing cell wall yield and composition. Seeds stored at the same conditions for 338 days were used for ultrastructural analysis. Excepting for freezing temperature, which led to a decrease in cell wall content, no alterations on dry mass basis were observed in cell wall yield during storage. However, the relative proportion of cell wall fractions changed during storage, independently of the temperature. Changes in the relative monosaccharide proportion of each fraction were observed, mainly in the arabinose and galactose contents. However, these changes seem not to be related with the maintenance or loss of the seed germinability during storage. Considering that arabinose-rich polymers have been found in plants that survive to repeated periods of desiccation and rehydration and their presence is implicated in the increase of cell wall flexibility in these plants, our results might suggest a role for arabinans in allowing highly fold walls in the brazilwood seeds, therefore contributing to the maintenance of viability during the dehydration process that occurs during seed maturation.

1. Introdução

1.1 Mata Atlântica e Conservação

O Brasil é considerado uma das nações mais ricas em biodiversidade (Mittermeier *et al.* 2005), sendo as florestas tropicais as maiores responsáveis por essa riqueza (Lino 1992).

No Brasil, a Mata Atlântica é a segunda maior floresta tropical em extensão, sendo cerca de quatro vezes menor do que a Floresta Amazônica, entretanto, é proporcionalmente a que apresenta a maior diversidade biológica (Lino 1992, Mittermeier *et al.* 2005, INPE & Fundação SOS Mata Atlântica 2006). Abriga mais de 20.000 espécies de plantas arbóreas, sendo destas 8.000 endêmicas (Schaffer & Prochnow 2002, Siqueira Filho & Leme 2006, Fundação SOS Mata Atlântica 2007, Conservation International 2007). O bioma Mata Atlântica abrange diversas formações florestais como as florestas ombrófilas densas e mistas e ecossistemas associados que incluem restingas, mangues, dentre outros, formando com isso um grande mosaico de vegetação. No Brasil, estende-se do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul (Schaffer & Prochnow 2002, Tabarelli *et al.* 2005, Siqueira Filho & Leme 2006, INPE & Fundação SOS Mata Atlântica 2006).

O papel da Floresta Atlântica vai além de abrigar uma das maiores diversidades biológicas do mundo. Ela regula o fluxo de mananciais hídricos, o clima, a temperatura e a umidade do ar, além de ajudar na manutenção da fertilidade do solo, protegendo as encostas e escarpas de erosão (Schaffer & Prochnow 2002, Lino 1992).

A alta diversidade e o alto endemismo desse ecossistema o tornam extremamente frágil (Lino 1992). Na época do descobrimento, a Mata Atlântica cobria cerca de 15% do território nacional, aproximadamente 1.000.000 Km² e, foi a partir deste, com a exploração desordenada, principalmente da madeira de pau-brasil – *Caesalpinia echinata* Lam., que a devastação da Mata Atlântica teve início (Schaffer & Prochnow 2002, Tabarelli *et al.* 2005, Fundação SOS Mata Atlântica 2007, Conservation International 2007).

Algumas medidas para frear a exploração irracional dos recursos naturais da Mata Atlântica foram tomadas tais como o seu reconhecimento como reserva da biosfera pela UNESCO, em 1991, e pela definição quanto à exploração de seus recursos naturais, estabelecidos através do projeto de Lei Federal nº 750 de 1993. Entretanto, essas poucas ações foram insuficientes e hoje sua área está extremamente reduzida e fragmentada, restando apenas 7% do seu território original (Schaffer & Prochnow 2002, Conservation International

2007, INPE & SOS Mata Atlântica 2006). Por ter tido grande parte de seu território devastado e por apresentar uma grande diversidade biológica com alto endemismo, o bioma Mata Atlântica é classificado como um *hotspot* de grande importância para conservação da biodiversidade no mundo (Myers *et al.* 2000).

Dentre as estratégias de preservação dos recursos florestais estão incluídas a conservação *in situ* e a *ex situ*. A conservação *in situ* prevê a manutenção das espécies em seu habitat natural, na forma de reservas biológicas e ecológicas e parques. A conservação *ex situ* é realizada fora do ambiente natural da espécie, podendo ser feita na forma de coleções de plantas no campo, de bancos de sementes ou na forma de coleções de plântulas *in vitro* (Botanic Gardens Conservation International 2001 *apud* Rocha 2004). Apesar da conservação *in situ* ser a mais eficiente e recomendada para a preservação da variedade genética das espécies e ter baixo custo de implantação, esta se torna menos viável por necessitar de medidas políticas específicas para sua implantação (Siqueira *et al.* 1993).

Apesar da conservação *ex situ* ser considerada uma medida complementar à conservação *in situ* (Botanic Gardens Conservation International 2001 *apud* Rocha 2004), hoje em dia ela é a mais utilizada, principalmente na forma de banco de sementes, já que esta é a principal unidade de propagação da maioria das plantas superiores (Santos 2000). Segundo Hong & Ellis (1996), para que a conservação das sementes seja realizada com sucesso há a necessidade que se conheça o seu comportamento fisiológico em relação à secagem e ao armazenamento.

1.2 Semente - alterações durante a maturação e o armazenamento

As sementes desenvolvem-se a partir de um óvulo fertilizado (Bewley & Black 1994) e são basicamente constituídas por três estruturas: o embrião, o endosperma e o tegumento ou testa (Bewley & Black 1994, Cardoso 2004a). Durante o desenvolvimento do embrião e até que este atinja sua maturidade fisiológica são definidas três fases principais. A histodiferenciação ou embriogênese, que é a fase inicial e consiste de intensas divisões celulares e diferenciação, na qual serão formados os tecidos do embrião e do endosperma. É nessa fase que ocorre um rápido aumento da massa fresca da semente e do conteúdo de água. A etapa seguinte, denominada fase de maturação, é caracterizada pela expansão celular e pela deposição de reservas, normalmente proteínas, lipídios ou carboidratos, nos tecidos de armazenamento (endosperma, cotilédones ou no megagametófito), aumentando com isso a massa seca da semente. Em algumas sementes, ao final do período de maturação, ocorre uma

redução do conteúdo de água e diminuição da massa fresca total da semente. Essa fase é iniciada com a interrupção das conexões vasculares entre a semente e a planta mãe (Bewley & Black 1994, Cardoso 2004a).

As sementes podem ser classificadas quanto ao seu comportamento em relação ao armazenamento e à sensibilidade à dessecação, em ortodoxas (tolerantes a dessecação e ao armazenamento em baixas temperaturas) e recalcitrantes (sensíveis à dessecação e ao armazenamento em baixas temperaturas) (Roberts 1973). Entretanto, hoje se sabe que existe um gradiente de tolerância à dessecação e sensibilidade ao armazenamento, sendo muitas sementes consideradas intermediárias em relação a esse comportamento (Hong & Ellis 1996).

A aquisição da tolerância à dessecação pelo embrião, nas sementes ortodoxas, é normalmente um processo gradual, que ocorre ao longo do seu desenvolvimento, sendo perdido na fase de germinação (Bewley & Black 1994). Essas sementes possuem mecanismos para prevenir os possíveis danos causados pela dessecação. Dentre esses mecanismos estão o acúmulo de oligossacarídeos, açúcares e proteínas específicas (Blackman *et al.* 1991).

Durante o desenvolvimento e o armazenamento de sementes, geralmente ocorrem variações nos carboidratos solúveis como a sacarose, frutose, glucose e oligossacarídeos da série rafínosica e também no teor de amido (Garcia *et al.* 2006). Os carboidratos solúveis estão envolvidos não só com a reserva de carbono nas plantas, mas possuem funções adicionais. Este é o caso da sacarose, que além de servir como substrato para a síntese dos oligossacarídeos da série rafínosica, também estaria envolvida no processo de aquisição de tolerância à dessecação em sementes ortodoxas, que juntamente com os oligossacarídeos da série da rafinose, estabilizariam as membranas durante o processo de secagem, ao final da fase de maturação (Nkang 2002, Buckeridge *et al.* 2004).

Sementes maduras de diversas espécies como *Sinapis alba*, *Glycine max* e *Brassica campestris* têm a concentração de açúcares solúveis aumentada com o início da tolerância à dessecação (Bewley & Black 1994). A aquisição da tolerância à dessecação em sementes de soja e milho foi associada, principalmente, ao aumento nos níveis de sacarose, de oligossacarídeos da série da rafinose e aos ciclitóis (Bernal-Lugo & Leopold 1992, Sun *et al.* 1994, Obendorf 1997).

Um dos mecanismos que podem contribuir para a tolerância à dessecação em sementes é a formação de um estado vítreo nas células, que é caracterizado pela alta viscosidade e por retardar as reações metabólicas, contribuindo para a longevidade das sementes após a

secagem (Buitink *et al.* 2000, Hoekstra *et al.* 2001). A sacarose teria papel fundamental na formação do estado vítreo, preservando a estrutura dos fosfolipídios e, assim, exercendo sua função protetora durante a secagem.

Para Koster (1991), a formação do estado vítreo nas células é dependente da proporção entre sacarose e oligossacarídeos existentes nos tecidos, sendo que grande quantidade de sacarose, na presença de pequena quantidade de oligossacarídeos, pode causar danos às membranas celulares, quando as sementes são secas (Lin & Huang 1994). Esses oligossacarídeos não estariam envolvidos diretamente na formação do estado vítreo e sim na manutenção deste (Buitink *et al.* 2000), uma vez que estes preveniriam a cristalização da sacarose durante a secagem (Caffrey *et al.* 1988 *apud* Koster 1991, Lin & Huang 1994).

Além de atuarem na aquisição e manutenção da tolerância à dessecação em sementes, os oligossacarídeos da série da rafinose podem ser considerados, em alguns casos, como indicadores do comportamento das sementes quanto ao armazenamento, uma vez que maiores teores foram encontrados em sementes ortodoxas quando comparados aos das recalcitrantes (Steadman *et al.* 2000). Além disso, durante o armazenamento os altos teores de sacarose e de oligossacarídeos foram correlacionados positivamente com a longevidade de sementes ortodoxas (Horbowicz & Obendorf 1994, Lin & Huang 1994).

Apesar dos teores de sacarose e de oligossacarídeos da série da rafinose terem sido associados à tolerância à dessecação e com a categoria de armazenamento em algumas sementes ortodoxas, esse comportamento não é uma regra. Black *et al.* (1999) não encontraram correlação entre a tolerância à dessecação e a presença de oligossacarídeos da série da rafinose em embriões imaturos de trigo, indicando que outros mecanismos seriam os responsáveis pela tolerância a dessecação nessas sementes. Além disso, em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), considerada ortodoxa e tolerante ao armazenamento em baixa temperatura, foram encontrados teores mínimos de oligossacarídeos da série da rafinose (Garcia *et al.* 2006, Hellmann 2006, Leduc 2007), indicando que para essa espécie esse açúcar não é o principal fator na aquisição da tolerância a dessecação e ao armazenamento.

As proteínas também podem estar associadas a esse mecanismo, especialmente as chamadas "Late Embryogenesis Abundant" (LEA), que atuariam como agentes de solvatação de outras proteínas de membrana, protegendo-as contra possíveis danos decorrentes da desidratação (Blackman *et al.* 1995, Bewley 1997, Cardoso 2004b). Blackman *et al.* (1995) observaram que durante a maturação de sementes de soja (*Glycine max*) o nível de expressão

das chamadas “proteínas de maturação”, ou proteínas LEA, aumentava a medida que estas adquiriam a tolerância à dessecação e esses níveis declinavam com o início do processo de germinação, período no qual as sementes podem tornar-se sensíveis à dessecação.

Em sementes que não apresentam mecanismos para prevenir os danos pela secagem, a desidratação pode acarretar mudanças na composição dos fosfolipídios de membrana, afetando a sua integridade. As conseqüências desses danos usualmente são observadas durante o processo de re-hidratação, com a exsudação dos constituintes celulares durante o processo de re-hidratação (Priestley & Willians 1985).

Embora a deterioração das sementes possa estar associada ao armazenamento, o processo inicia-se logo após as sementes atingirem a maturidade fisiológica. Apesar de ser um processo irreversível e de não poder ser evitado, a deterioração pode ser retardada. A deterioração das sementes é um evento que envolve alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas (Toledo & Marcos Filho 1977, Villela & Peres 2004, Marcos Filho 2005).

Apesar de vários fatores influenciarem a manutenção da viabilidade das sementes durante o armazenamento, a temperatura e a água seriam aqueles que mais atuam nesse processo (Marcos Filho 2005). Teores elevados de água podem diminuir a longevidade das sementes, alterando o seu metabolismo e permitindo a proliferação de patógenos que são prejudiciais à manutenção de sua capacidade germinativa. Em contrapartida, a secagem e a manutenção das sementes em baixas temperaturas podem manter sua viabilidade (Toledo & Marcos Filho 1977, Vertucci & Ross 1990, Barbedo & Marcos Filho 1998, Villela & Peres 2004). Além do conhecimento do teor de água e da temperatura, é necessário investigar as alterações bioquímicas que ocorrem nas sementes durante o armazenamento (Kermode 1990). A diminuição da temperatura durante o armazenamento estabilizaria a atividade enzimática, o que favoreceria o metabolismo de carboidratos envolvidos na manutenção da integridade das membranas celulares, como a sacarose, os oligossacarídeos da série da rafinose e os ciclitóis (Peterbauer & Richter 2001).

Estudos com sementes de trigo, arroz, milho, feijão e outras leguminosas mostraram que exposições a elevadas temperaturas e alta umidade relativa provocaram desestruturação e perda da integridade do sistema de membranas. Tal alteração ocasionou uma série de reações tais como desnaturação de proteínas, diminuição nos teores de carboidratos, aumento no teor de ácidos graxos, entre outros, diminuindo a viabilidade das sementes durante o armazenamento (Marcos Filho 2005 e referências nele contidas).

A perda da germinabilidade de sementes de milho submetidas ao envelhecimento acelerado foi associada a uma drástica diminuição nos teores de carboidratos (Bernal-Lugo & Leopold 1992). Comportamento semelhante foi observado durante o armazenamento de sementes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), que apresentaram correlação positiva entre os teores de açúcares solúveis e a manutenção da germinabilidade. Além disso, foi observado que durante o armazenamento houve aumento da solubilidade do amido, entretanto, não houve correlação entre os teores desse polissacarídeo e a qualidade fisiológica das sementes. Outro fator que agiu de forma negativa na manutenção da germinabilidade das sementes de azevém durante o armazenamento foi o aumento nos teores de aminoácidos livres, provenientes provavelmente da desestruturação de proteínas (Eichelberger *et al.* 2002).

Estudos de armazenamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em temperatura ambiente e com elevado teor de água mostraram aumento significativo no número e diminuição no tamanho dos grãos de amido. Simultaneamente, foi observada ruptura das paredes celulares e das membranas de organelas, incluindo dos corpos protéicos (Begnami & Cortelazzo 1996, Cortelazzo *et al.* 2005). Análises ultra-estruturais de sementes de *Dyckia pseudococcinea* criopreservadas por 12 e 24 meses (Borges 2005) mostraram que as principais diferenças entre sementes recém coletadas e armazenadas foram o número, as dimensões e a integridade dos grãos de aleurona, o tamanho dos amiloplastos e o tamanho e arranjo dos corpos protéicos do endosperma.

Alguns estudos mostraram que nem o acúmulo dos açúcares e nem a presença das proteínas LEA são, sozinhos, suficientes para conferir tolerância à dessecação em sementes ou para manter a viabilidade destas durante o armazenamento. Outros carboidratos, como aqueles encontrados em paredes celulares, substâncias antioxidantes e outros mecanismos reparatórios também podem participar desse processo (Blackman *et al.* 1995, Peterbauer & Richter 2001).

A qualidade nutricional e a viabilidade das sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), segundo Shiga *et al.* (2004), são diretamente influenciadas por alterações na estrutura dos polissacarídeos de parede celular durante o armazenamento. Esses autores observaram que as sementes armazenadas em temperatura ambiente (± 19 °C) apresentavam diminuição na solubilização dos polissacarídeos de parede celular, o que acarretou endurecimento dos tecidos. Esse fator diminuiu a porcentagem de germinação e elevou o tempo de cozimento dessas sementes, fenômeno conhecido como “Hard to Cook”. Por outro lado, o armazenamento em baixa temperatura (± 4 °C) não alterou a composição das paredes

celulares, mantendo a viabilidade dessas sementes. Sasaki (1983), estudando a maturação de sementes de soja, relatou que ao mesmo tempo em que ocorriam alterações nos açúcares solúveis era observada substituição dos polissacarídeos da parede celular ricos em arabinose por galactanos, nos estágios tardios da maturação.

1.3 Parede Celular – estrutura e funções

Juntamente com o amido e os carboidratos solúveis, os polissacarídeos acumulados nas paredes celulares das sementes também atuam como reserva energética (Buckeridge *et al.* 2004). Esses polissacarídeos representam os principais constituintes químicos da parede celular, juntamente com as proteínas estruturais e compostos fenólicos (Carpita & McCann 2000).

A parede celular é uma estrutura de grande importância para as células vegetais, pois a sua forma é ditada em grande parte por ela. A parede celular direciona o crescimento da célula, exercendo profunda influência no desenvolvimento e na morfologia das plantas. Suas características determinam também as funções das células nos tecidos vegetais, além de conferir resistência mecânica aos mesmos, entre outras características (Carpita & McCann 2000).

A parede celular vegetal, denominada de primária, é normalmente encontrada em tecidos em crescimento, e secundária em tecidos maduros que completaram o crescimento (Silveira & Amaral 2000, Carpita & McCann 2000). A parede primária é composta principalmente por celulose, hemiceluloses, substâncias pécnicas e proteínas. Na parede secundária, as proteínas e as substâncias pécnicas são constituintes minoritários, enquanto as hemiceluloses e a celulose são encontradas em maior porcentagem. Entre as paredes primárias de células vizinhas existe uma estrutura denominada de lamela média que tem função de unir as células, e é formada basicamente por substâncias pécnicas (Silveira & Amaral 2000, Carpita & McCann 2000).

A celulose é o polissacarídeo da parede celular mais conhecido, contabilizando de 20% a 30% da massa seca da parede primária da maioria das células, sendo particularmente abundante na parede celular secundária. Ela é encontrada na forma de microfibrilas (McNeil *et al.* 1984), formadas por cadeias simples de moléculas de glucose unidas por ligações glicosídicas β -(1→4) (McNeil *et al.* 1984, Carpita & McCann 2000, Silveira & Amaral 2000). Segundo McNeil *et al.* (1984), a disposição das microfibrilas recém depositadas determina a morfologia da célula em crescimento.

As hemiceluloses ligam-se às microfibrilas de celulose através de pontes de hidrogênio, formando uma rede complexa. As principais hemiceluloses das plantas superiores são o xiloglucano, o glucuronoarabinoxilano e o β -glucano. O xiloglucano ocorre nas dicotiledôneas e nas monocotiledôneas conhecidas como comelinóides. Ele é formado por unidades de glucose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4), as quais são ramificadas com ligações α -(1 \rightarrow 6) por unidades de D-xilopiranoose, na proporção de 4:3, e um número variável de unidades de galactose (Buckeridge *et al.* 2000a, Carpita & McCann 2000). Nas sementes, além do xiloglucano estrutural, existe o xiloglucano de reserva, que difere do estrutural pela ausência de unidades de fucose. O glucuronoarabinoxilano é a principal hemicelulose das monocotiledôneas, e o β -glucano a principal hemicelulose da Ordem Poales, que inclui os cereais e as gramíneas forrageiras (Buckeridge *et al.* 2000a, Carpita & McCann 2000).

As pectinas são polissacarídeos ramificados, altamente hidratados e heterogêneos, constituídos por ácido galacturônico. As pectinas têm papel fundamental no transporte de íons, além de determinar a porosidade da parede e regular a adesão célula-célula por meio da lamela média, participando, ainda, da defesa celular, entre outras funções (Carpita & McCann 2000). Existem três tipos de pectinas: o homogalacturonano (HGA), o ramnogalacturonano I (RGI) e o ramnogalacturonano II (RGII). O HGA é um polímero constituído por ácido galacturônico com ligações α (1 \rightarrow 4), podendo apresentar diferentes graus de metilesterificação. O RG I é um heteropolímero formado por unidades repetitivas de um dissacarídeo (ramnose ligada α -(1 \rightarrow 2) – Gal α -(1 \rightarrow 4)). O RG I pode ter ramificações de três polissacarídeos neutros, arabinano, galactano e arabinogalactano, ligados na posição O-4 das unidades de ramnose. O RG II possui uma cadeia principal formada de ácido galacturônico ligado α -(1 \rightarrow 4) com ramificações de açúcares raros e pouco freqüentes em paredes celulares. É a mais complexa das pectinas e a menos abundante e está presente em todas as plantas superiores, sugerindo uma importante função ainda não esclarecida (Buckeridge *et al.* 2000b, Carpita & McCann 2000, Silveira & Amaral 2000, Buckeridge *et al.* 2004).

A parede celular tal como foi descrita quimicamente não é uma estrutura estática, que uma vez formada teria unicamente função mecânica. Ela é uma estrutura dinâmica, que durante o desenvolvimento da planta tem sua composição e estrutura continuamente alteradas. O desenvolvimento da planta envolve uma série coordenada de processos bioquímicos, incluindo a biossíntese e degradação de componentes das paredes celulares (Stolle-Smits *et al.* 1999).

Existem poucos trabalhos relacionando as alterações dos polissacarídeos de parede celular com a maturação e o armazenamento de sementes. Koch *et al.* (1999) e Markovic & Obendorf (1999) avaliaram a influência do metanol, proveniente da ação da enzima pectina metilesterase (PME), sobre a maturação e posterior deterioração de sementes de soja na fase de pré-colheita. A pectina metilesterase é uma importante enzima de parede celular, envolvida em diferentes processos incluindo a adesão celular e o crescimento caulinar. Essa enzima catalisa a desmetilesterificação das moléculas de pectina (HGI), liberando, principalmente metanol (Micheli 2001). A atividade da pectina metilesterase também está envolvida na quebra da dormência de sementes de cedro amarelo (Ren & Kermode 2000).

McCartney *et al.* (2000), utilizando anticorpos monoclonais específicos para polissacarídeos pécnicos da parede celular, estudaram as alterações e a complexidade desses polímeros durante a maturação de sementes de ervilha. Esses autores constataram que existem alterações espaço-temporais na deposição das pectinas e que essas modificações estariam relacionadas com as propriedades mecânicas dessas paredes, o que seria uma preparação para a dessecação, já que ocorrem ao final da fase de maturação.

Estudos com as chamadas “plantas que ressuscitam” mostraram que, ao serem desidratadas, apresentavam um dobramento de suas paredes celulares resultando em uma compactação da célula. Esse dobramento da parede celular acompanhou a desidratação do protoplasto, evitando o deslocamento da membrana plasmática e mantendo a organização celular (Farrant 2000, Moore *et al.* 2006). Análises da composição da parede celular dessas plantas revelaram alto teor de arabinanos (Moore *et al.* 2006), como aqueles relatados em sementes ortodoxas como o feijão (Shiga *et al.* 2004).

1.4 *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil)

O pau-brasil é uma leguminosa (Figura 1A) endêmica da Mata Atlântica, de extrema importância histórica para o Brasil, não só por ter sido o primeiro produto de comércio, mas principalmente por ter dado nome ao país (Rocha 2004). A exploração do pau-brasil desde a época da colonização, servindo como matéria prima para a produção de corantes e confecção de barcos, levou à drástica redução das populações naturais da espécie. Devido a esse fato, desde 1994, o pau-brasil encontra-se na lista do IBAMA de espécies em risco de extinção. Sua distribuição geográfica atual restringe-se à Mata Atlântica na costa do Brasil, do Rio Grande do Norte ao Rio de Janeiro (Rocha 2004), concentrando-se em três regiões com florestas mais secas (Carvalho *et al.* 2005).

As sementes de pau-brasil (Figura 1B) apresentam comportamento ortodoxo, tolerando a secagem até cerca de 7% do teor de água, contudo, apresentam um curto período de viabilidade quando armazenadas à temperatura ambiente. Além disso, a sua sensibilidade à secagem é influenciada pela qualidade inicial das sementes (Barbedo *et al.* 2002). O vigor e a germinação das sementes de pau-brasil também dependem do ponto de maturidade fisiológica no qual as sementes são colhidas (Borges *et al.* 2005). Teixeira *et al.* (2004) notaram a presença de estômatos no tegumento das sementes de pau-brasil e a ausência de camadas de osteosclereídeos, características estas que poderiam contribuir para a baixa longevidade dessas sementes em condições naturais (Borges *et al.* 2005). Segundo Garcia *et al.* (2006) a capacidade germinativa das sementes de pau-brasil, durante o armazenamento, aparentemente, está relacionada com as variações nos carboidratos solúveis. Esses autores observaram uma alteração na proporção de glucose e frutose, em relação à de sacarose. Sendo as sementes de pau-brasil preservadas por até 18 meses quando armazenadas sob temperaturas baixas. Entretanto ao longo da maturação das sementes de pau-brasil, Borges *et al.* (2006) notaram que os teores de ciclitóis aumentavam à medida que essas sementes adquiriam a maturidade e que o acúmulo de alguns desses açúcares álcoois coincidia com a porcentagem máxima de germinação.



Figura 1. Aspectos gerais de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). A – Exemplar adulto, B – sementes maduras, C – frutos imaturos, D – inflorescência, E – tronco com acúleos. Barras = 30 cm (figura A), 1 cm (figuras B, C e D) e 5 cm (figura E). (Prancha gentilmente cedida por J.I.O. Mello).

Contudo Hellmann (2006) observou que apesar de ocorrerem flutuações nos teores de carboidratos de reserva das sementes de pau-brasil armazenadas em baixas temperaturas, essas flutuações parecem não ter influência direta sobre a viabilidade dessas sementes. Resultado semelhante foi encontrado por Mello (2008) em sementes de pau-brasil congeladas por 30 dias, com diferentes teores de água. Foi observado que durante o período de armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ocorreu pequena diminuição no teor de amido, ao passo que o teor de carboidratos solúveis aumentou. Entretanto, a porcentagem de germinação não foi alterada, mantendo valor próximo de 90% durante todo o período de armazenamento.

Apesar de vários fatores terem sido analisados em relação à tolerância à dessecação nas sementes de pau-brasil, ainda existem várias lacunas a serem preenchidas, uma vez que, o processo de redução da germinação e deterioração ocorre como consequência de uma série de eventos como a desorganização de membrana plasmática, redução e mudanças estruturais nas fontes energéticas, a exemplo das proteínas e carboidratos. Dessa forma, a análise estrutural durante o armazenamento de sementes pode ser uma ferramenta importante para monitoramento de alterações subcelulares e avaliar os efeitos causados durante o processo. Além disso, a relação dessas variações com outras que possivelmente ocorrem nos polissacarídeos das paredes celulares ainda é desconhecida. Assim, o conhecimento da dinâmica dos polissacarídeos das paredes celulares durante a maturação e o armazenamento poderá auxiliar no entendimento da baixa longevidade apresentada pelas sementes de pau-brasil quando armazenadas em temperatura ambiente.

Objetivo

Analisar a composição e a estrutura das paredes celulares de sementes de pau-brasil durante a maturação e o armazenamento em diferentes temperaturas, objetivando avaliar se alterações nessa organela podem estar relacionadas à aquisição da tolerância a dessecação durante a maturação e à deterioração durante o armazenamento.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal

As sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. - Leguminosae (pau-brasil) - utilizadas neste trabalho, nos estudos de maturação e de armazenamento, foram coletadas de plantas cultivadas em arboreto experimental homogêneo, com cerca de 250 árvores, existente na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (RBEEMG), município de Mogi-Guaçu, SP, (22°15-16' S e 47°8-12' W). Em alguns experimentos também foram utilizadas sementes procedentes de árvores adultas mantidas na área do Instituto de Botânica de São Paulo.

Inflorescências que apresentavam mais da metade das flores em antese foram marcadas no período de máximo florescimento da espécie, que ocorreu no mês de novembro de 2006 e 2007 nas áreas de coleta.

2.2 Maturação das sementes de pau-brasil

Os frutos foram coletados diretamente das árvores aos 45, 55 e 65 dias após a antese (DAA), caracterizando diferentes fases de maturação das sementes (Figura 2), conforme descrito por Borges *et al.* (2005). O material vegetal foi trazido para o Laboratório de Sementes e Melhoramento Vegetal do Instituto de Botânica de São Paulo. Os frutos foram abertos manualmente, as sementes foram selecionadas, sendo descartadas aquelas que apresentaram danos por insetos e má formação.



Figura 2. Aspecto geral de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) em três estádios de maturação. A: sementes com 45 DAA; B: sementes com 55 DAA; C: sementes com 65 DAA. Barra = 1cm.

2.3 Armazenamento das sementes de pau-brasil

Os frutos contendo sementes maduras (65 DAA) de pau-brasil foram trazidos para o Laboratório de Sementes e Melhoramento vegetal, do Instituto de Botânica de São Paulo e mantidos em temperatura ambiente até sua deiscência, sendo denominados T0 fresco. Adicionalmente, sementes recém dispersas (menos de 24h da dispersão) foram colhidas e secas ao sol (denominadas T0 seco).

As sementes maduras e recém dispersas, (T0 seco) foram armazenadas por 30, 60, 180 e 338 dias em câmara fria (7 ± 2 °C), em temperatura ambiente do laboratório (25 ± 5 °C) e somente por 180 dias em congelador (-18 °C). As temperaturas e períodos de armazenamento foram selecionados com base em estudos anteriores realizados por Barbedo *et al.* (2002) e Hellmann *et al.* (2006).

2.4 Análises fisiológicas e bioquímicas

As sementes utilizadas no estudo de maturação, logo após a coleta, e as sementes utilizadas no estudo de armazenamento, após a coleta e após cada período de armazenamento, foram analisadas pelos métodos descritos a seguir. Para as análises bioquímicas foram descartados os tegumentos das sementes e todas as análises foram realizadas em triplicatas.

2.4.1 Determinação do teor de água e matéria seca

O teor de água (expresso em porcentagem, com base na massa úmida, % $_{bu}$) e o conteúdo de matéria seca (g.semente^{-1}) foram determinados através do método de estufa a 103 °C por 17 horas (ISTA 1985), em quatro repetições de cinco sementes cada. Para os diferentes estádios de maturação (45, 55 e 65 DAA), devido ao menor número disponível, foram utilizadas três sementes por repetição para a determinação desses parâmetros.

2.4.2 Testes de germinação

Para os testes de germinação foram utilizadas quatro repetições de 12 sementes, em rolos de papel para germinação (Germitest), previamente umedecidos com água até sua saturação e escorrendo-se o excesso. Os rolos foram colocados em germinadores Marconi tipo MA400 com circulação interna de água, a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 horas e elevada umidade relativa do ar (Mello & Barbedo 2007). As leituras para este teste foram iniciadas a

partir do segundo dia, em dias alternados, registrando-se as sementes germinadas (protrusão da raiz primária de no mínimo 5 mm) e com desenvolvimento normal (presença de sistema radicular e parte aérea sem aparentes defeitos) (Barbedo *et al.* 2002, Borges *et al.* 2005). Foram calculados os índices de Índice de velocidade de germinação (IVG), Tempo médio de germinação (Tm) e variância do tempo médio de germinação (S^2Tm) (Santana & Ranal 2004).

2.4.3 Extração e quantificação de açúcares solúveis

As sementes foram pesadas, descascadas, homogeneizadas manualmente e fervidas em etanol 80% (10mL/g peso fresco) por 10 min (por três vezes), para extração dos açúcares solúveis. Após cada extração, o material foi centrifugado por 5 minutos a 1294 g e os resíduos lavados com água destilada (10 mL/g) a 60 °C, congelados e liofilizados.

Os extratos etanólicos foram concentrados em evaporador rotatório até eliminação do álcool e utilizados para quantificação de carboidratos solúveis totais pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), utilizando glucose como padrão. Os açúcares redutores foram avaliados pelo método de Somogyi-Nelson (Somogyi 1945), também tendo glucose como padrão.

2.4.4. Extração de lipídios

Os resíduos da extração de açúcares solúveis foram lavados (10 mL/g) três vezes em clorofórmio:metanol (1:1, v/v) por 20 min, duas vezes em acetona pura por 10 min e duas vezes em éter etílico também por 10 min. Sempre após cada lavagem, o material foi centrifugado por 10 min a 1294 g. Os sobrenadantes de cada extração foram reunidos e deixados em capela até completa evaporação do solvente, sendo pesados e os pesos considerados como uma estimativa do rendimento em lipídios.

Os resíduos deslipidizados foram mantidos em capela até completa evaporação do solvente, sendo pesados e utilizados para extração de amido.

2.4.5. Extração e quantificação de amido

Para extração de amido, ao resíduo da extração lipídica foi adicionado DMSO a 90% (10 mL/g) (adaptado de Gorshkova *et al.* 1996), que permaneceu sob agitação por 16 h. O material foi centrifugado por 15 min a 1294 g, sendo o sobrenadante coletado. Mais quatro

extrações com DMSO 90% (10mL/g) foram realizadas, sendo duas delas por 4 h cada, e as outras duas por uma noite em câmara fria, a 5 °C. Após cada extração, o material foi centrifugado por 15 min a 1294 g e o sobrenadante coletado. O precipitado foi lavado exaustivamente em água destilada, para remoção completa do DMSO e o sobrenadante foi reunido à fração de DMSO.

Após a remoção do amido por DMSO, o resíduo foi tratado por 24 h a 30 °C com Amiloglucosidase (AMG) para a retirada do amido resistente. Foram utilizadas 50 U da enzima e um volume de 500 µl para cada 500 mg de material. Após centrifugação a 1294 g, por 5 min, o material foi lavado duas vezes com água destilada, com o mesmo volume utilizado para a AMG. As duas frações foram reunidas e os carboidratos totais e os ácidos urônicos foram quantificados através dos métodos de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956) e m-hidroxibifenil (Filisetti-Cozzi & Carpita 1991), respectivamente. O material foi lavado com acetona e éter etílico, duas vezes o volume utilizado para a AMG, liofilizado e o resíduo considerado como o rendimento em parede celular.

Para a estimativa do teor de amido, a fração de DMSO foi dialisada exaustivamente em água destilada a 5 °C, liofilizada e ressuspensa em água deionizada. O amido foi quantificado indiretamente pelo teor de açúcares totais pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956).

2.4.6. Fracionamento da parede celular

O resíduo, após a remoção dos açúcares solúveis, lipídios e amido foi considerado como o rendimento em parede celular (porcentagem em relação à massa seca total da semente). Esse resíduo foi utilizado para o fracionamento da parede celular.

Para a obtenção de pectinas, as paredes celulares foram extraídas (3 vezes) com oxalato de amônio 0,5% (10 mL/g), pH 7,0, a 100°C, durante 1 h. O sobrenadante foi coletado após centrifugação a 1294 g para cada extração. Os sobrenadantes foram reunidos e dialisados em água destilada por 48 h. Para extrair o restante das pectinas metilesterificadas e as hemiceluloses fracamente ligadas à celulose, ao resíduo foi adicionado NaOH 1N, contendo 3 mg/mL de NaBH₄, durante 24 h a temperatura ambiente. Após centrifugação a 1294 g, os sobrenadantes foram reunidos, neutralizados com ácido acético glacial e dialisados exaustivamente em água destilada por 48 h. O mesmo procedimento foi realizado com NaOH 6 N (Koch *et al.* 1999). Ao final do processo, todas as frações dialisadas foram congeladas e liofilizadas para obtenção dos respectivos rendimentos. O teor de celulose foi quantificado após digestão dos resíduos de fracionamento da parede celular com ácido nítrico: ácido

acético glacial: água destilada. O resíduo foi lavado em água deionizada, liofilizado e pesado, correspondendo à porcentagem de celulose (Gorshkova *et al.* 1996).

Uma alíquota de cada material dialisado foi submetida à hidrólise ácida com ácido trifluoroacético (TFA) 2N em ampolas seladas por 1 h a 121° C em autoclave. Após evaporação do ácido, as amostras foram dissolvidas em água deionizada, filtradas em filtros Millipore 45 µm, quantificadas quanto aos teores de carboidratos totais (Dubois *et al.* 1956) e de ácidos urônicos (Filisetti-Cozzi & Carpita 1991) e analisadas por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em coluna Carbo-Pac PA1 em sistema Dionex ICS 3000. Os monossacarídeos neutros foram eluídos isocraticamente com NaOH 20 mM e identificados por comparação dos tempos de eluição com padrões comerciais de monossacarídeos.

2.5. Análises ultra-estruturais

As análises estruturais foram realizadas em sementes recém coletadas nos diferentes estádios de maturação (45, 55 e 65 DAA), em sementes maduras após a secagem e após o armazenamento por 388 dias a 7, 25 e -18 °C, de acordo com procedimento descrito no item 2.2. Eixos embrionários na região próxima à inserção dos cotilédones, e cotilédones foram fixados separadamente em paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 50 mM, pH 7,2 e CaCl₂ 5 mM. A pós- fixação foi efetuada com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 1 h no escuro, a temperatura ambiente. Após lavagem com tampão cacodilato de sódio, as amostras foram desidratadas em série cetônica ascendente, infiltradas e incluídas em resina Spurr (Louro *et al.* 2003). A polimerização foi realizada por 16 h em estufa a 70 °C. Secções transversais e longitudinais das sementes (0,5-1,0 mm) foram obtidas em micrótomo Sorvall, aderidas em lâmina, coradas com azul de toluidina a 1% por 1-2 min e montadas em Permout. As amostras foram observadas em microscópio Axioplan 2.

Os cortes ultrafinos foram realizados com cerca de 700 nm, colhidos em grades de cobre de 400 *mesh* e posteriormente contrastados com acetato de uranila 1% em etanol absoluto e citrato de chumbo. As observações e eletromicrografias foram efetuadas através do MET JEOL 120.

2.6 Delineamento experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo utilizadas quatro repetições para os testes de germinação, índice de velocidade de germinação, tempo médio, variância do tempo médio, teor de água e massa seca e três repetições para as análises bioquímicas. No experimento de maturação os tratamentos foram constituídos pelas idades, ou seja, 45, 55 e 65 DAA. No experimento de armazenamento utilizou-se esquema fatorial 2X4, sendo duas temperaturas (7 °C e 25 °C) e quatro períodos (0, 30, 60 e 180). Sempre que possível, os resultados foram submetidos à análise de variância (Teste F, ao nível de 5% de probabilidade), empregando-se o teste Tukey para a comparação das médias, também a 5%. Quando necessário, para ajuste da normalidade, os valores foram transformados em $\text{arc sen } (\%)^{0.5}$.

3. Resultados

3.1 Variações fisiológicas, bioquímicas e estruturais durante a maturação das sementes

Caracterização fisiológica

As análises efetuadas com sementes de pau-brasil provenientes de Moji-Guaçu em três estádios distintos de maturação (45, 55 e 65 DAA) revelaram que a massa fresca (MF) máxima foi atingida aos 55 DAA (tabela 1). O maior valor de massa seca (MS) foi encontrado aos 65 DAA, embora incremento mais acentuado tenha sido observado entre 45 e 55 DAA. Ao longo do período de maturação, o teor de água dessas sementes diminuiu, atingindo cerca de 12% ao final da maturação (65 DAA), sendo 84% menor em relação ao primeiro estádio estudado (45 DAA). Foi evidenciado, também, aumento na porcentagem de germinação com a maturação das sementes, atingindo os 100% aos 55 DAA (tabela 1).

Tabela 1. Massa fresca (PF) inicial, massa seca (MS), teor de água e porcentagem de germinação (G) em três diferentes estádios de maturação (dias após a antese = DAA) das sementes de pau-brasil. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n = 4 para germinação e n = 3 para os demais parâmetros).

Estádio (DAA)	MF (mg)	Teor de água (%)	MS (mg)	G (%)
45	363 \pm 0,07	77,35	113 \pm 0,03	88
55	543 \pm 0,07	69,70	217 \pm 0,04	100
65	344 \pm 0,06	12,74	223 \pm 0,01	100

Dados fornecidos por S. Leduc (2007)

Carboidratos não estruturais

A análise do extrato etanólico das sementes de *C. echinata* mostrou que, apesar de ter sido observado aumento no peso seco das sementes a partir dos 45 DAA, houve redução de 63% no teor de açúcares totais nesse período (figura 3). A proporção dos açúcares redutores em relação aos açúcares totais também diminuiu passando de 43,7% para 29,7%. Entretanto, o teor de amido, quantificado inespecificamente pela dosagem de açúcar total, aumentou cerca de 64% nesse mesmo período, ou seja, de 45 para 55 DAA (figura 3).

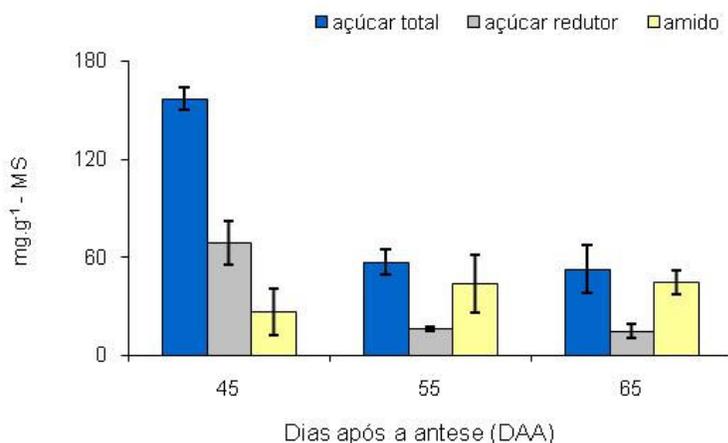


Figura 3. Teores de açúcares totais, açúcares redutores e amido (mg g^{-1} MS) extraídos de sementes de *C. echinata* em três estádios de maturação (45, 55 e 65 DAA). As barras representam o erro padrão da média ($n = 3$).

Para as sementes de pau-brasil foi observado aumento no teor de lipídios (extraídos pelas lavagens com solventes orgânicos) ao longo da maturação, passando de 31 mg.g^{-1} no início da maturação (45 DAA) para 72 mg.g^{-1} na fase final (65 DAA), correspondendo a cerca de 3% do peso seco da semente nessa fase.

Caracterização da parede celular durante a maturação

Coincidindo com o período no qual houve diminuição nos teores de açúcares totais (figura 3), o maior rendimento em parede celular (porcentagem em relação à massa seca da semente) foi observado aos 55 DAA, sendo a proporção de parede celular duas vezes maior do que no estágio anterior (figura 4). Após esse período, houve redução de cerca de 60% na proporção da parede celular em relação à massa seca total da semente.

Pelo cálculo da porcentagem de cada fração da parede celular em relação à massa seca total da parede nota-se que houve alteração na proporção das diferentes frações de 45 para 55 DAA (figura 5), com uma maior solubilização dos polissacarídeos na fração NaOH 1N, composta principalmente de hemiceluloses fracamente ligadas à celulose. Esses dados mostram que o incremento observado no rendimento total da parede de 45 para 55 DAA (figura 4) refere-se basicamente a alterações nessa fração.

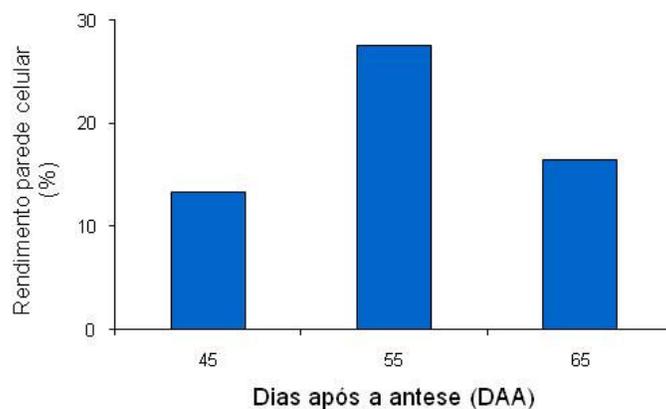


Figura 4. Rendimento de parede celular (%) das sementes de *C. echinata* (pau-brasil) em três estádios de maturação (45, 55 e 65 DAA). Os valores representam a média de três determinações.

A proporção relativa da fração oxalato de amônio e da fração de NaOH 6N diminuiu 45% e 23% após os 45 DAA, respectivamente. Em contraste, a proporção relativa das frações de NaOH 1N e de celulose aumentou 1,5 e 3,2 vezes, respectivamente, sendo essas alterações mantidas até o final da maturação (figura 5).

A composição dos polissacarídeos das diferentes frações da parede celular encontra-se na figura 6. Os monossacarídeos predominantes nas frações de pectinas (oxalato de amônio) e NaOH 1N foram arabinose e glucose, sendo observado aumento do primeiro e redução da proporção relativa do segundo, com a maturidade das sementes. Na fração de hemiceluloses fortemente ligadas a celulose (NaOH 6N), os açúcares predominantes foram glucose, arabinose e xilose, respectivamente, no início da maturação. Com a maturação houve incremento na proporção de glucose e, conseqüentemente, diminuição na proporção dos demais açúcares. Ramnose foi detectada apenas na fração NaOH 1N aos 45 DAA.

A quantificação de ácidos urônicos nas frações revelou predomínio desses açúcares na fração de pectinas, nos três estádios de maturação das sementes, conforme esperado, uma vez que a maior parte dos polissacarídeos ácidos encontra-se nessa fração (figura 7A). Com a maturação, o teor de ácidos urônicos diminuiu, contudo aos 65 DAA a proporção em relação à fração de açúcar total ainda era cerca de 4 vezes maior.

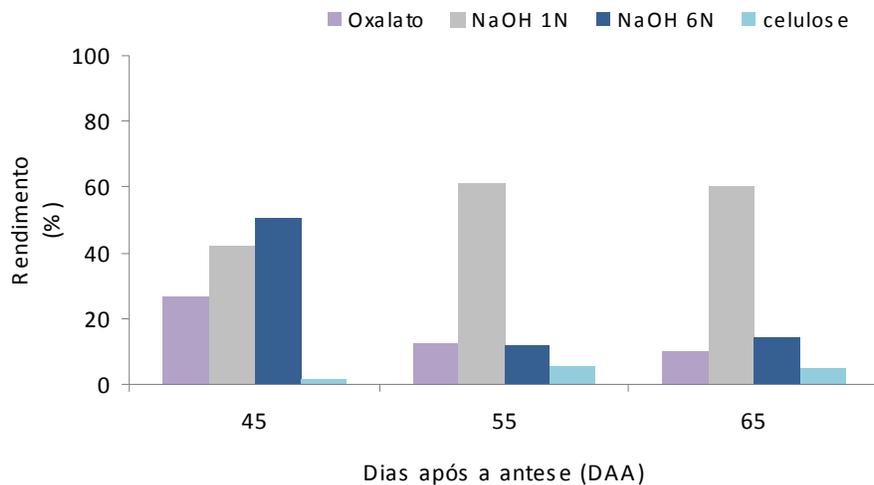


Figura 5. Rendimento das frações de parede celular (%) em sementes de *C. echinata* (pau-brasil) em três estádios de maturação (45, 55 e 65 DAA). Frações: oxalato = pectinas, NaOH 1N = hemiceluloses fracamente ligadas à celulose, NaOH 6N = hemiceluloses fortemente ligadas à celulose e celulose. Os valores representam a média de três determinações.

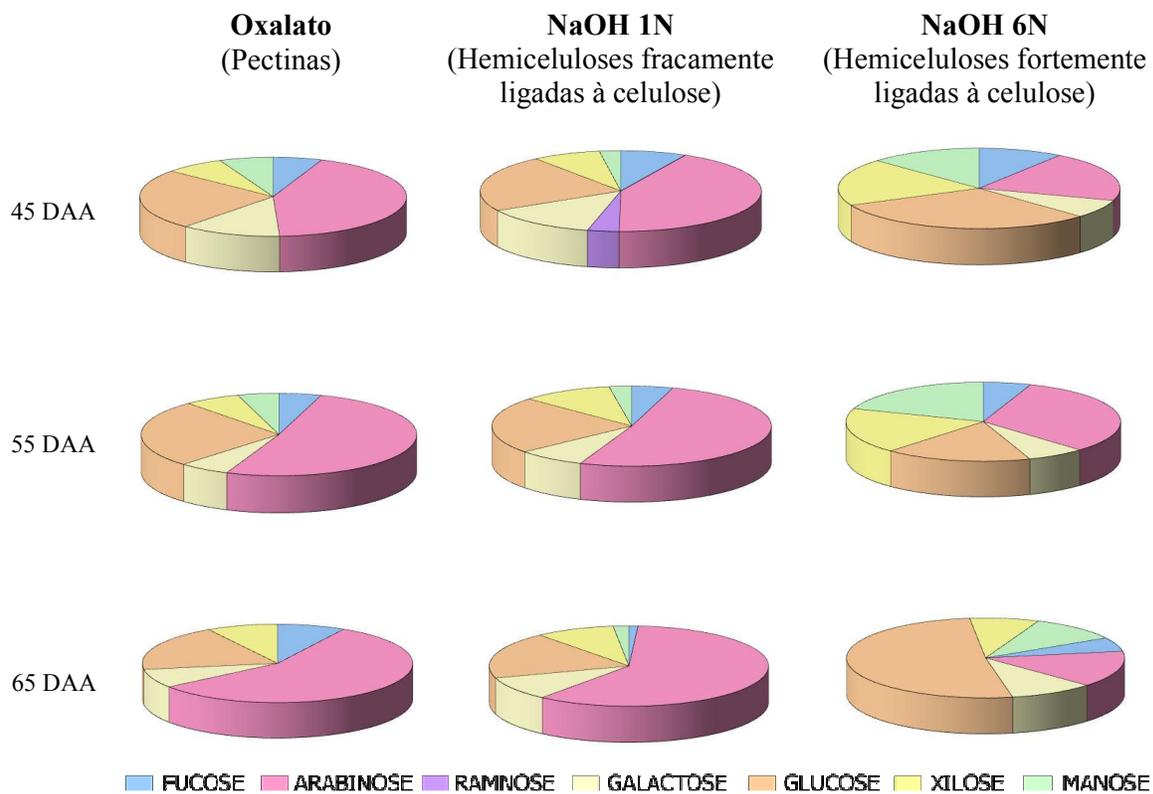


Figura 6. Composição em monossacarídeos (% relativa) em relação à massa seca da parede celular de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) em diferentes estádios de maturação (54, 55 e 65 DAA). Os valores representam a média de três determinações.

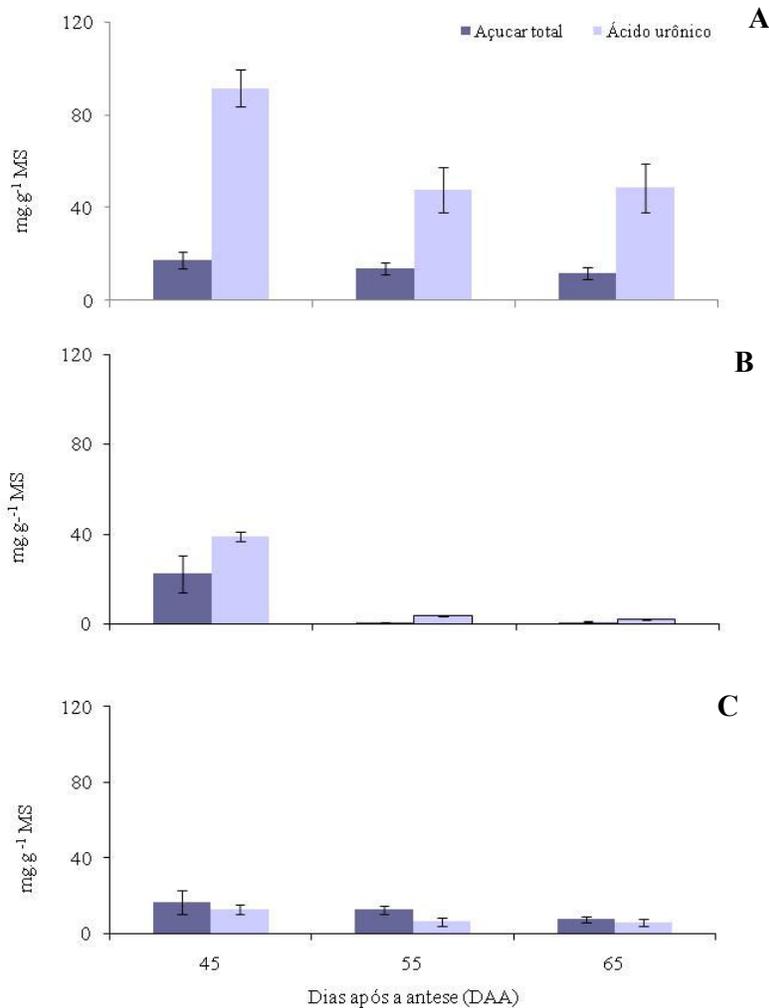


Figura 7. Teor de açúcares totais e ácidos urônicos ($\text{mg g}^{-1} \text{MS}$) nas frações da parede celular de sementes de pau-brasil em três estádios de maturação (45, 55 e 65 DAA). A: Fração de pectinas. B: Fração de hemiceluloses fracamente ligadas à celulose. C: fração de hemiceluloses fortemente ligadas à celulose. Os valores representam a média de três determinações e as barras os erros padrão.

Análises ultra-estruturais durante a maturação

As análises ultra-estruturais foram realizadas nos três estádios de maturação, em eixos embrionários, na região próxima à inserção dos cotilédones, e nos cotilédones. As descrições foram agrupadas por estágio de maturação.

Eixo embrionário

45 DAA – Cortes transversais mostram células túrgidas com citoplasma aderido a paredes celulares finas, com pequenas ondulações (figura 8 A) e, em alguns casos, com dobras bem acentuadas (figura 8 B). Adjacente à zona de interseção das células, as paredes tornam-se mais espessadas, sendo cerca de 3 a 5 vezes maiores do que nas demais regiões da célula (figura 8 C). O citoplasma apresenta-se denso e nele imersos observam-se amiloplastos contendo um ou mais grãos de amido e numerosos corpos protéicos distribuídos aleatoriamente ao longo da célula. O núcleo e as mitocôndrias apresentam estruturas preservadas, assim como o Golgi e o retículo endoplasmático, geralmente próximos à parede celular (figuras 8 A-C).

55 DAA – Cortes transversais evidenciam células túrgidas, com a parede ligeiramente espessada, com pequenas dobras (figura 9). O citoplasma é denso sendo observados numerosos plastídeos bem desenvolvidos com um ou mais grãos de amido e plastoglóbulos (figura 9 B). Imersos no citoplasma encontram-se, ainda, numerosos corpos protéicos, com conteúdo eletrondenso de aspecto granuloso, ocupando grande parte da célula (figura 9 A). Na região de junção entre as células adjacentes a parede celular apresenta-se mais espessada do que no restante da célula (figura 9 C). Os plastos apresentam numerosos grãos de amido e plastoglóbulos e o núcleo é bem delimitado, apresentando características preservadas ocupando grandes porções do citoplasma. Adjacentes às paredes celulares, vesículas ricas em lipídios podem ser observadas. Em ambas as células, evidenciam mitocôndrias com características preservadas, Golgi e retículo endoplasmático são visualizados adjacentes à parede celular e dispersos ao acaso, respectivamente (figura 9 A-C).

65 DAA – Cortes transversais evidenciam paredes espessas e levemente onduladas, campos primários de pontuação regularmente espaçados (figura 10 A). O citoplasma é denso com a presença de numerosos grãos de amido, corpos protéicos de conteúdo eletrondenso finamente granular de grandes dimensões e outros com matriz pouco granulosa e pouco preenchida (figura 10 A, B). Observa-se, ainda, a presença de grande número de vesículas lipídicas distribuídas, principalmente, ao longo da plasmalema (figura 10 B, C). As mitocôndrias não apresentam suas características preservadas, assim como, o retículo endoplasmático.

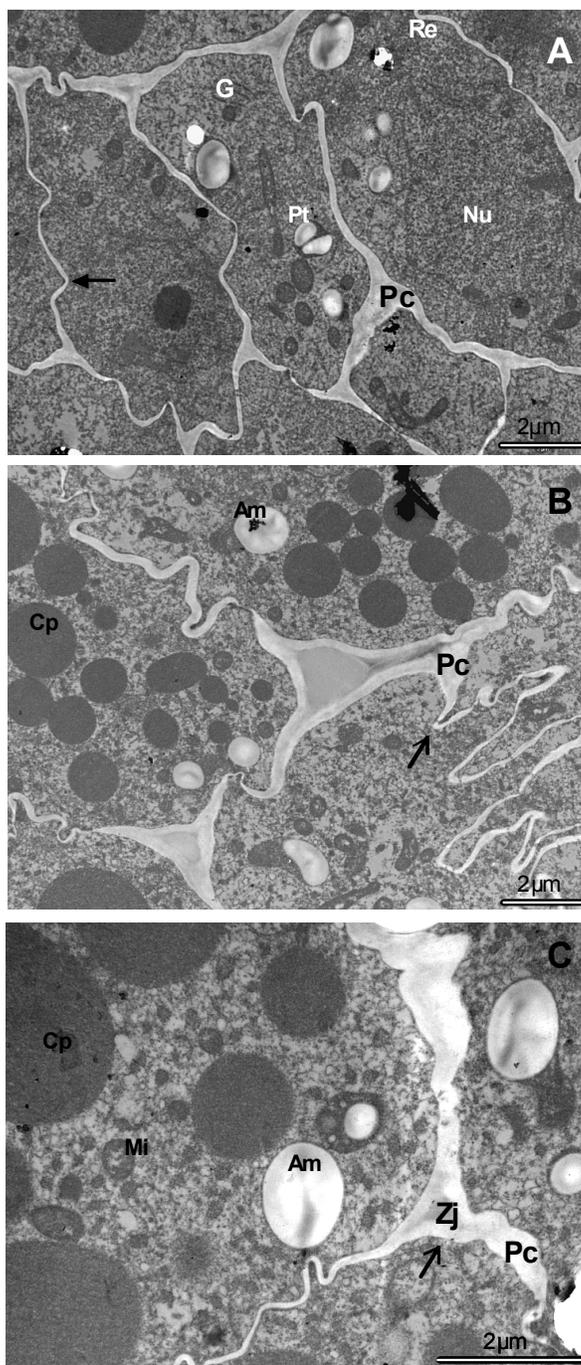


Figura 8. Eletromicrografias de cortes transversais da região do parênquima de eixo embrionário de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) aos 45 DAA. A – Células com dobras e ondulações nas parede celular (Pc). B – Detalhe das dobras da parede celular. C- Detalhe da zona de junção das células (Zj). As setas indicam dobras na parede celular. Am: Grão de amido; Cp: Corpo proteico; G: Complexo de Golgi; Nu: Núcleo; Mi: Mitocôndria; Pt: plastídeo, Re: Retículo endoplasmático.

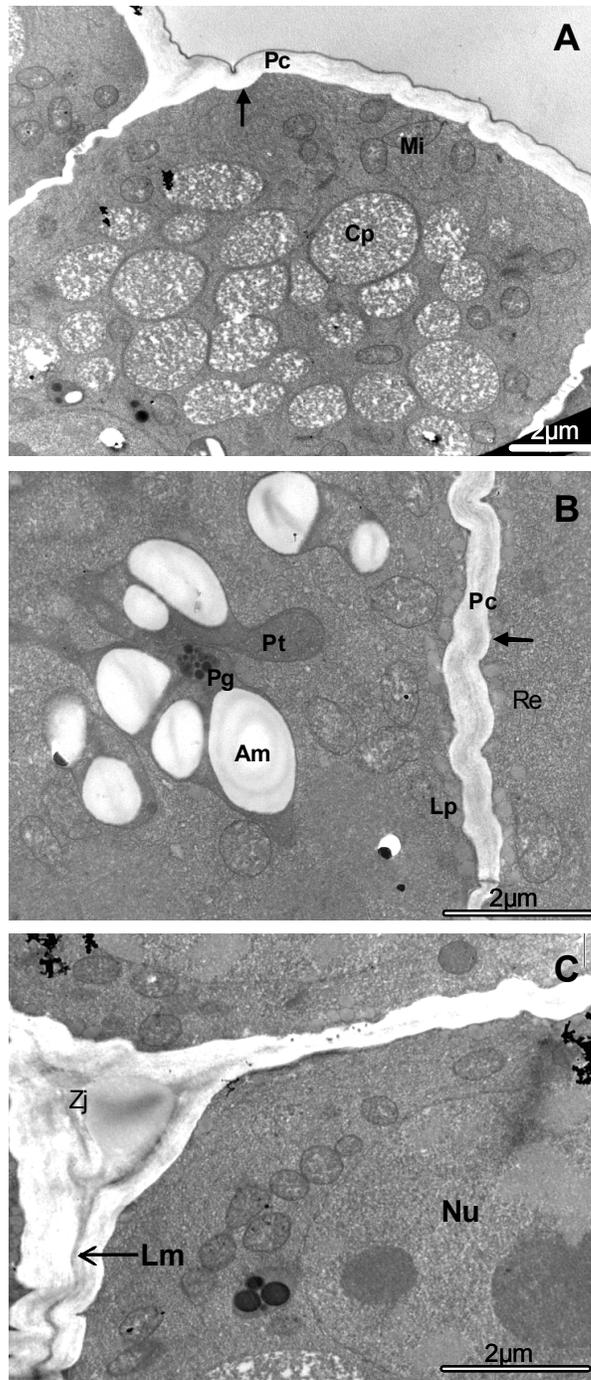


Figura 9. Eletromicrografias de cortes transversais do eixo embrionário de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) aos 55 DAA. A- Parede celular espessada (Pc) com ondulações (seta). B – Detalhe da parede celular. C – Detalhe da zona de junção das células com lamela média (Lm) bem definida. As setas indicam dobras na parede celular. Pt: plastídeo Am: grão de amido; Cp: Corpo proteico; Lp: vesículas de lipídeo; Nu: Núcleo; Mi: Mitochondria; Re: Retículo endoplasmático; Zj: zona de junção das células.

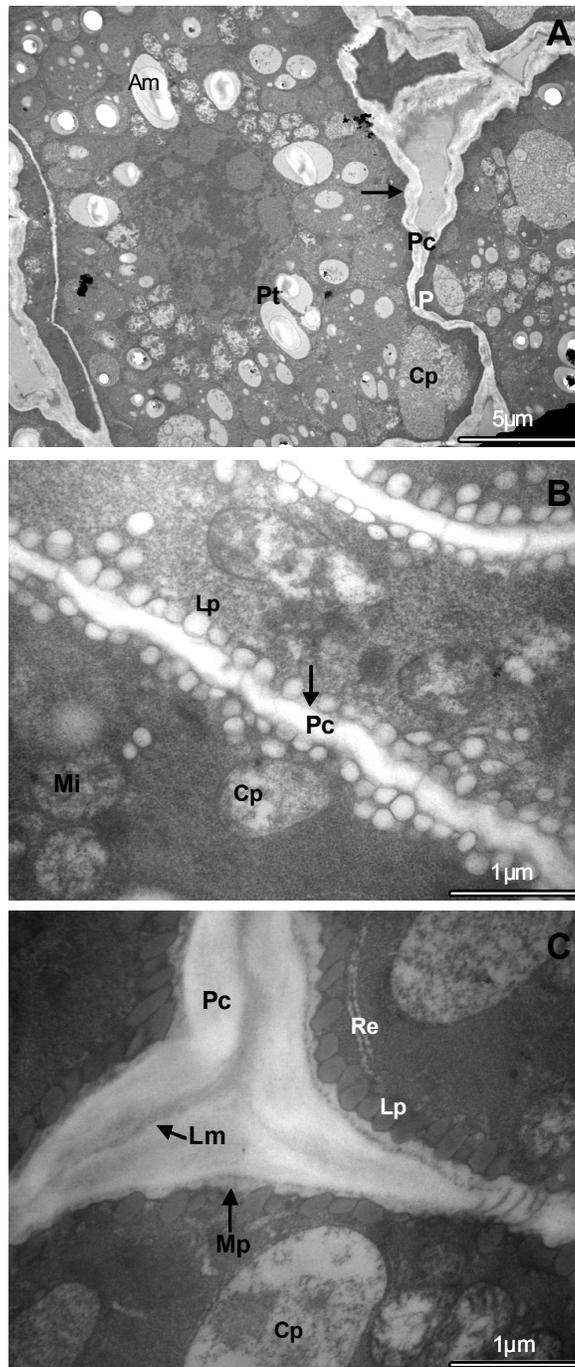


Figura 10. Eletromicrografias de cortes transversais do eixo embrionário de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) aos 65 DAA. A – Célula com paredes celulares (Pc) levemente onduladas (seta). B – Detalhe da parede celular com vesículas de lipídeos. C – Detalhe da zona de junção das células. Am: Grão de amido; Cp: Corpo proteico; Lp: Vesícula de lipídeo; Lm: Lamela média; Mi: Mitocôndria; Mp: plasmalema; Pt: plastídeo; Re: Retículo endoplasmático.

Cotilédones

45 DAA – Cortes transversais na região das células parenquimáticas, evidenciaram paredes celulares de espessura heterogênea, freqüentemente espessadas, porém com regiões delgadas nos campos primários de pontoações (figura 11 A). Os amiloplastos possuem forma e dimensões variadas e, geralmente um único grão de amido ocupa toda a região da matriz. Os corpos protéicos apresentam conteúdo granular, sem uniformidade e as vesículas lipídicas, presentes em grande quantidade, encontram-se sem organização aparente, dispersas no citoplasma (figura 11 B). As mitocôndrias apresentam características preservadas, e juntamente com o retículo endoplasmático e complexo de Golgi aparecem distribuídos aleatoriamente no citoplasma (figuras 11 A, B).

55 DAA – Nos cortes transversais na região das células parenquimáticas verifica-se espessamento irregular das paredes celulares, com as regiões dos campos primários de pontoações, de distribuição regular (figura 12 A, B) e com espessamento menor do que as demais regiões da parede. Os amiloplastos, nesta etapa, sofrem aumento nas dimensões e podem ser observados com um ou mais grãos de amidos imersos em sua matriz. Os corpos protéicos aumentam em número e dimensões, ocupando grande parte do citoplasma e sua matriz apresenta-se totalmente preenchida por fina granulosidade eletrondensa (figura 12 A). Adjacente aos amiloplastos e a membrana plasmática, ocorre aumento no número de vesículas lipídicas (figura 12 B).

65 DAA – Cortes transversais na região das células parenquimáticas, mostram espessamento irregular das paredes celulares, com as regiões dos campos primários de pontoações, que possuem distribuição regular e grande número de plasmodesmas (figura 13 A) e com menor espessamento do que as demais regiões da parede. Foi observado aumento na quantidade e nas dimensões dos grânulos de amido e aumento no número dos grãos agregados em amiloplastos (figura 13 B). Evidenciam-se numerosas vesículas lipídicas organizadas ao redor dos amiloplastos e ao longo da membrana plasmática. Por vezes, observa-se aparente coalescência de algumas delas, tornado-se unidas umas as outras e maiores em dimensão (figura 13 A, B).

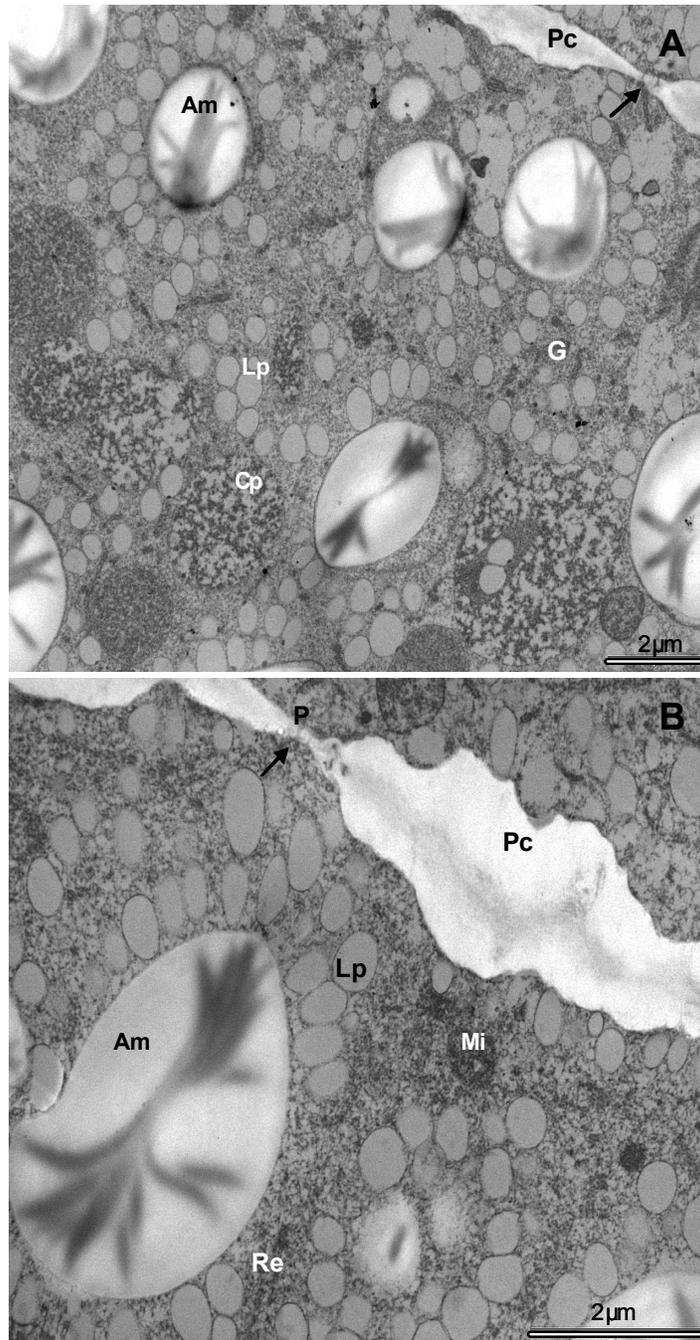


Figura 11. Eletromicrografias de cortes transversais de cotilédones de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) aos 45 DAA. A-. Detalhes dos grãos de amido, parede celular e vesículas de lipídeo. B – Detalhe da parede celular (Pc) com a seta indicando campo de pontuação (P), também visível na figura A. Am:Grão de amido; Cp: Corpo proteico; G: Complexo de Golgi; Lp: Vesícula de lipídeo; Re: Retículo endoplasmático.

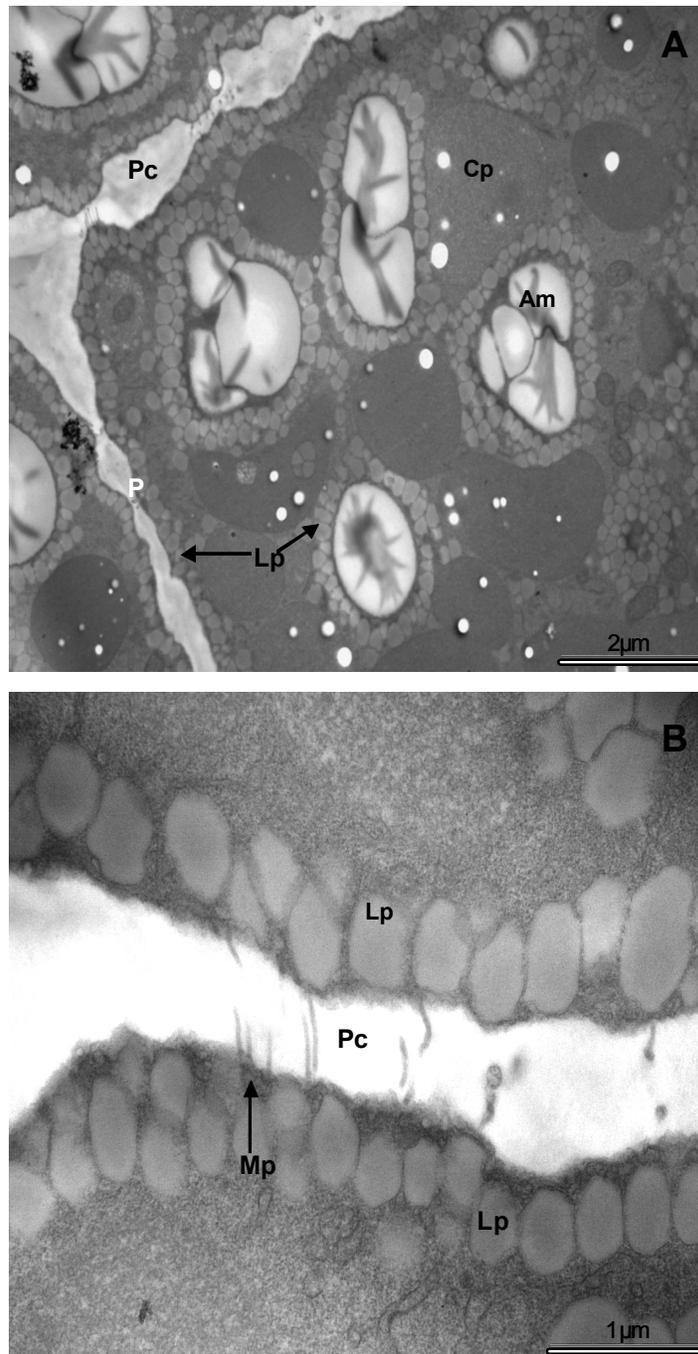


Figura 12. Eletromicrografias de cortes transversais de cotilédones de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) aos 55 DAA. A- Detalhe da parede celular (Pc) e plastídeos contendo grãos de amido. B – Detalhe das vesículas de lipídeo que aparecem junto à membrana plasmática. Am:Grão de amido; Cp: Corpo proteico; Lp: Vesícula de lipídeo; Mp: Plasmalema; P: Campo primário de pontoação.

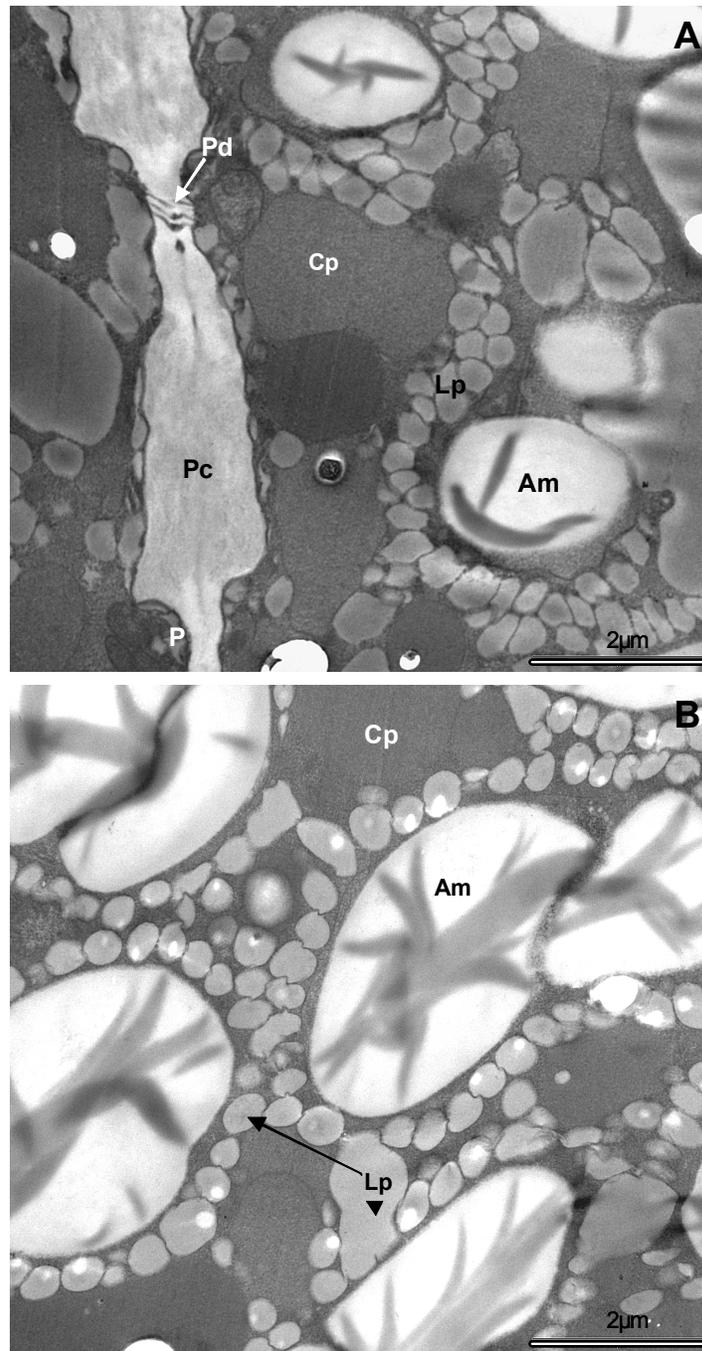


Figura 13. Eletromicrografias de cortes transversais de cotilédones de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) aos 65 DAA. A- Detalhe da parede celular (Pc). B- Detalhe do grãos de amido circundados por vesículas de lipídeo. Am:Grão de amido; Cp: Corpo proteico; Lp: Vesícula de lipídeo; P: Campo primário de pontuação; Pd = Plasmodesmata.

3.2. Variações fisiológicas, bioquímicas e estruturais durante o armazenamento das sementes

Caracterização fisiológica

As sementes de pau-brasil frescas (T0 fresca) apresentavam cerca de 89% de germinação produzindo 75% de plântulas normais. Para as sementes secas, tanto a porcentagem de germinação quanto a produção de plântulas normais foi menor, ao redor de 58% do valor inicial. O armazenamento após 30 dias, em baixa temperatura (7 °C), ocasionou um aumento na porcentagem de germinação, em relação às sementes não armazenadas (T0 seco), porém esse comportamento não se manteve ao longo do armazenamento. Nas sementes armazenadas a 7 °C, embora tenha sido observada redução na porcentagem de produção de plântulas normais, os resultados não diferiram estatisticamente, mostrando que o tempo de armazenamento não influenciou essa variável. Contudo, nas sementes armazenadas a 25 °C foi observada a perda na capacidade de produção de plântulas logo aos 30 dias de armazenamento, embora a porcentagem de germinação tenha sido reduzida gradativamente. Excetuaram-se as sementes congeladas (-18 °C) que, mesmo após 180 dias de armazenamento, mantiveram a capacidade germinativa e a produção de plântulas normais relativamente altas (tabela 2). Uma vez armazenadas, as sementes de pau-brasil mostraram pequenas variações no teor de água (de 6 a 11%) com acréscimo ao final do armazenamento, nas duas temperaturas, sendo esse ganho mais acentuado nas sementes armazenadas a 25 °C.

Os valores de matéria seca não apresentaram diferenças significativas durante o armazenamento, independente da temperatura de armazenamento (tabela 2).

Em relação ao IVG (tabela 2), que se refere ao número de sementes germinadas por tempo de semeadura, as sementes de pau-brasil armazenadas a 7 °C apresentam os maiores valores (3,3 a 0,85) do que as armazenadas a 25 °C, que apresentam valores de 0,71 a 0. Durante o armazenamento, os IVGs apresentaram pequenas flutuações, sendo que as sementes armazenadas a temperatura ambiente apresentaram redução linear destes, apresentando valor nulo após 180 dias de armazenamento. Os tempos médios (tabela 2) das sementes armazenadas a 7 °C variaram de 2,6 a 7,1, enquanto que nas mantidas a 25 °C estes valores ficaram entre 5,2 a 0, com tendência a redução com o tempo de armazenamento. Embora para os valores de IVG e tempo médio tenha sido observada interação entre os fatores tempo e temperatura de armazenamento, isso não foi verificado para os valores da variância do tempo médio, que ficaram ao redor de 4,4 nas sementes armazenadas a 7 °C e de 0,6 para aquelas armazenadas a 25 °C, indicando que a germinação nessa última condição foi mais uniforme do que aquela observada para as sementes armazenadas a 7 °C. Por outro lado,

independentemente da temperatura de armazenamento, a variância do tempo médio de germinação não foi alterada com o tempo de armazenamento.

Tabela 2. Germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%), teor de água (%), massa seca (mg g⁻¹ MF), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio (Tm) e variância do tempo médio (S²Tm) das sementes de *C. echinata* (pau-brasil) recém coletadas (T0), após a secagem (T0 seca) e durante o armazenamento em diferentes temperaturas (n = 4).

Germinação	Tempo de armazenamento				médias
	Inicial	30 dias	60 dias	180 dias	
7 °C	52aB	67aA	33aC	35aC	-
25 °C	52aA	19bB	6bC	0bC	-
-18 °C	52	-	-	79	-
<i>C.V (%)</i>	17,63				
IVG					
7 °C	1,6aB	3,3aA	0,8a	1,2aC	-
25 °C	1,6aA	0,7bB	0,7aB	0bC	-
-18 °C	-	-	-	-	-
<i>C.V (%)</i>	25,55				
Tempo médio					
7 °C	6,4aA	2,6aB	7,1aA	4,3aAB	-
25 °C	6,4aA	3,1aBC	5,2aAB	0bC	-
-18 °C	-	-	-	-	-
<i>C.V (%)</i>	36,47				
Variância do tempo médio					
7 °C	1,4	1,6	8,1	6,6	4,4a
25 °C	1,4	0,8	0	0	0,6b
-18 °C	-	-	-	-	-
<i>Médias</i>	1,4A	1,2A	4,1A	3,3A	
<i>C.V (%)</i>	65,56				
Plântulas normais					
7 °C	31,2aA	18,7aA	16,7aA	14,6aA	-
25 °C	31,2aA	0bB	2,1bB	0bB	-
-18 °C	31,2	-	-	64,5	-
<i>C.V (%)</i>	46,76				
Teor de água					
7 °C	6,1aB	6,7bAB	6,3bB	7,2bA	-
25 °C	6,1aC	8,8aB	8,6aB	10,6aA	-
-18 °C	6,1	-	-	8,6	-
<i>C.V (%)</i>	3,99				
Massa seca					
7 °C	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3a
25 °C	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3a
-18 °C	0,3	-	-	0,3	-
<i>Médias</i>	0,3A	0,3A	0,3A	0,3A	
<i>C.V (%)</i>	10,46				

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

Carboidratos não estruturais

A análise do extrato etanólico das sementes de *C. echinata* mostrou que após a secagem houve tendência à redução nos teores de açúcares totais. Contudo, após 30 dias de armazenamento, indiferentemente da temperatura, o teor de açúcar total aumentou cerca de 40%, mantendo essa média até o final do armazenamento. Os teores de açúcares redutores representaram pequena proporção dos açúcares totais, mantendo-se durante o armazenamento, exceto aos 180 dias de armazenamento, quando houve aumento de 4 vezes o valor inicial. Não foi observada diferença entre as temperaturas de armazenamento (figura 14).

O teor de amido diminuiu durante o armazenamento, sendo o decréscimo ligeiramente mais acentuado nas sementes mantidas a temperatura ambiente, quando comparadas àquelas armazenadas a 7 °C (figura 14 C). Foi observada uma relação direta entre o teor de amido e a temperatura de armazenamento. Aos 180 dias as sementes armazenadas, a -18 °C, apresentaram 68% menos amido do que as sementes não armazenadas (T0 seca).

Apesar de pequenas oscilações, entre os tempos de armazenamento, o teor de lipídios manteve-se estável durante o armazenamento, independentemente da temperatura, correspondendo a cerca de 5% do peso seco da semente.

Caracterização da parede celular durante o armazenamento

Analisando o rendimento (%) em parede celular, ficou evidenciado que o armazenamento, independentemente da temperatura, não alterou a proporção de parede celular em relação ao peso seco da semente, exceção feita para o congelamento por 180 dias (figura 15). Contudo, a porcentagem relativa das frações da parede celular variou ao longo do armazenamento, indicando que ocorreram alterações na solubilização dos diferentes polissacarídeos constituintes (figura 16). Aos 30 dias de armazenamento a 7°C, não foram observadas alterações significativas nas proporções das diferentes frações analisadas, porém a partir de 60 dias houve aumento de 50% na solubilização das pectinas (oxalato) e expressiva redução na proporção de hemiceluloses solubilizadas em NaOH 1N (figura 16 B).

Em contraste, para sementes armazenadas em temperatura ambiente, as principais alterações foram observadas aos 30 dias do armazenamento, com aumento nas frações de oxalato, NaOH 6N e de celulose, em cerca de 60, 90 e 150%, respectivamente. Ao longo do armazenamento, essa proporção foi novamente alterada (figura 16 C).

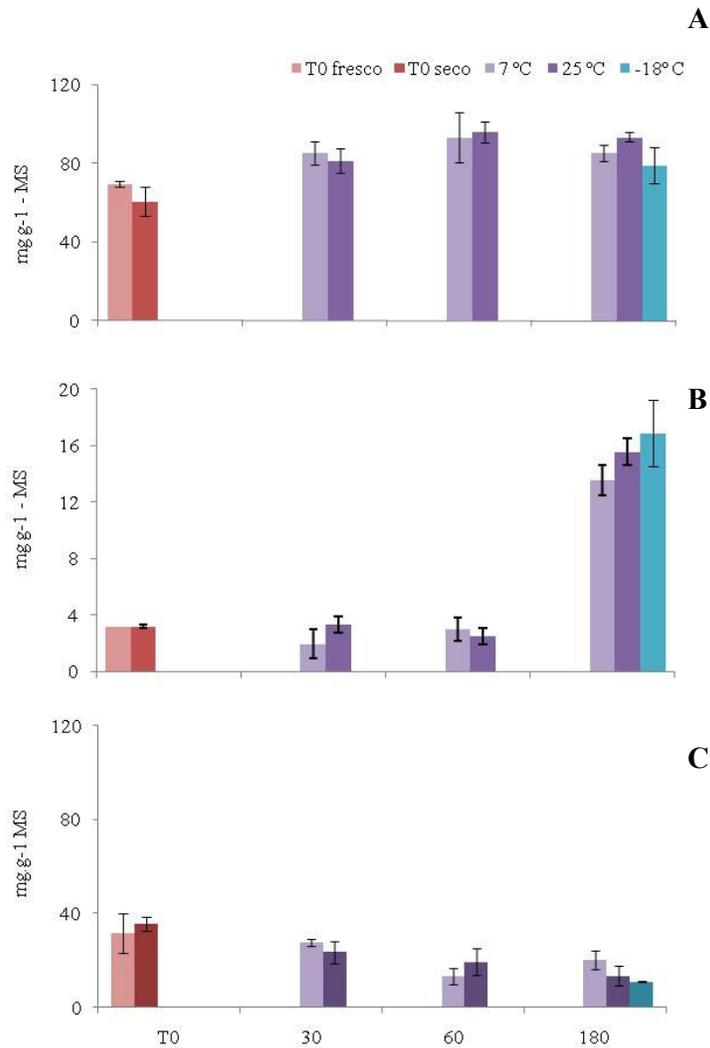


Figura 14. Teores de açúcares totais (A), açúcares redutores (B) e amido (C) (mg g^{-1} MS) em sementes de *C. echinata* fresca (T0 fresca), seca (T0 seca) e durante o armazenamento em diferentes temperaturas. As barras representam o erro padrão da média de triplicatas.

O perfil das frações da parede celular das sementes congeladas assemelha-se ao perfil das sementes armazenadas por 30 dias em temperatura ambiente, exceto pela fração pécica (figura 16 D). Houve aumento na solubilização das frações oxalato, NaOH 6N e celulose em detrimento das hemiceluloses extraídas em NaOH 1N, cuja fração que sofreu redução de 54% (figura 16 D).

A composição em monossacarídeos neutros das diferentes frações da parede celular encontra-se nas figuras 17, 18 e 19. Em todas as frações, a temperatura de armazenamento parece ter ocasionado alterações nas proporções relativas desses açúcares.

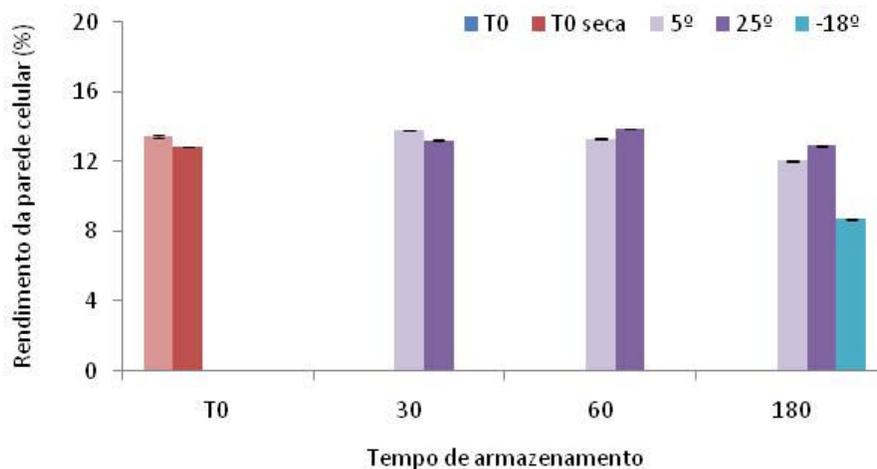


Figura 15. Rendimento de parede celular (%) das sementes de *C. echinata* (pau-brasil) frescas (T0), após a secagem (T0 seca) e durante o armazenamento em diferentes temperaturas. As barras representam o erro padrão da média de triplicatas.

Os monossacarídeos predominantes na fração de oxalato de amônio (figura 17) foram xilose/manose, arabinose e galactose. Para as sementes secas, foi observada diminuição da proporção relativa de ramnose e xilose/manose. Entretanto, houve aumento da proporção relativa da fucose, arabinose e galactose. O armazenamento em baixa temperatura (7 °C) por 30 dias levou à redução no teor de ramnose e de arabinose e aumento na proporção relativa de galactose a partir desse período. Em relação à condição seca inicial, a manutenção das sementes à temperatura ambiente promoveu redução na proporção relativa de glucose e aumento de galactose e ramnose. Apesar da proporção relativa de arabinose ter diminuído com o armazenamento a 7 °C, esse decréscimo foi mais acentuado, cerca de 70%, com o armazenamento à temperatura ambiente. As sementes congeladas, ao final do armazenamento, apresentaram diminuição na proporção relativa de fucose e de glucose (17% e 81%, respectivamente), quando comparadas às sementes não armazenadas, assemelhando-se à condição de armazenamento por 30 dias à temperatura ambiente.

Os açúcares predominantes da fração de hemiceluloses fracamente ligadas à celulose (NaOH 1N) foram a arabinose, encontrada em maior proporção, seguida pela xilose/manose e galactose (figura 18). Nas sementes secas não foram observadas alterações expressivas nas proporções relativas dos monossacarídeos neutros dessa fração. Ao longo do armazenamento, independentemente da temperatura, essas proporções mantiveram-se muito semelhantes àquelas das sementes não armazenadas. A única exceção ocorreu com a proporção de glucose no armazenamento em baixa temperatura, que aos 60 dias apresentou-se 44% maior do que nas sementes não armazenadas (figura 18).

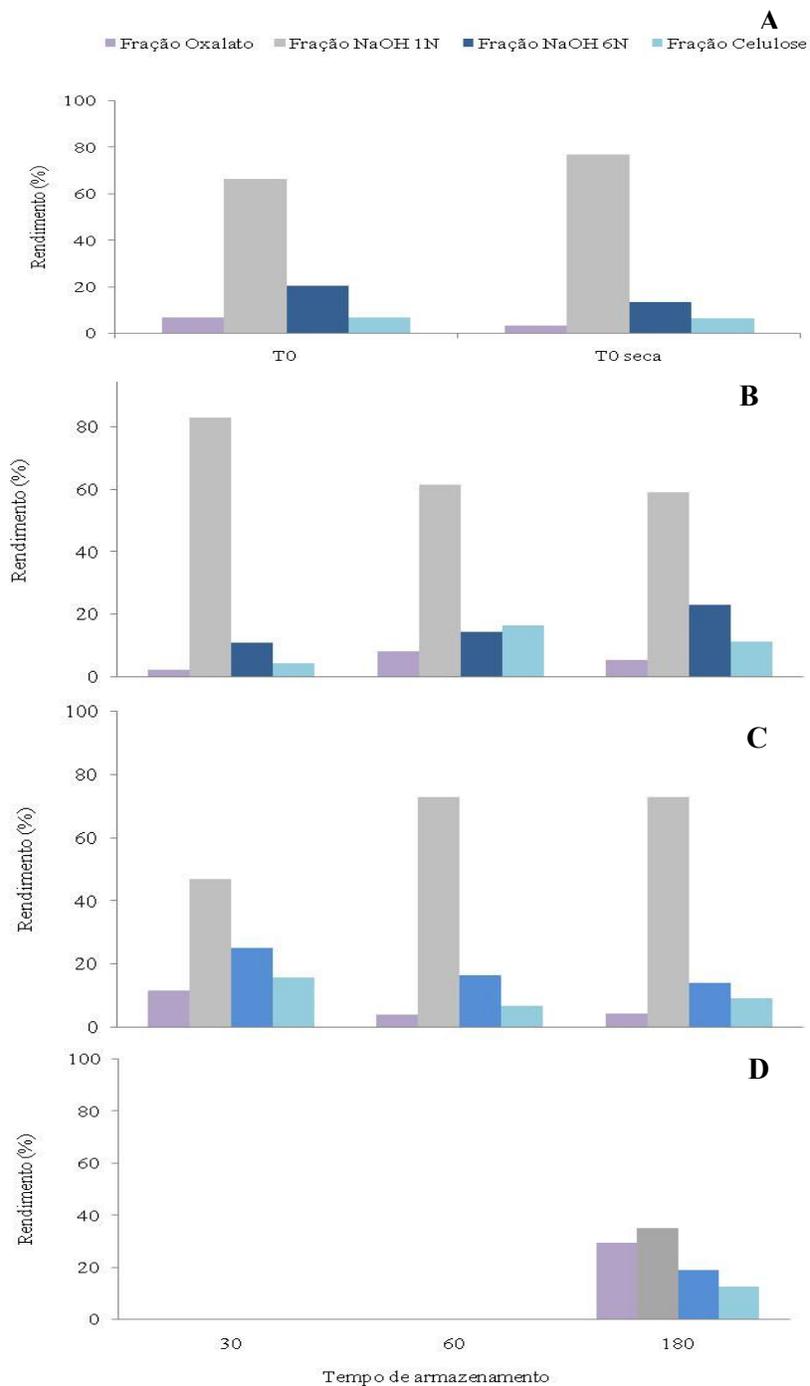


Figura 16. Rendimento das frações de parede celular (%) em sementes de *C. echinata* (pau-brasil). T0 fresca e seca (A), e armazenadas por até 180 dias a 7 °C (B), 25 °C (C) e -18 °C (D).

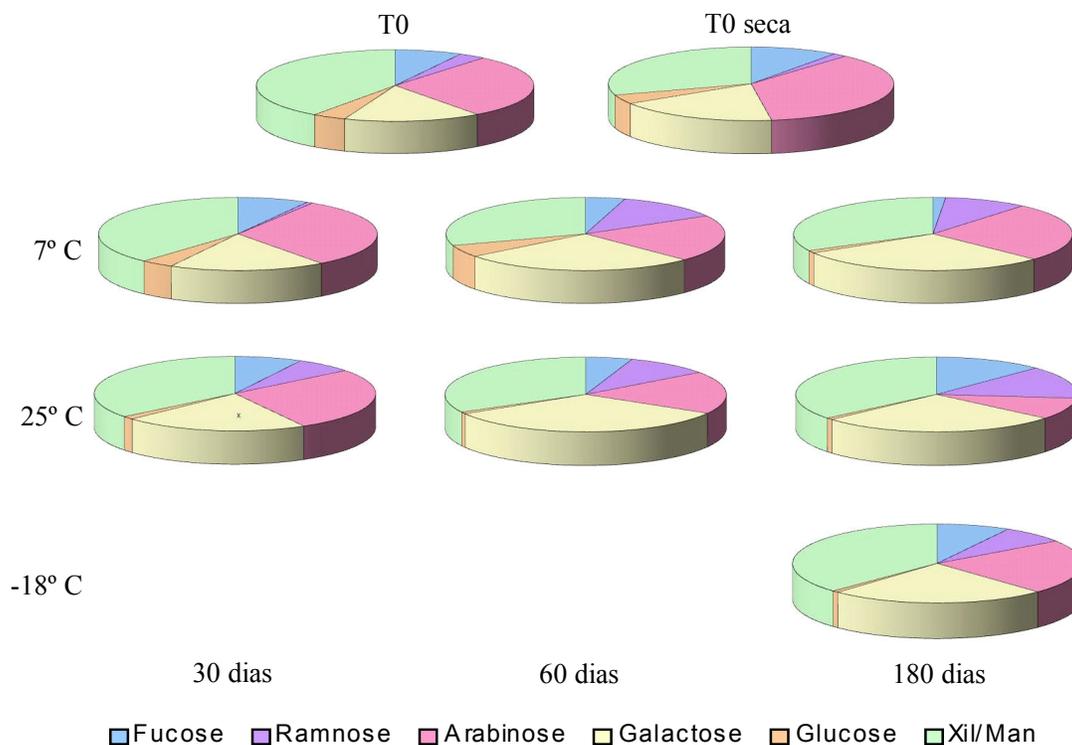


Figura 17. Composição em monossacarídeos (% relativa) da fração oxalato de amônio da parede celular de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) no momento da coleta (T0), após a secagem (T0 seca) e ao longo do armazenamento em diferentes temperaturas.

Arabinose, xilose/manose e glucose foram os açúcares predominantes da fração de hemiceluloses fortemente ligadas à celulose (NaOH 6N) (figura 19). As alterações mais expressivas observadas foram aumento de arabinose e redução de glucose aos 180 dias, em sementes mantidas a 7 °C e à temperatura ambiente. Com exceção da proporção relativa de glucose, que aumentou em 50%, o congelamento (-18° C) aparentemente não alterou expressivamente as demais proporções (figura 19). Foi observado pequeno aumento na proporção relativa de xilose/manose.

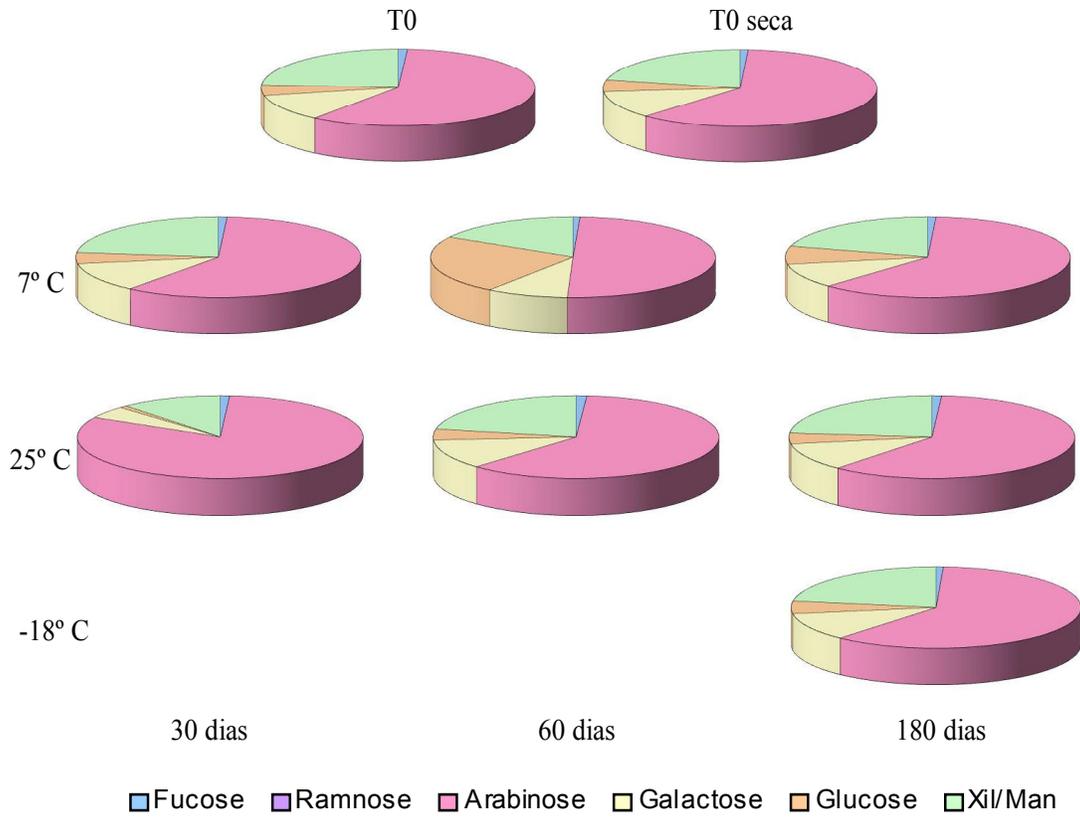


Figura 18. Composição em monossacarídeos (% relativa) da fração NaOH 1N da parede celular de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) no momento da coleta (T0), após a secagem (T0 seca) e ao longo do armazenamento em diferentes temperaturas.

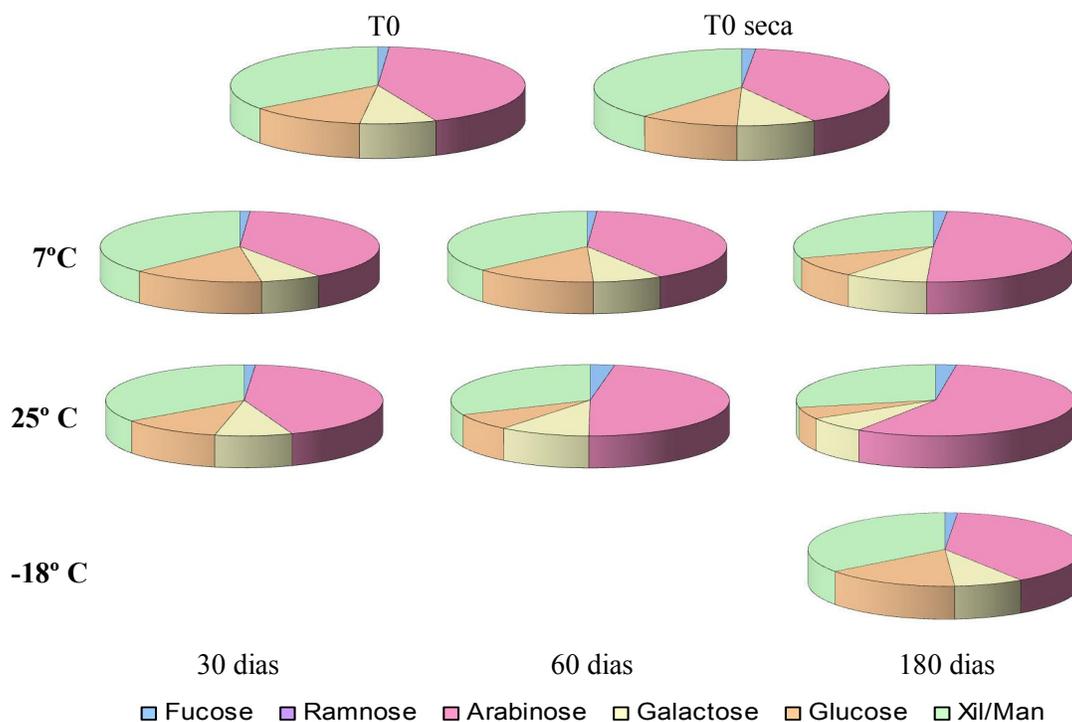


Figura 19. Composição em monossacarídeos (% relativa) da fração NaOH 6N da parede celular de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) no momento da coleta (T0), após a secagem (T0 seca) e ao longo do armazenamento em diferentes temperaturas.

A quantificação de ácidos urônicos nas frações da parede celular apontou os maiores teores na fração de oxalato de amônio e, principalmente, nas sementes armazenadas a 7° C. Contudo, esse teor foi reduzido ao longo da maturação, em todas as temperaturas analisadas. Em relação ao teor de açúcar total, este foi predominante em todas as frações da parede celular, sendo reduzido somente aos 180 dias, mais acentuadamente na fração NaOH 1N, para as sementes armazenadas a 7° C. Apesar da redução de 30%, ao 30 dias, o teor de açúcar total se manteve estável ao longo do armazenamento em temperatura ambiente.

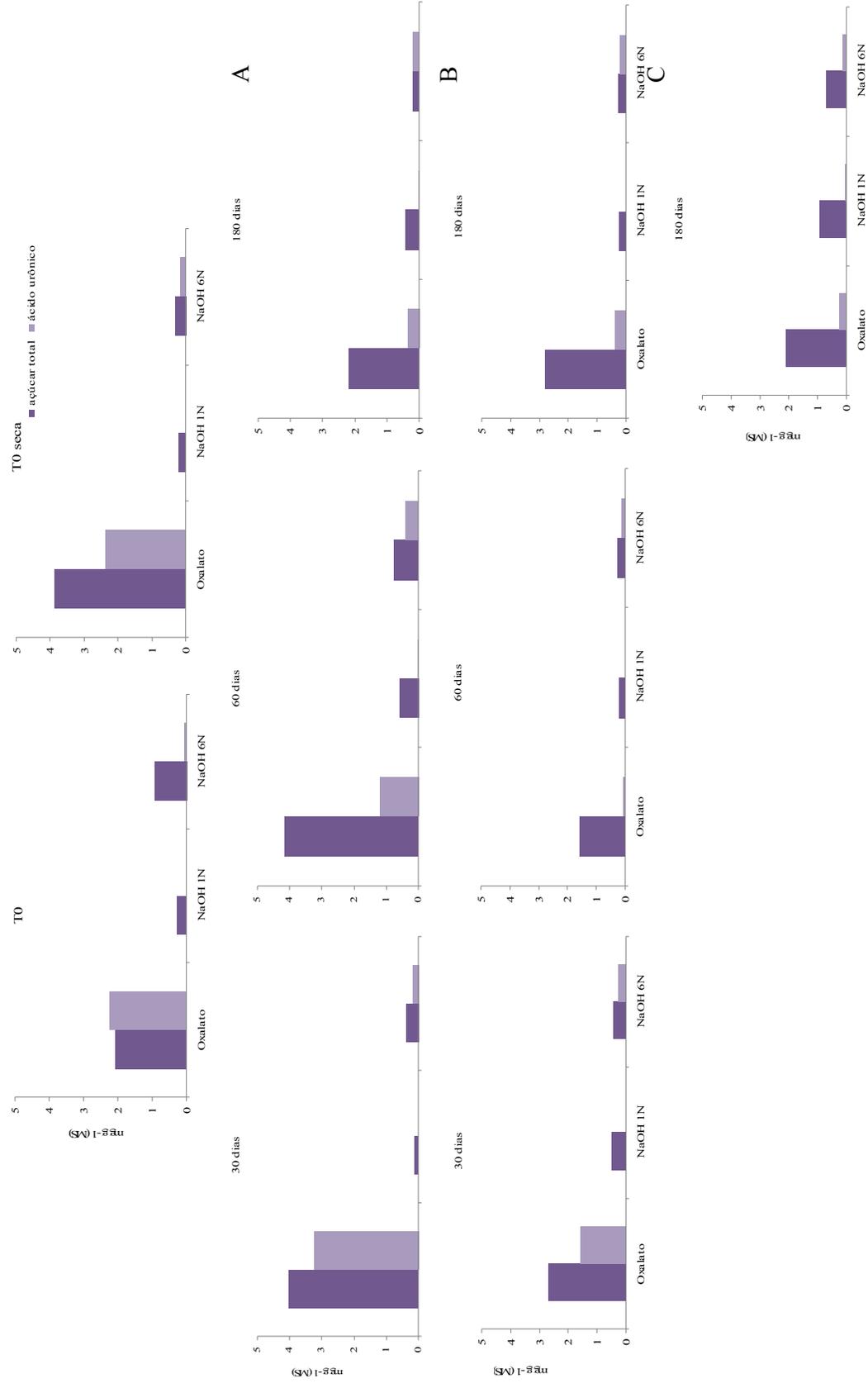


Figura 20. Teor de açúcares totais e ácidos urônicos ($\text{mg g}^{-1} \text{MS}$) nas frações da parede celular de sementes de pau-brasil. A: Sementes armazenadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; B: sementes armazenadas a $7\text{ }^{\circ}\text{C}$; C: sementes armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Oxalato= pectinas, NaOH 1N= hemiceluloses fracamente ligadas a celulose e NaOH 6N= hemiceluloses fortemente ligadas à celulose.

Análises ultra-estruturais durante o armazenamento

As sementes de pau-brasil, T0 seco, foram armazenadas a 7° C, em temperatura ambiente de laboratório (± 25 °C) e congeladas (-18 °C). Problemas técnicos durante o procedimento de emblocamento das amostras impediram a obtenção de cortes dos materiais armazenados por 30, 60 e 180 dias nas condições mencionadas. Desse modo, as análises ultra-estruturais foram realizadas, nos eixos embrionários, na região próxima à inserção dos cotilédones, e nos cotilédones, com as sementes secas (T0 seca) e após os 338 dias de armazenamento em cada temperatura, período no qual a viabilidade havia sido perdida na temperatura ambiente, reduzida no armazenamento a 7 °C, de cerca de 50% para 10%, e mantida no congelamento (Barbedo *et al.* 2002, Hellmann *et al.* 2006). Para as sementes recém coletadas e secas (T0 seca) não foi possível a obtenção de cortes dos cotilédones.

Eixo embrionário

T0 seca – Em secções transversais as células apresentam paredes anticliniais espessadas, com pequenas ondulações. A membrana plasmática e citoplasma encontram-se aderidos à parede celular, entretanto, em algumas regiões já é possível observar retração do protoplasto. Imersos, no citoplasma, observam-se plastídeos, contendo grãos de amido, grande número de corpos protéicos com matriz granulosa eletrondensa e dispersa. Adjacentes à parede celular encontram-se vesículas lipídicas (figura 20 A). Algumas células apresentam o citoplasma com numerosos corpos protéicos com grandes dimensões, de conteúdo granuloso, mais eletrondenso, que ocupa toda região da matriz (figura 20 B). Observa-se grande quantidade de mitocôndrias com perda da estrutura característica (figura 20 A, B).

Temperatura ambiente – Em secções transversais as células apresentam paredes pouco onduladas e delgadas. De um modo geral, observa-se retração do protoplasto (figura 21 A), observando-se grandes espaços entre a parede celular e a membrana plasmática. Os amiloplastos estão em número reduzido, quando comparados ao embrião T0 seco, e por vezes, já se observa o rompimento das membranas envoltórias dos plastídeos, resultando na dispersão dos grãos de amido no citoplasma (figura 21 A, B). Os corpos protéicos, de conteúdo eletrondenso granuloso, ocupam grande parte do citoplasma (Figura 21 B). Nesta fase ocorre diminuição no número de vesículas de lipídeo e de mitocôndrias, que apresentam perda do seu arranjo característico (Figura 21 A, B).

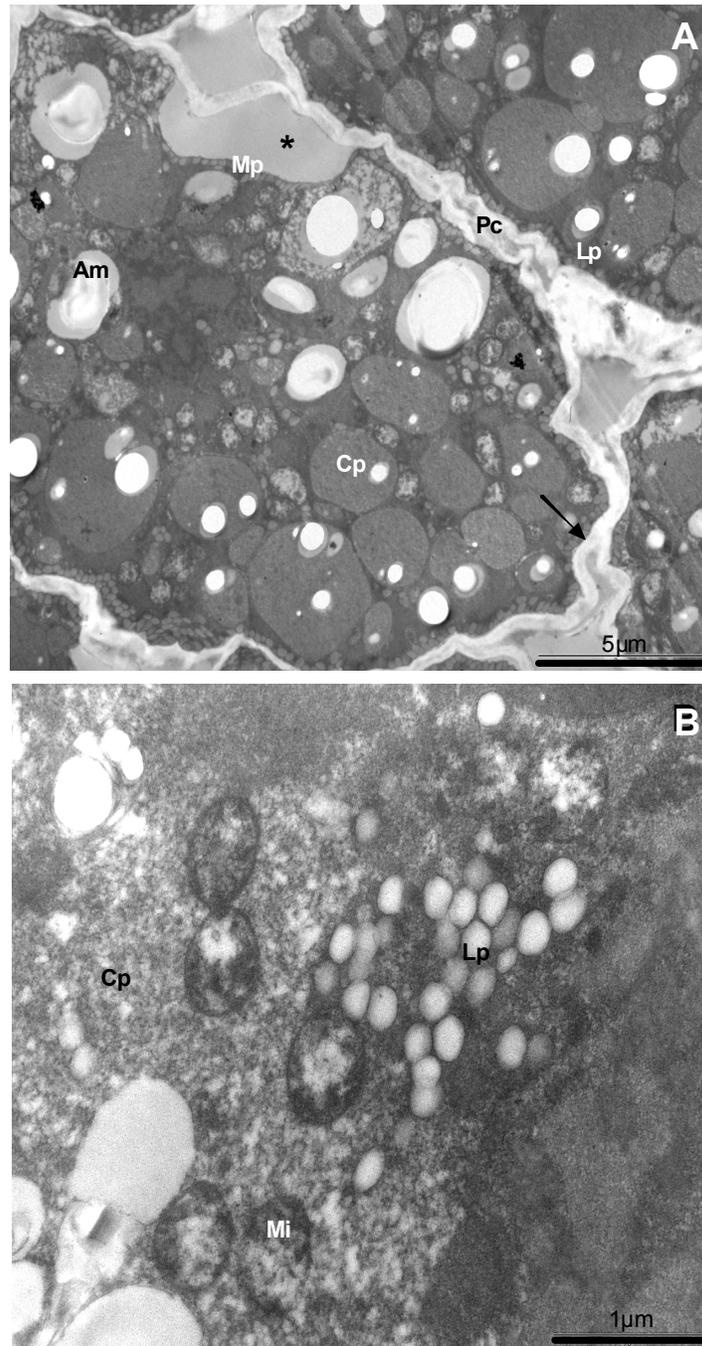


Figura 20. Eletromicrografias de cortes transversais do eixo embrionário de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) aos 65 DAA secas. A – Célula com paredes celulares (Pc) levemente onduladas (seta), com retração do protoplasto (*). B – Detalhe da célula com vesículas de lipídeos (Lp) e mitocôndrias (Mi). Am:Grão de amido; Cp: Corpo proteico; Mp: plasmalema.

Temperatura baixa (7 °C) – Em secções transversais do eixo embrionário foi observado um grande afastamento do protoplasto em relação à parede celular, que se apresenta bastante ondulada (figura 22 A). Os amiloplastos, em pequeno número, encontram-se em geral dissociados e os grãos de amido ocorrem dispersos, o mesmo ocorrendo com os corpos protéicos. Os corpos protéicos de conteúdo eletrondenso e granuloso ocupam grande porção do citoplasma. Nota-se pouca quantidade de vesículas lipídicas associadas à membrana plasmática e uma grande quantidade dispersa no citoplasma, sem organização aparente (Figura 22 A, B).

Congelamento (-18 °C) – Em secções transversais do eixo embrionário, as células parenquimáticas apresentam paredes com dobras (Figura 23A), pouco espessas, sendo maiores na região de interseção de duas ou mais células (figura 23 B), com organização celular semelhante à das sementes secas não armazenadas (T0 seca). É visível grande número de grãos de amido dispersos no citoplasma, com grandes dimensões, numerosos corpos protéicos, de conteúdo granular (figura 23 B). Numerosas vesículas de lipídeos aparecem ao longo da membrana plasmática (figura 23 A) e distribuídas no citoplasma, sem organização aparente (figura 23 B).

Cotilédones

Temperatura ambiente (25 °C) – Cortes transversais na região das células parenquimáticas evidenciaram que a parede celular apresenta-se levemente ondulada, sendo mais espessa que nos eixos embrionários (figura 24 A). Grande quantidade de grãos de amido de tamanhos variados é visualizada. Nota-se desorganização dos corpos protéicos, que preenchem grande parte do citoplasma. Muitas vesículas de lipídio aparecem dispostas aleatoriamente no citoplasma, sugerindo coalescência em alguns pontos, junto à membrana plasmática. (figura 24 A, B).

Temperatura baixa (7 °C) – Em secções transversais de células cotiledonares nota-se a presença de grande quantidade de amiloplastos de grandes dimensões, com um ou mais grãos de amidos dissociados (figura 25 A, C). A parede celular apresenta-se espessada, pouco ondulada, com campos primários de pontoação e plasmodesmatas visíveis (figura 25 B). Numerosos corpos protéicos de grande tamanho com conteúdo granuloso são visualizados. Observa-se grande quantidade de vesículas de lipídios dispersas no citoplasma, desorganizadas e com aparente coalescência (figura 25 A, C).

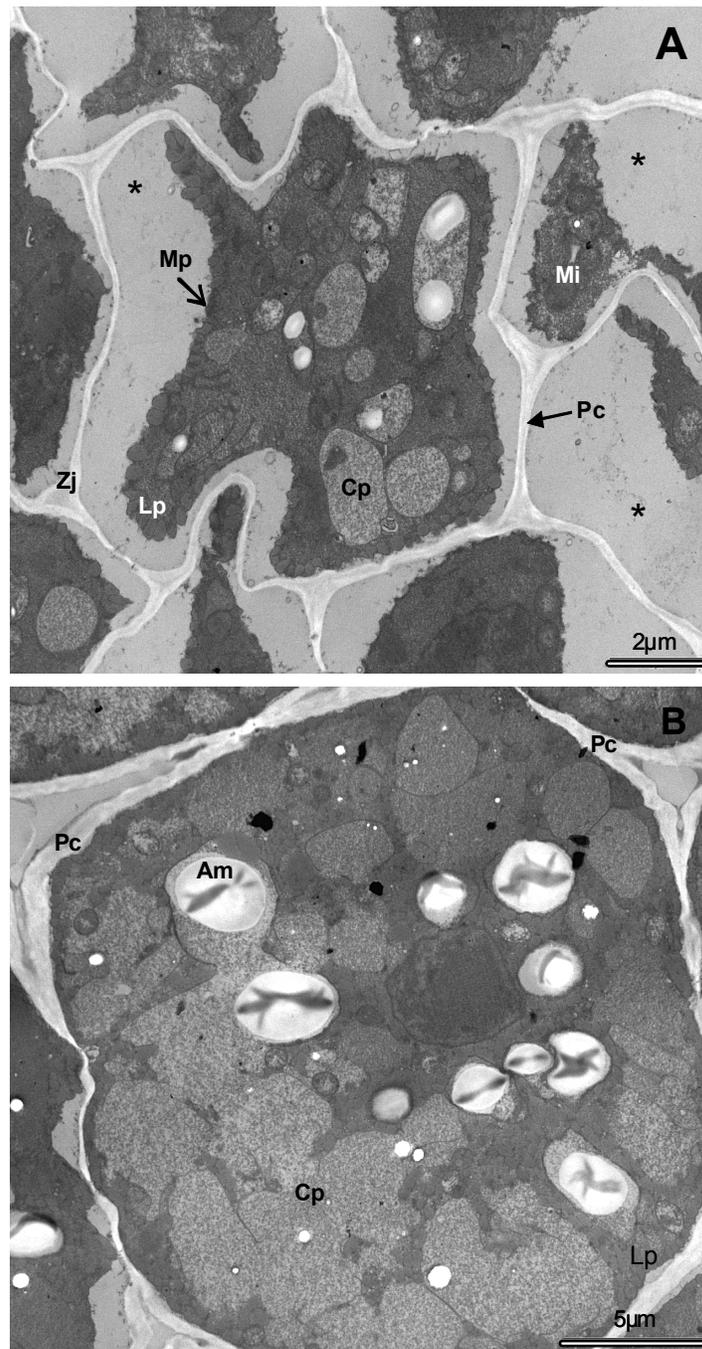


Figura 21. Eletromicrografias de cortes transversais do eixo embrionário de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) armazenadas por 338 dias em temperatura ambiente (25 °C). A – Células com retração do protoplasto (*) em relação à parede celular (Pc, seta). B – Detalhe da distribuição e características dos corpos proteicos e dos grãos de amido. Am: Grão de amido; Cp: Corpo proteico; Lp: Vesícula de lipídeo; Mi: Mitocôndria; Mp: Plasmalema; Zj: Zona de junção das células.

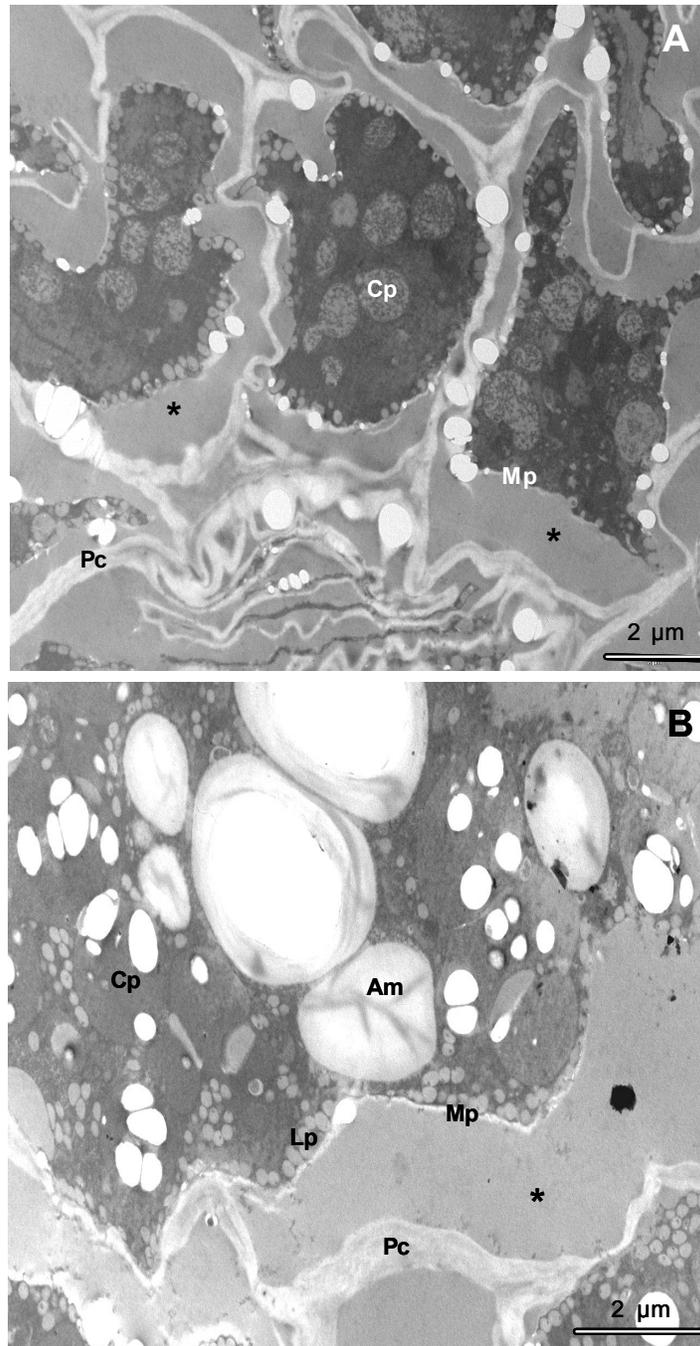


Figura 22. Eletromicrografias de cortes transversais da região do parênquima de eixo embrionário de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) armazenadas por 338 dias em temperatura baixa (7 °C). A – Células com retração do protoplasto (*) em relação à parede celular (Pc). B – Detalhe da distribuição e características dos corpos proteicos (Cp) e dos grãos de amido (Am). Lp: Vesícula de lipídeo; Mp: Plasmalema..

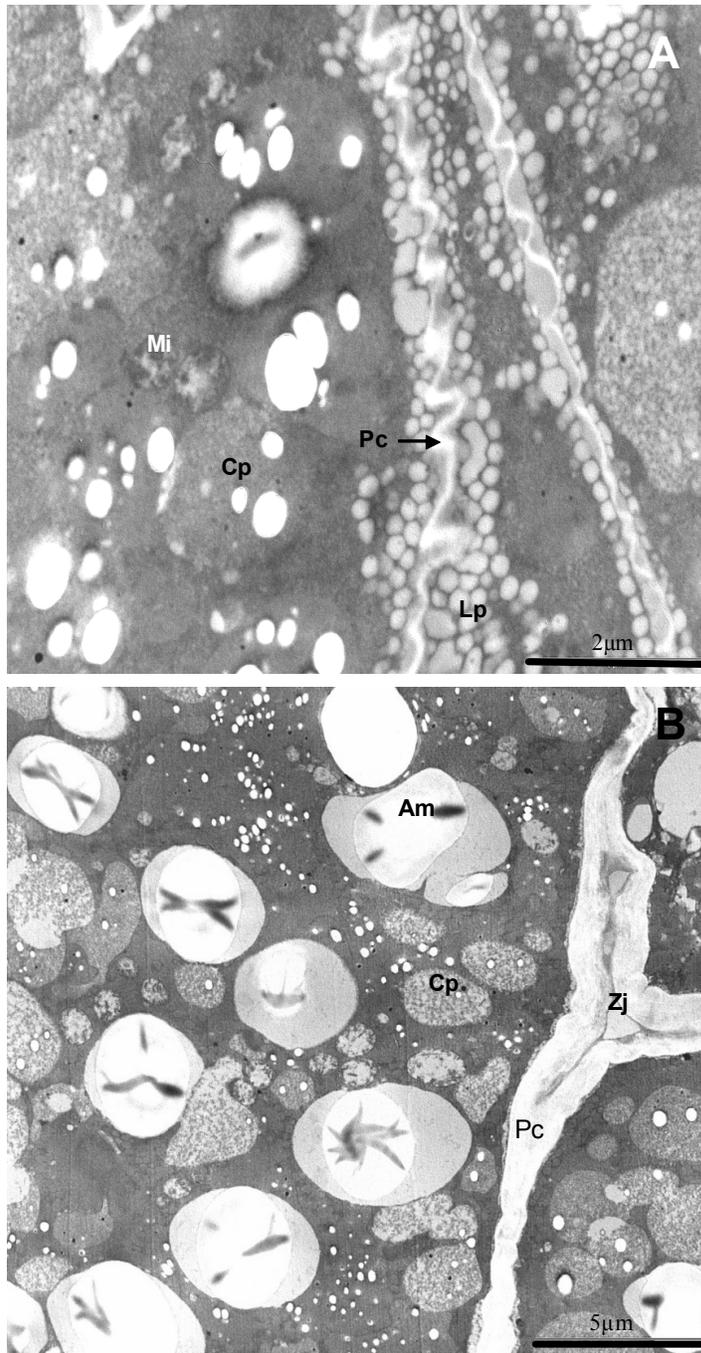


Figura 23. Eletromicrografias de cortes transversais da região do parênquima de eixo embrionário de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) armazenadas por 338 dias em temperatura de congelamento (-18 °C). A – Células com parede celular (Pc) com ondulações (seta). B – Detalhe da zona de junção das células (Zj). Am: Grão de amido; Cp: Corpo proteico; Lp: Vesícula de lipídeo; Mi: mitocôndria.

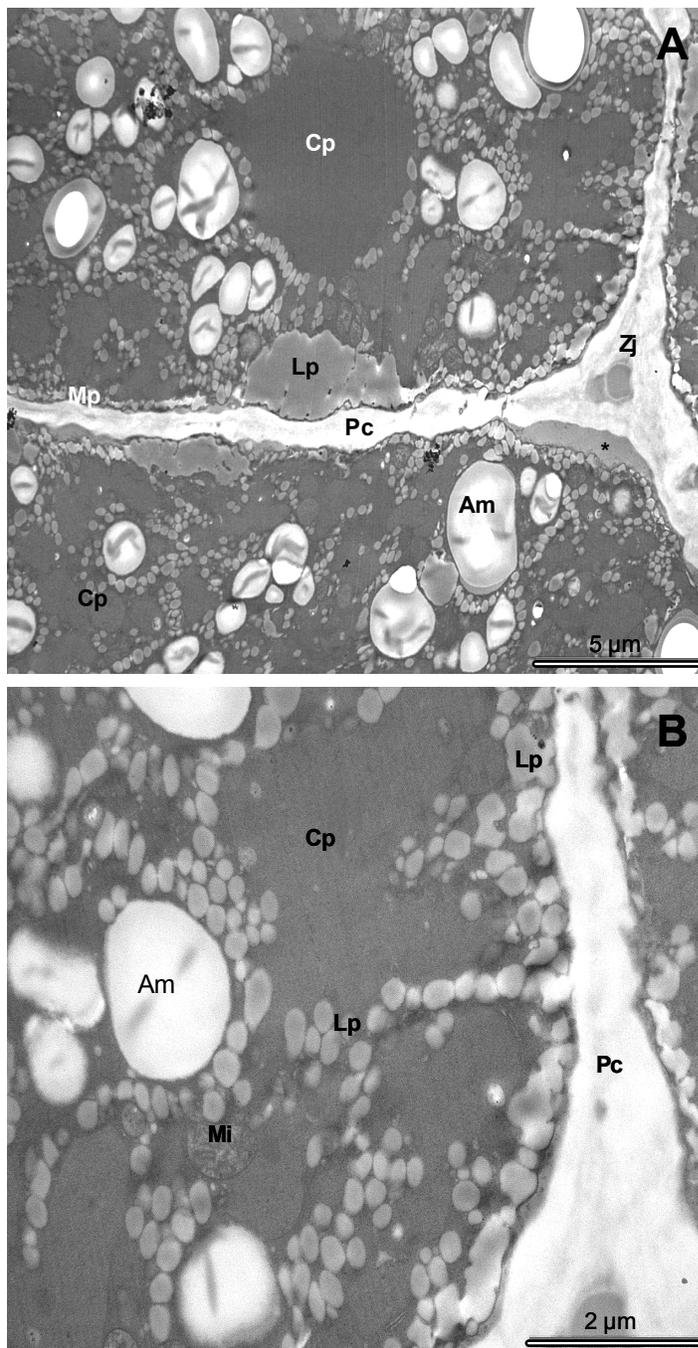


Figura 24. Eletromicrografias de cortes transversais de células dos cotilédones de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) armazenadas por 338 dias em temperatura ambiente (25 °C). A – Células com parede celular (Pc) com pequena ondulação e coslescência de vesículas de lipídio (Lp) junto à plasmalema (Mp). Nota-se pequena retração do protoplasto (*) junto à zona de junção (Zj) das células. B – Detalhe da parede celular (Pc). Am: Grão de amido; Cp: Corpo proteico; Lp: Vesícula de lipídeo.

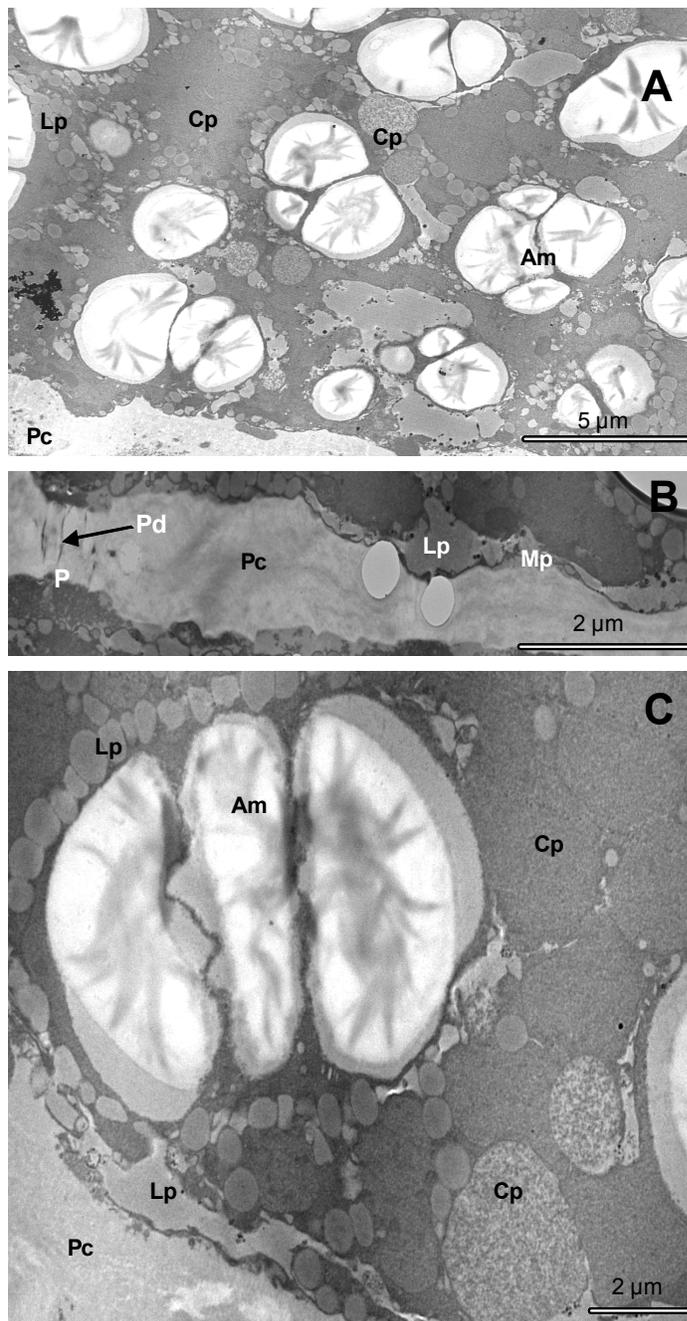


Figura 25. Eletromicrografias de cortes transversais de células dos cotilédones de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) armazenadas por 338 dias em temperatura baixa (7 °C). A – Aspecto geral da célula evidenciando a dissociação dos grãos de amido (Am). B – Detalhe da parede celular espessada (Pc) com coalescência de vesículas de lipídio. C – Detalhe da dissociação dos grãos de amido. Am: Grão de amido; Cp: Corpo proteico; Lp: Vesícula de lipídeo; Mp: Plasmalema; P: Campo primário de pontuação; Pd: Plasmodesmata.

Congelamento (18° C) – Em cortes transversais de células cotiledonares observa-se parede celular intacta, sem dobramentos (figura 26 A). Os amiloplastos são numerosos, de grandes dimensões e com um ou mais grãos de amidos associados. Nota-se pequena quantidade de grãos de amido isolados e numerosos corpos protéicos de tamanhos variados no citoplasma. Há grande quantidade de vesículas lipídicas, algumas coalescidas e outras associadas principalmente aos amiloplastos e grãos de amido (figura 26 A, B).

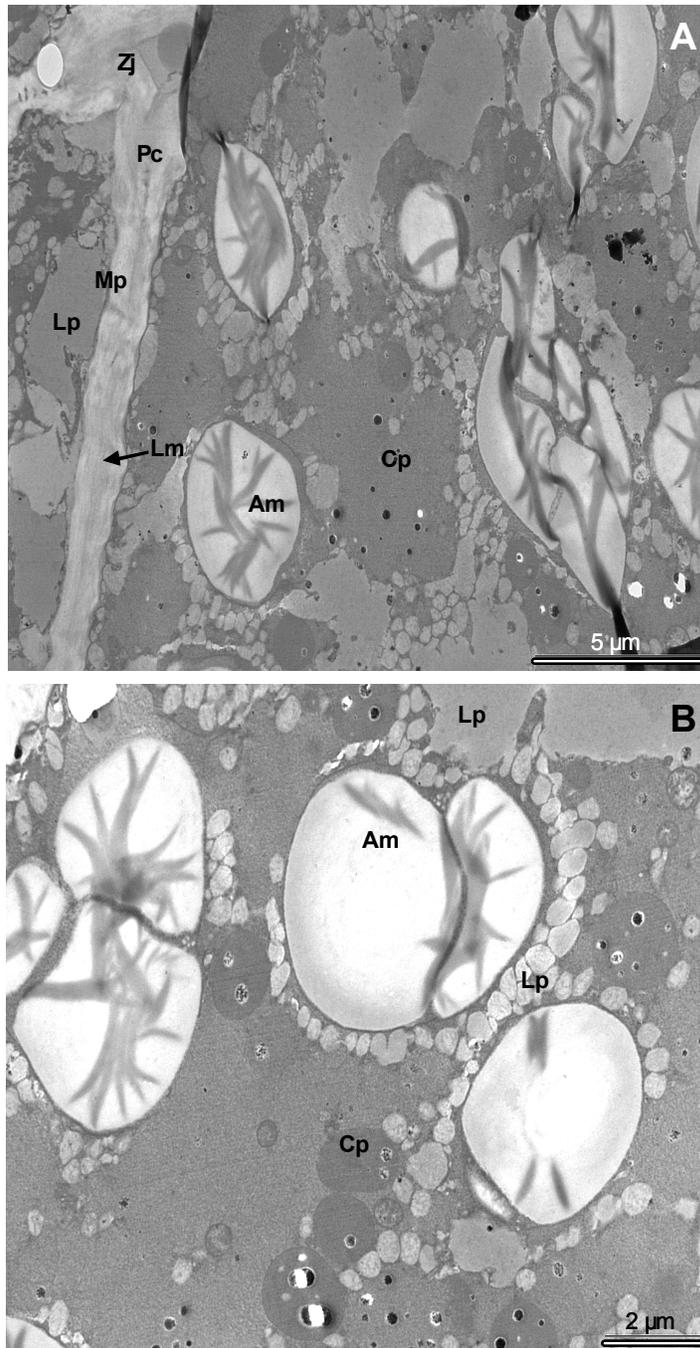


Figura 26. Eletromicrografias de cortes transversais de células dos cotilédones de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) armazenadas por 338 dias em temperatura de congelamento (-18 °C). A – Aspecto geral da célula evidenciado a parede celular (Pc), plasmalema (Mp) e lamela média (Lm). B – Detalhe dos amiloplastos. Am: Grão de amido; Cp: Corpo proteico; Lp: Vesícula de lipídeo.

4. Discussão

4.1 Variações fisiológicas, bioquímicas e estruturais das sementes durante a maturação

Sementes de pau-brasil, a partir de 45 DAA, mostraram aumento do conteúdo de matéria seca e, apesar do maior valor ter sido encontrado aos 65 DAA, o maior incremento ocorreu entre 45-55 DAA. O aumento de peso fresco observado nesse período deve-se ao acúmulo de matéria seca, uma vez que houve redução do teor de água das sementes durante esse intervalo, de 77% para 69%. Para as sementes de pau-brasil, a fase denominada de maturação, na qual ocorre a deposição de reservas, tem início por volta do 32º dia após a antese (DAA) (Borges *et al.* 2005), entretanto, neste trabalho, foi observado que a fase de maior acúmulo de matéria seca ocorreu entre 45-55 DAA. Segundo alguns autores, o maior valor de massa seca das sementes de várias espécies corresponde ao ponto máximo de maturidade fisiológica das mesmas (Carvalho & Nakagawa 1983, Koch *et al.* 1999). Isso também foi sugerido por Borges *et al.* (2005) para sementes de pau-brasil, motivo pelo qual o ponto de 65 DAA foi escolhido para as análises realizadas no presente trabalho.

As sementes de pau-brasil, desde o início da maturação, já apresentavam alta porcentagem de germinação (tabela 1), o que só aumentou à medida que estas adquiriam a maturidade fisiológica. Contudo, Borges *et al.* (2006) e Leduc (2007) observaram que as sementes de pau-brasil somente obtiveram a máxima capacidade de produzir plântulas normais ao final da maturação. Segundo Marcos-Filho (2005), a capacidade germinativa é adquirida, em muitas espécies, precocemente durante o processo de maturação. Entretanto, como essas sementes não completaram o processo de maturação não há a formação de plântulas normais. Para as sementes utilizadas nesse estudo foi observado aumento da capacidade de produção de plântulas normais, à medida que essas sementes amadureciam, sendo que o aumento mais significativo foi observado entre os períodos de 45 para 55 DAA com aumento de cerca de 70%, nessa capacidade, alcançado os maiores valores somente ao final da maturação (65 DAA) (dados não mostrados).

Foram observados diminuição nos teores de açúcares totais e redutores e aumento no teor de amido com a maturação das sementes de pau-brasil (figura 3), sugerindo que parte dos açúcares está sendo direcionada para a síntese desse polissacarídeo de reserva (amido), que corresponde a cerca de 30-40% do peso seco dessas sementes (Garcia *et al.* 2006). A diferença entre açúcares totais e redutores deve-se supostamente à presença de sacarose que, conforme reportado anteriormente, se mantém em níveis altos e estáveis durante a maturação das sementes dessa espécie (Borges *et al.* 2006, Leduc 2007). A presença da sacarose, assim

como a de oligossacarídeos da série da rafinose, seria fundamental para a aquisição da tolerância à dessecação uma vez que auxiliaria na formação do estado vítreo na célula, preservando a estrutura dos fosfolipídios de membrana, mantendo sua estrutura e integridade durante a secagem. (Obendorf 1997, Hoekstra *et al.* 2001, Nkang 2002).

As sementes de várias espécies de Leguminosae acumulam amido, proteínas e lipídios em diferentes proporções, e em maior quantidade nos cotilédones, através do importe de sacarose, nos estádios tardios da maturação (Weber *et al.* 1996, Weber *et al.* 1997). O amido é um dos compostos de reserva mais importantes e de mais ampla ocorrência nas plantas (Buckeridge *et al.* 2004). Em *Lupinus* sp. o maior acúmulo de amido coincidiu com o maior acúmulo de água, declinando nos estádios finais da maturação (Górecki *et al.* 1997). Para as sementes de pau-brasil, a quantificação inespecífica do teor de amido, revelou uma tendência ao acúmulo ao longo da fase de maturação, sendo que o maior valor coincidiu com o período de maior acúmulo de massa fresca das sementes (55 DAA) (figura 3).

Nas sementes, os lipídios assim como os carboidratos, são acumulados na fase de maturação, apresentando variações na composição e no teor e constituindo importante fonte de energia e carbono, que será utilizada para o processo de germinação e estabelecimento da plântula (Voelker & Kinney 2001, Buckeridge *et al.* 2004, Marcos Filhos 2005). Para as sementes de pau-brasil analisadas nesse trabalho, em diferentes estádios de desenvolvimento, foi observado um aumento no teor de lipídios ao longo da maturação, correspondendo a cerca de 3% do peso seco da semente. Mello (2008), utilizando metodologia específica para a quantificação de lipídios, verificou que sementes maduras e recém dispersas de pau-brasil apresentavam ao redor de 17% de lipídios na sua composição. A grande diferença encontrada nesses valores deve-se principalmente à metodologia de extração dos lipídios utilizada no nosso trabalho que visava apenas a remoção e não a quantificação do lipídio.

O fato da diminuição nos teores de açúcares solúveis (figura 3) e o aumento no rendimento em parede celular (figura 4) terem ocorrido no mesmo período, 55 DAA, pode indicar que parte desses açúcares pode ter sido direcionada, além do amido, para a síntese dos polissacarídeos que compõem a parede celular. Para as sementes de soja, o máximo peso fresco correspondeu com a parada na deposição de parede celular (Koch *et al.* 1999). O maior acúmulo em massa fresca, para as sementes de pau-brasil, ocorreu aos 55 DAA, coincidindo com o período de maior acúmulo em parede celular. A redução na proporção da parede celular, em relação à massa seca total da semente, após os 55 DAA, deve-se provavelmente pelo acúmulo de outras reservas, como proteínas. Segundo Marcos-Filho (2005), as leguminosas exibem variações nos teores de lipídios e de carboidratos, mas, geralmente, apresentam altos teores de proteínas.

Analisando-se o rendimento de cada fração da parede celular, ao longo do desenvolvimento da semente, nota-se que o incremento em parede celular ocorrido após os 45 DAA (figura 4) parece ser devido, principalmente, a um aumento na fração de hemiceluloses fracamente ligadas à celulose, ou seja, aquelas extraídas com NaOH 1N (figura 5). Nota-se, ainda, que houve decréscimo na proporção de pectinas com a maturação (figura 5). O fato de ramnose ter sido detectada apenas na fração NaOH 1N em sementes com 45 DAA (figura 6), em conjunto com a grande quantidade de ácidos urônicos presente na fração extraída com oxalato de amônio (figura 7) sugere que os açúcares ácidos encontram-se, predominantemente, na forma de homogalacturonanos nas paredes celulares de sementes de pau-brasil. A drástica redução observada nos teores de ácidos urônicos com a maturação (figura 7) indica fortemente que a redução na proporção relativa de pectinas a partir de 45 DAA deve-se à redução no teor de homogalacturonanos, seu polissacarídeo ácido majoritário.

O aumento na proporção relativa de arabinose, observado principalmente nas frações extraídas com oxalato de amônio e álcali fraco durante a maturação (figura 6), sugere maior deposição de arabinanos, polissacarídeos usualmente presentes como ramificações de polissacarídeos ácidos como os ramnogalacturonano I (Carpita & McCann 2000). Diversos trabalhos relatam a ocorrência de arabinanos como polissacarídeos predominantes em sementes de leguminosas tais como soja, feijão, ervilha e *Vicia faba*, e de não leguminosas como espécies pertencentes ao gênero *Brassica* (Brillouet & Carré 1983, Huisman *et al.* 1998, Koch *et al.* 1999, Ghosh *et al.* 2004, Shiga & Lajolo 2005).

Estudos com as chamadas “plantas que ressuscitam” mostraram que as folhas ao serem desidratadas, apresentavam um dobramento de suas paredes celulares resultando em uma compactação da célula. Esse dobramento da parede celular acompanhava a desidratação do protoplasto, evitando o deslocamento da membrana plasmática e mantendo a organização celular (Farrant 2000, Moore *et al.* 2006). Análises da composição da parede celular dessas plantas revelaram alto teor de arabinanos, sugerindo que a presença desses polímeros, conhecidos por conferirem maior flexibilidade à parede celular (Jones *et al.* 2003, McCartney *et al.* 2000), poderiam contribuir para a manutenção da viabilidade celular durante a re-hidratação (Moore *et al.* 2006). Desse modo, o aumento na deposição de polímeros ricos em arabinose em sementes de pau-brasil poderia de algum modo contribuir para sua tolerância à dessecação, adquirida durante a maturação.

Galactose e glucose, por sua vez, são monossacarídeos componentes da parede que foram encontrados em proporções menores em sementes de pau-brasil com 65 DAA. Alterações nas proporções de arabinose e galactose foram relatadas durante o desenvolvimento de sementes de soja (Sasaki 1983, Koch *et al.* 1999). Entretanto, nesses dois

estudos as variações desses dois monossacarídeos, arabinose e galactose, foram distintas das observadas para sementes de pau-brasil (figura 6). Sasaki (1983) observou um aumento na proporção de galactose e diminuição da proporção de arabinose. Koch *et al.* (1999), por sua vez, verificaram manutenção da proporção de galactose e aumento da proporção de arabinose. Essa proporção, segundo Stombaugh *et al.* (2000), poderia ser um parâmetro melhor de avaliação da condição de maturidade de sementes do que a quantidade individual desses açúcares. McCartney *et al.* (2000) observaram que a deposição de galactanos ocorreu na fase mais tardia do desenvolvimento, em regiões específicas do cotilédone, em sementes de ervilha, coincidindo com o período de secagem. Esses autores relacionaram esses fatos com as propriedades mecânicas da parede celular, o que seria uma preparação para a dessecação. O aumento de galactose na fase final do desenvolvimento, das sementes de soja, também foi correlacionado como sendo um possível fator na preparação para a secagem ocorrida no final da maturação (Koch *et al.* 1999).

A grande proporção de glucose, galactose e xilose presente na fração de NaOH 6 N indica a presença de um xiloglucano. O xiloglucano foi relatado como sendo a principal hemicelulose em sementes de leguminosas, como soja (Huisman *et al.* 1998), trigo (Obel *et al.* 2002) e feijão (Shiga & Lajolo 2006) e não leguminosas como as sementes de *Brassica* sp. (Ghosh *et al.* 2004). Pelo fato da molécula de xiloglucano ser hidrofílica esse polissacarídeo teria um papel importante nas relações hídricas das sementes, além de sua função estrutural (Brett & Waldron 1990).

As análises ultra-estruturais das sementes de pau-brasil reforçam os dados bioquímicos em relação à presença e tipo de compostos de reserva e à parede celular. Ao longo do desenvolvimento foi possível observar aumento nos compostos de reserva, como o amido e lipídios (figuras 3, 8-13). Houve nítido aumento na quantidade de amiloplastos ou grãos de amido isolados com a maturação, mas a quantidade sempre foi superior nos cotilédones. Esses resultados estão de acordo com relatos prévios de que as sementes de pau-brasil apresentam cerca de 30% de amido na sua constituição, entretanto, o teor no eixo embrionário é cerca de 60% menor do que nos cotilédones (Hellmann 2006, Leduc 2007).

Em sementes de soja, o teor de lipídios aumenta com a maturidade das sementes (Marcos Filho 2005). Mesmo não tendo sido utilizada a metodologia adequada para a extração de lipídios em sementes de pau-brasil foi possível observar que o teor tendeu a aumentar com a maturação das sementes. Essa observação foi confirmada pelas análises ultra-estruturais, sendo observado maior número de vesículas lipídicas aos 65 DAA e maior quantidade nos cotilédones (figuras 10-13), o que corrobora outros trabalhos nos quais foi mostrado que o teor de lipídios nos cotilédones era cerca de 20 vezes maior do que nos eixos

embrionários (Mello 2008). Aos 65 DAA, as vesículas lipídicas estavam distribuídas principalmente ao longo da membrana plasmática nos eixos embrionários e por todo o citoplasma e ao redor dos amiloplastos e da plasmalema nos cotilédones.

Diferentemente dos outros compostos de reserva, os corpos protéicos foram abundantes desde o início da maturação, tanto no eixo quanto nos cotilédones das sementes de pau-brasil, indicando que estas teriam importante papel no processo de maturação, conforme relatado para sementes de outras espécies, como em *Prunus dulcis* (Smith *et al.* 1995).

O espessamento da parede celular observado tanto nos cotilédones quanto nos eixos embrionários, durante o desenvolvimento das sementes, deve-se principalmente ao acúmulo de polissacarídeos. O aumento na espessura da parede celular foi notado de 45 para 55 DAA (figuras 8 e 9), o que está de acordo com os resultados apresentados na figura 4. Os polissacarídeos de parede celular são acumulados durante a fase de maturação das sementes e, além de sua função estrutural, podem servir como material de reserva durante o estabelecimento inicial da plântula (Buckeridge *et al.* 2004).

A capacidade de dobramento da parede celular durante a desidratação pode ser uma característica importante para a manutenção da viabilidade celular, evitando a ruptura do contínuo parede-protoplasto. Conforme já mencionado, em plantas “que ressuscitam” foi observado grande teor de arabinose nas folhas, possivelmente na forma de arabinanos, aumentando a flexibilidade das paredes, fazendo com que estas se dobrassem durante a secagem sem que houvesse rupturas (Vicré *et al.* 2004, Moore *et al.* 2006). O aumento no teor de arabinose durante a maturação das sementes de pau-brasil coincidiu com o período no qual se inicia o processo de perda de água (a partir de 55 DAA) (tabela 1, figura 6). Desse modo, talvez a grande flexibilidade da parede celular dessas sementes, evidenciada pela presença de dobras, possa estar relacionada à presença arabinanos, os quais parecem aumentar durante a maturação (figura 6).

Desde o início da maturação (45 DAA) foi evidenciado grande número de dobras nas paredes celulares das sementes de pau-brasil (figura 8), indicando grande flexibilidade das mesmas, o que pode ser uma característica conferida pela grande quantidade de arabinose encontrada em sua composição (figura 6). Considerando-se que nessa fase as células encontravam-se extremamente hidratadas, com 77% de água, não se pode atribuir esse dobramento à perda de água. A partir dessa fase ocorre o acúmulo das reservas, com aumento de massa seca e expansão celular (tabela 1), o que faz com que essas paredes tenham menos dobras nas fases posteriores de maturação das sementes (figuras 9 e 10).

4.2 Variações fisiológicas, bioquímicas e estruturais das sementes durante o armazenamento

A capacidade germinativa e de produção de plântulas das sementes frescas recém colhidas era elevada, 89% e 75% respectivamente, já as sementes secas apresentaram a porcentagem de produção de plântulas cerca de 42 % menor. Apesar do armazenamento em baixa temperatura ter apresentado melhores resultados quando comparado à temperatura ambiente, este foi bem inferior ao que foi previamente encontrado para a espécie (Barbedo *et al.* 2002, Hellmann 2006). Embora o processo de deterioração seja inevitável e irreversível (Delouche 2002), o armazenamento a 7 °C parece ter favorecido a manutenção da germinabilidade dessas sementes, porém isso não foi mantido ao longo do armazenamento nessas condições, chegando a ser 32% menor aos 180 dias. Além disso, essa condição de armazenamento não foi suficiente para manter a capacidade de produção de plântulas normais, que diminuiu em 53% e continuou em declínio ao longo do armazenamento (tabela 2). Provavelmente, isso se deve ao fato de que a perda do potencial germinativo é a última manifestação fisiológica dentre os processos que levam à deterioração das sementes, sendo o desenvolvimento de plântulas mais sensível e, por conseqüência, antecipadamente afetado (Marcos Filho 2005).

A deterioração das sementes é caracterizada por um conjunto de fatores físicos, fisiológicos, bioquímicos e citológicos e, apesar de ser melhor visualizada e detectada durante o armazenamento, pode ter início durante o processo de maturação da semente. Independentemente do potencial fisiológico das sementes, as condições de manejo e do ambiente no qual elas são expostas são fundamentais para preservar a qualidade fisiológica ou decrescê-la rapidamente (Marcos Filho 2005). Para as sementes utilizadas neste trabalho nem as condições favoráveis de baixa temperatura e o reduzido teor de água foram suficientes para manter a viabilidade, que pode ter sido perdida devido à má qualidade inicial do lote, o que só ficou evidenciado após o armazenamento. Segundo Barbedo *et al.* (2002), a qualidade inicial do lote é fundamental para a conservação dessa espécie durante o armazenamento. Por outro lado, foi observado alto coeficiente de variação (tabela 2) para os dados de germinação (17,63) e, principalmente, de produção de plântulas normais (46,76), o que poderia ser explicado pela falta de homogeneidade entre as repetições.

Por outro lado, as sementes congeladas (-18 °C) por 180 dias apresentaram cerca de 50% mais germinação do que as não armazenadas e o dobro do valor inicial para a produção de plântulas normais. Embora Santos *et al.* (2002) comentem que durante o armazenamento a qualidade das sementes não pode ser melhorada, apenas mantida se as condições forem favoráveis, os resultados da tabela 2 sugerem que alguma alteração fisiológica ocorrida

durante o processo de congelamento pode ter contribuído para que as sementes de pau-brasil apresentassem qualidade fisiológica melhor após 180 dias. O efeito do congelamento sobre possíveis microrganismos presentes nessas sementes também não pode ser descartado. Hellmann (2006) observou manutenção da capacidade germinativa e de produção de plântulas normais após 90 dias de congelamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ de sementes de pau-brasil com 12% de água. Portanto, a manutenção da condição fisiológica inicial era esperada no presente estudo. Pela tabela 2, nota-se que o congelamento por 180 dias levou a um pequeno aumento no teor de água das sementes, devido a uma tendência de equilíbrio higroscópico, contudo essa elevação parece não ter modificado a capacidade germinativa dessas sementes. Entretanto, hidratação semelhante foi observada para sementes mantidas à temperatura ambiente por 60 dias e, nesse caso, houve drástica redução na qualidade fisiológica das sementes. Isso sugere que outros fatores e não as diferenças entre os teores de água entre sementes secas e congeladas devem ter sido determinantes para incremento da germinabilidade observada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Soma-se a isso, o fato de que os teores de água encontrados nas sementes antes e após o armazenamento encontravam-se dentro da faixa limite de tolerância à dessecação para essa espécie (Barbedo *et al.* 2002).

Ao longo do armazenamento não foram observadas diferenças entre os teores de açúcares totais e redutores em relação à temperatura de armazenamento (figura 14A). Entretanto, houve aumento no teor de açúcar total durante o armazenamento em relação ao conteúdo inicial, o que pode ter relação com a solubilização de reservas (Nkang 2002). Essa sugestão encontra respaldo no fato de que durante o mesmo período houve redução de até 68% no teor de amido (figura 14C). Segundo Krause *et al.* (1998), uma das explicações para a redução do teor de amido sob baixa temperatura seria que esta aumentaria a atividade de uma ou mais enzimas hidrolíticas desse polissacarídeo, o que é coerente com o aumento substancial nos conteúdos de açúcares redutores aos 180 dias (figura 14 B), em todas as temperaturas de armazenamento. Hellmann *et al.* (2006) observaram que, após 90 dias de armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, as sementes de pau-brasil não dispersas e secas tiveram o teor de amido diminuído.

Por outro lado, resultados divergentes desses foram relatados por Garcia *et al.* (2006). Esses autores observaram que as sementes de pau-brasil armazenadas por 12 meses em temperatura ambiente e em câmara fria apresentavam os teores de açúcares solúveis estáveis, independentemente da temperatura. Mello (2008) trabalhando com sementes frescas dessa mesma espécie e secas a cerca de 10% de água observou que após 30 dias de armazenamento em temperatura de congelamento, o teor de amido aumentava, tanto nos eixos quanto nos cotilédones. É possível que tais discrepâncias estejam relacionadas à variabilidade natural

e/ou à condição inicial das reservas de carboidratos das sementes nos diferentes lotes utilizados nesses estudos.

Os teores de lipídios mantiveram-se estáveis ao longo do armazenamento, indiferentemente da temperatura (resultados não mostrados). Dados semelhantes foram obtidos para a mesma espécie durante o armazenamento por 30 dias em temperatura ambiente, entretanto, a porcentagem correspondente à massa seca encontrada foi bastante superior, 70% maior (Mello 2008), fato explicado pelas diferenças na metodologia de extração utilizada, conforme já discutido acima.

Exceto para sementes armazenadas em congelador por 180 dias, os diferentes tempos e condições de armazenamento não alteraram o rendimento em parede celular (figura 5). A degradação de parede celular na condição de congelamento, gerando principalmente monossacarídeos, poderia ser um dos fatores que levou ao maior aumento no teor de açúcares solúveis observado na figura 14 C. Somente a análise da composição em monossacarídeos dos extratos de carboidratos solúveis, realizada por cromatografia líquida de alto desempenho, poderia confirmar essa sugestão.

De acordo com os dados mostrados na figura 16, a fração predominante nas sementes de pau-brasil, que corresponde às hemiceluloses fracamente ligadas à parede celular (extraídas em NaOH 1N), e a fração de pectinas foram alteradas pelas condições e tempos de armazenamento. Comportamento inverso foi observado para as diferentes temperaturas de armazenamento em relação à solubilização da fração extraída em NaOH 1N. O armazenamento a 7 °C manteve as proporções iniciais até os 30 dias, com diminuição na solubilização da fração de NaOH 1N e, conseqüentemente, aumento na proporção das demais frações, aos 60 dias. O armazenamento a 25 °C, por sua vez, levou a um aumento gradativo nessa fração com o tempo de armazenamento. Nota-se que aos 180 dias, embora a condição fisiológica das sementes mantidas a 7 °C e a temperatura ambiente fosse bastante diversa daquela das sementes secas antes do armazenamento (tabela 2), as frações que compõem a parede celular mostraram perfil bastante similar. Assim, aparentemente as proporções de componentes pécticos, hemicelulósicos e celulósicos da parede celular não estão relacionadas com a perda ou manutenção da capacidade germinativa das sementes de pau-brasil. Por outro lado, o aumento na capacidade germinativa das sementes congeladas por 180 dias foi acompanhado por alterações substanciais na proporção de pectinas da parede celular (figura 16 D), que aumentaram em detrimento das hemiceluloses fracamente ligadas à celulose. Assim, pelos resultados mostrados nas figuras 15 e 16 não há dúvidas que a condição de congelamento promoveu grandes alterações na parede celular e na qualidade fisiológica das sementes em relação à germinação.

A análise da composição em monossacarídeos da fração pécica da parede celular indicou alteração na proporção de alguns de seus açúcares, porém perfis similares foram encontrados tanto em sementes altamente viáveis como naquelas incapazes de germinar (figura 17, tabela 2). Assim como ocorreu durante a maturação, a principal alteração observada durante o armazenamento foi na proporção entre arabinose e galactose. A perda da capacidade germinativa parece estar associada à inversão na proporção entre a galactose e a arabinose, com redução deste último monossacarídeo nas sementes que perdem gradativamente a germinabilidade. Para sementes de feijão, o armazenamento em temperatura ambiente também ocasionou um decréscimo no conteúdo de arabinose, devido possivelmente a novas interações entre polissacarídeos ricos nesse açúcar, o que produziria moléculas de grande peso molecular e baixa solubilidade. Contudo, em feijão durante o armazenamento em baixa temperatura não foram observadas alterações nas proporções dos açúcares componentes da parede celular (Shiga *et al.* 2003). O aumento na proporção de galactose na fração pécica da parede celular de sementes de pau-brasil (figura 17) parece ser um evento comum a todas as condições de armazenamento utilizadas.

Ao final do armazenamento foi observado um expressivo decréscimo no conteúdo de ácidos urônicos nas sementes (figura 18). Para as sementes armazenadas a 7 °C, esse decréscimo foi de 85%, em relação às sementes não armazenadas. Na condição de congelamento, também houve decréscimo nos ácidos urônicos, o que indica que o aumento na proporção da fração pécica mostrado na figura 16 D deve-se possivelmente à redução nas outras frações da parede ou a um aumento na deposição de pectinas neutras, como galactanos e arabinanos. Como as proporções de arabinose e galactose não aumentaram (figura 17), a primeira sugestão parece ser a mais plausível.

A exemplo do que ocorreu com as pectinas, a análise da composição em monossacarídeos nas frações extraídas em NaOH 1 N e 6 N revelou perfis muito similares em sementes que mostraram qualidade fisiológica bastante distinta (figuras 18 e 19), o que sugere que outras variáveis, que não a composição dessas frações devem ser as responsáveis pela perda de germinabilidade das sementes de pau-brasil, em algumas condições de armazenamento. Em relação aos teores de açúcar total e ácido urônico (figura 20) o congelamento parece ter preservado melhor esses teores em relação às sementes armazenadas pelo mesmo período em temperaturas diferentes.

Mesmo apresentando diferenças nos níveis de deterioração, foi observada alteração na forma, quantidade e nas características das estruturas celulares, em todas as sementes, independente da temperatura de armazenamento. O grau de descolamento da parede celular

do protoplasto teve relação direta com a temperatura de armazenamento, quanto maior a temperatura maior foi o descolamento observado (figura 21). Com exceção das sementes armazenadas em temperatura ambiente (figura 21), nas quais o teor de água possivelmente era mais alto, as dobras nas paredes celulares, nos eixos, foram menos evidentes do que nas sementes armazenadas em baixas temperaturas (figura 22 e 23). Nas células cotiledonares foram evidenciadas apenas pequenas ondulações nas sementes armazenadas em temperatura ambiente e a 7 °C. O armazenamento não alterou o espessamento da parede celular, entretanto as células cotiledonares apresentavam, aparentemente, maior espessamento que as células dos eixos.

A temperatura de armazenamento também alterou as proporções e as características dos compostos de reserva. Uma diminuição das vesículas de lipídios foi observada nas sementes armazenadas a 7 e 25 °C (figura 21, 22, 24 e 25), quando comparadas às sementes armazenadas em congelador (figuras 23 e 26) e com aquelas não armazenadas (T0 seca) (figura 20). Essas alterações foram melhor visualizadas nos cotilédones, uma vez que o teor de lipídios nesses órgãos chega a ser 18 vezes maior do que nos eixos embrionários.

As maiores alterações nos grãos de amido foram observadas nos cotilédones, uma vez que a diferença numérica nesses grãos nos eixos se deve ao fato de que o teor de amido nos cotilédones pode variar de 10-20 vezes mais (Hellmann 2006). Nas células cotiledonares foi observada desestruturação dos amiloplastos e desagregação dos grãos de amido. Em sementes de *Phaseolus vulgaris* submetidas a envelhecimento acelerado foi observado aumento no número e decréscimo no tamanho dos grãos de amido (Cortelazzo *et al.* 2005). Para que o amido seja degradado é necessário que os grânulos sejam desmembrados em estruturas menores (Buckeridge *et al.* 2004). A forma esférica do grão de amido está associada ao elevado teor de amilose. A alteração do formato representa sintoma característico do processo de deterioração (Marcos Filho 2005). Essa desestruturação dos grãos de amido está de acordo com os dados bioquímicos, que indicaram redução nos teores de amido, principalmente nas sementes congeladas, que apresentaram cerca de 70% menos amido do que as sementes não armazenadas (figura 14 C).

Garcia *et al.* (2005) reportaram que as proteínas correspondem a cerca de 10% do peso seco das sementes de pau-brasil. As fotomicrografias das células de sementes dessa espécie evidenciaram que grande parte do citoplasma dessas células era preenchida por corpos protéicos (figura 20). Com o armazenamento, independente da temperatura, essa proporção não se alterou, entretanto, foi evidenciada modificação nas características desses corpos protéicos, com diminuição na eletrondensidade e aumento no aspecto granuloso. Com o

aumento da temperatura de armazenamento foi observada também uma coalescência dessas estruturas.

Com o envelhecimento acelerado de sementes de feijão foi evidenciada alteração na agregação e na distribuição de corpos protéicos no citoplasma. Além disso, análises bioquímicas constataram diminuição nos teores de proteína com o envelhecimento acelerado (Begnami & Cortelazzo 1996).

Segundo Yamada *et al.* (2002) a resistência de plantas tolerantes ao resfriamento estaria associada às propriedades da parede celular. Segundo esses autores, a parede celular serviria como uma barreira para a propagação de gelo extracelular. Esse fato, associado com a redução do metabolismo poderia explicar a manutenção na integridade das células após 338 dias de armazenamento em temperatura de congelamento.

5. Conclusão

Durante o desenvolvimento das sementes de pau-brasil ocorrem alterações na deposição e composição das paredes celulares, as quais antecedem a etapa final da maturação. O armazenamento das sementes em diferentes temperaturas e por diferentes períodos provoca algumas modificações na composição das paredes celulares, porém essas alterações não parecem estar diretamente relacionadas à manutenção ou perda da capacidade germinativa. Desse modo, conclui-se que as alterações que ocorrem na parede celular durante a maturação de sementes de pau-brasil parecem ser fundamentais para que estas tolerem a dessecação ao final da maturação, podendo contribuir para a manutenção de sua capacidade germinativa, desde que as sementes sejam armazenadas em temperaturas que preservem a integridade de outros componentes celulares.

6. Referências Bibliográficas

- Barbedo, C.J. & Marcos Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botânica Brasilica* 12: 145-164.
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata Lam.* (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Revista brasileira de Botânica* 25: 431-439.
- Begnami, C.N., Cortelazzo, A.L.** 1996. Cellular alterations during accelerated aging of funch bean seeds. *Seed Science Technology* 24: 295-303.
- Bernal-Lugol, I. & Leopold, A.C.** 1992. Changes in soluble during seed storage. *Plant Physiology* 98: 1207-1210.
- Bewley, J.D. & Black, M.** 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. Ed. Plenum Press, New York. 2^o ed. 445p.
- Bewley, J.D.** 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Black, M., Corbineau, F., Gee, H. & Côme, D.** 1999. Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology* 120: 463-471.
- Blackman, S.A., Obendorf, R.L. & Leopold, A.C.** 1995. Desiccation tolerance in development soybean seeds: The role of stress proteins. *Physiologia Plantarum* 93: 630-638.
- Blackman, S.A., Wettlaufer, S.H., Obendorf, R.L. & Leopold, A.C.** 1991. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiology* 96: 868-874.
- Borges, E.S.T.** 2005. Conservação *ex situ* de espécies endêmicas e ameaçadas de *Dyckia* e *Encholirium* (Bromeliaceae). Tese de Doutorado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 118 p.
- 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, J., 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.
- Brett, C. & Waldron, K.** 1990. *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. Unwin Hyman Ltd.

- Brillouet, J.-M. & Carré, B.** 1983. Composition of cell walls from cotyledons of *Pisum sativum*, *Vicia faba* and *Glycine max*. *Phytochemistry* 22: 841-847.
- Buckeridge, M.S., Aidar, M.P.M., Santos, F.P. & Tiné, M.A.S.** 2004. Acúmulo de reservas. *In* Germinação: do básico ao aplicado. Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (Orgs.). Artmed Editora S.A., Porto Alegre, p. 31-50.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P. & Tiné, M.A.S.** 2000b. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 141-156.
- Buckeridge, M.S., Tiné, M.A.S., Santos, H.P. & Lima, D.U.** 2000a. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 137-162.
- Buitink, J., Hemminga, M.A. & Hoekstra, F.A.** 2000. Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. *Plant Physiology* 122: 1217-1224.
- Cardoso, V.J.M.** 2004b. Germinação. *In* Fisiologia vegetal. Kerbauy, G.B. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 386-408.
- Cardoso, V.J.M.** 2004a. Dormência: Estabelecimento do processo. *In* Germinação: do básico ao aplicado. Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (Orgs.). Artmed Editora S.A., Porto Alegre, p. 95-108.
- Carpita, N. & McCann, M.** 2000. The Cell Wall. *In* Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Eds). Ed. American Society of Plant Physiologists, Rockville, p. 53-107.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 1983. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 2ª ed. rev., Fundação Cargill, Campinas.
- Carvalho, S.R.S., Provan, J., Lira, C.F., Pereira, L.O.R., Ferreira, P.C.G. & Cardoso L.A.** 2005. High levels of genetic structuring as a result of population fragmentation in the tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. *Biodiversity and Conservation* 14: 1047-1057.
- Conservation International.** 2007. Biodiversity HOTSPOTS. Disponível <<http://www.biodiversityhotspots.org>> Acesso em dezembro de 2007.
- Cortelazzo, A.L., Coutinho, J. & Granjeiro, P.A.** 2005. Storage and ageing of french beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Effect on seed viability and vigor. *Brazilian Journal Morphology of Science* 22: 121-128.
- Delouche, J.** 2002. Germinação, deterioração e vigor da semente. *Seed News* 6: 24-31.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Eichelberger, L., Maia, M.S., Peske, S.T. & Moraes, D.M.** 2002. Composição química de sementes de azevém em resposta ao retardamento da secagem e ao armazenamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 693-701.
- Farrant, J.M.** 2000. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology* 151: 29-39.
- Filisetti-Cozzi, T.M.CC & Carpita, N.C.** 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197: 157-162.
- Fundação SOS Mata Atlântica.** 2007. Disponível em <<http://www.sosma.org.br>> Acesso em Dezembro de 2007.
- Garcia, I.S., Souza, A., Barbedo, C. J., Dietrich, S.M.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic forest. *Brazilian Journal of Biology* 66: 29-41.
- Ghosh, P., Ghosal, P., Thakur, S., Lerouge, P., Loutelier-Bourhis, C., Driouich, A. & Ray, B.** 2004. Cell wall polysaccharides of *Brassica campestris* seed cake: isolation and structural features. *Carbohydrate Polymers* 57: 7-13.
- Górecki, R.J., Piotrowicz-Cieslak, A. & Obendorf, R.L.** 1997. Soluble sugars and flatulence-producing oligosaccharides in maturing yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. *Seed Science Research* 7: 185-193.
- Gorshkova, T.A., Wyatt, S.E., Salnikov, V.V., Gibeaut, D.M., Ibragimov, M.R., Lozovaya, V.V. & Carpita, N.C.** 1996. Cell-wall polysaccharides of development of flax plants. *Plant Physiology* 110: 721-729.
- Hellmann, M.E.** 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- 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: 21-31.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. & Buitink, J.** 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431-438.
- Hong, T.D. & Ellis, R.H.** 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. Rome: IRPGRI, 55p. (Technical Bulletin, 1).

- Horbowicz, M. & Obendorf, R.L.** 1994. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols – review and survey. *Seed Science Research* 4: 385-405.
- Huisman, M.M.H., Schols, H.A. & Voragen, A.G.J.** 1998. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max*) meal. Isolation and characterisation. *Carbohydrate Polymers* 37: 87-95.
- INPE & Fundação Sos Mata Atlântica.** 2006. Atlas dos Remanescentes Florestais do Domínio Mata Atlântica 2000-2005. São Paulo: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), São José dos Campos, e Fundação SOS Mata Atlântica.
- ISTA.** 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13: 356-513.
- Jones, L., Milne, J.L., Ashford, M.D. & McQueen-Mason, S.J.** 2003. Cell wall arabian is essencial for guard cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 11783-11788.
- Kermode, A.R.** 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9: 155-195.
- Koch, J.L., Horbowicz, M. & Obendorf, R.L.** 1999. Methanol, pectin and pectinesterase changes during soybean seed maturation. *Seed Science Research* 9: 311-320.
- Koster, K.L.** 1991. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology* 96: 302-304.
- Krause, K.-P., Hill, L., Reimholz, R., Nielsen, T.H., Sonnewald, U. & Stitt, M.** 1998. Sucrose metabolism in cold-stored potato tubers with decreased expression of sucrose phosphate synthase. *Plant Cell Environ* 21: 285-299.
- Leduc, S.N.M.** 2007. Indução de tolerância à dessecação e variação de carboidratos solúveis em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) durante a maturação. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Leme, E.M.C. & Siqueira Filho, J.A.** 2006. A Mata Atlântica – aspectos gerais. *In*: Siqueira Filho, J.A., Leme, E.M.C. (eds.). *Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste. Biodiversidade, Conservação e suas Bromélias*. Andréa Jakobsson, Rio de Janeiro.
- Lin, T.-P. & Huang, N.-H.** 1994. The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. *Journal of Experimental Botany* 45: 1289-1294.
- Lino, C.F.,** 1992. Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Volume 1. ed. Consórcio Mata Atlântica-Universidade Estadual de Campinas. São Paulo.
- Louro, R.P., Santiago, L.J.M., Dos Santos, A. V. & Machado, R. D.** 2003. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* plants cultivated *ex vitro* in greenhouse and field conditions. *Tree Structure and Function* 17: 11-22.

- Marcos Filho, M.** 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas, Fealq, Piracicaba.
- Markovic, O. & Obendorf, R.L.** 1999. Soybean seed pectinesterase. *Seed Science Research* 8: 455-461.
- McCartney, L., Ormerod, A.P., Gidley, M.J. & Knox, J.P.** 2000. Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-β-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *Plant Journal* 22: 105-113.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C. & Albersheim, P.** 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annals of Review Biochemistry* 53: 625-663.
- 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.** 2008. Compostos de reserva de sementes e suas relações com diferentes níveis de sensibilidade à dessecação e ao congelamento. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Micheli, F.** 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *TRENDS in Plant Science* 6: 414-419.
- Mittermeier, R.A., Da Fonseca, G.A.B., Rylands, A.B. & Brandon, K.** 2005. A brief history of biodiversity conservation in Brazil. *Conservation Biology* 19: 601-607.
- Moore, J.P., Nguema-Ona, E., Chevalier, L., Lindsey, G.C., Brandt, W.F., Lerouge, P., Farrant, J.M. & Driouich, A.** 2006. Response of the leaf cell wall to desiccation in the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*. *Plant Physiology* 141: 651-662.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nkang, A.** 2002. Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *Journal of Plant Physiology* 159: 473-483.
- Obel, N., Porchia, A.C. & Scheller, H.V.** 2002. Dynamic changes in cell wall polysaccharides during wheat seedling development. *Phytochemistry* 60: 603-610.
- Obendorf, R.L.** 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7: 63-74.
- Peterbauer, T. & Richter, A.** 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11: 185-197.
- Priestley, D.A. & Williams, S.E.** 1985. Changes in cotyledonary lipids during drying of cocoa (*Theobroma cacao* L.) seeds. *Tropical Agriculture* 63: 65-67.

- Ren, C. & Kermode, A.R.** 2000. An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. *Plant Physiology* 124: 231-242.
- Roberts, E.H.** 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.
- Rocha, Y. T.** 2004. Ibirapitinga: história, distribuição e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata Lam.*, Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Santana, D.G. & Ranal, M.A.** 2004. Análise Estatística. *In Germinação: do básico ao aplicado.* Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (Orgs.) Artmed Editora S.A., Porto Alegre, p. 197-208
- Santos, I.R.I.** 2000. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12 (Edição especial): 70-84.
- Santos, P.M., Gondim, T.C.O., Araújo, E.F. & Dias, D.C.F.S.** 2002. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho-doce pelo teste de envelhecimento acelerado. *Revista Brasileira de Sementes* 24: 91- 96.
- Sasaki, K.** 1983. Changes in Neutral Sugar Compositions of Cell Wall Polysaccharides during Redifferentiation of Cultured Carrot Cells and during Maturation of Soybean Seeds. *Plant and Cell Physiology* 24: 811-821.
- Schaffer, W.B. & Prochnow, M.** 2002. A Mata Atlântica e você. Como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira. Iphasis, Brasília.
- Shiga, T.M. & Lajolo, F.M.** 2006. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) – composition and structure. *Carbohydrate Polymers* 63: 1-12.
- Shiga, T.M., Lajolo, F.M. & Filisetti, T.M.C.C.** 2004. Changes in the cell wall polysaccharides during storage and hardening of beans. *Food Chemistry*. 84: 53-64.
- Silveira, C.E.S. & Amaral, L.I.V.** 2000. Parede celular vegetal. *Revista da Universidade Católica de Brasília* 8: 65-100.
- Siqueira, A.C.M.F., Nogueira, J.C.B., & Kageyama, P.Y.** 1993. Conservação de recursos genéticos *ex situ* do cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.) – Leguminosae. *Revista do Instituto Florestal*. 5: 231-243.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biology and Chemistry* 160: 61-68.
- Steadman, K.S., Burgoon, M.S., Schuster, R.L., Lewis, B.A., Edwardson, S.E. & Obendorf, R.L.** 2000. Fagopyritols, D-chiroinositol and other soluble carbohydrates in

- buckwheat seed milling fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2843-2847.
- Stolle-Smits, T., Beekhuizen, J.G., Kok, M.T.C., Pijnenburg, M., Recourt, K. Derksen, J. & Voragen, A.G.J.** 1999. Changes in cell wall polysaccharides of green bean pods during development. *Plant Physiology* 121: 363-372.
- Stombaugh, S.K., Jung, H.G., Orf, J.H. & Somers, D.A.** 2000. Crop physiology & metabolism. *Crop Science* 40: 408-412.
- Sun, W.Q., Irving, T.C. & Leopold, A.C.** 1994. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiologia Plantarum* 90: 621-628.
- Tabarelli, M., Pinto, L.P., Silva, J.M.C., Hirota, M. & Bedê, L.** 2005. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Conservation Biology* 19: 695-700.
- Teixeira, S.P., Carmello-Guerreiro, S.M. & Machado, S.R.** 2004. Fruit and seed ontogeny related to the seeds behaviour of two tropical species of *Caesalpinia* (Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 146: 57-70.
- Toledo, F.F. & Marcos Filho, J.** 1977. Manual das sementes - tecnologia da produção. São Paulo: Ceres.
- Vertucci, C.W. & Roos, E.E.** 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology* 94: 1019-1023.
- Vicré, M., Lerouxel, O., Farrant, J., Lerouge, P. & Driouich, A.** 2004. Composition and desiccation-induced alterations of the cell wall in the resurrection plant *craterostigma wilmsii*. *Physiologia Plantarum* 120: 229-239.
- Villela, F.A. & Peres, W.B.** 2004. Coleta, beneficiamento e armazenamento. *In* Germinação: do básico ao aplicado. Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (Orgs.). Artmed Editora S.A., Porto Alegre, p. 265-281.
- Voelker, T. & Kinney, A.J.** 2001. Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 335-361.
- Weber, H., Borisjuk, L. & Wobus, U.** 1996. Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *The Plant Journal* 10: 823-834.
- Weber, H., Borisjuk, L. & Wobus, U.** 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in plant science* 2: 169-174.

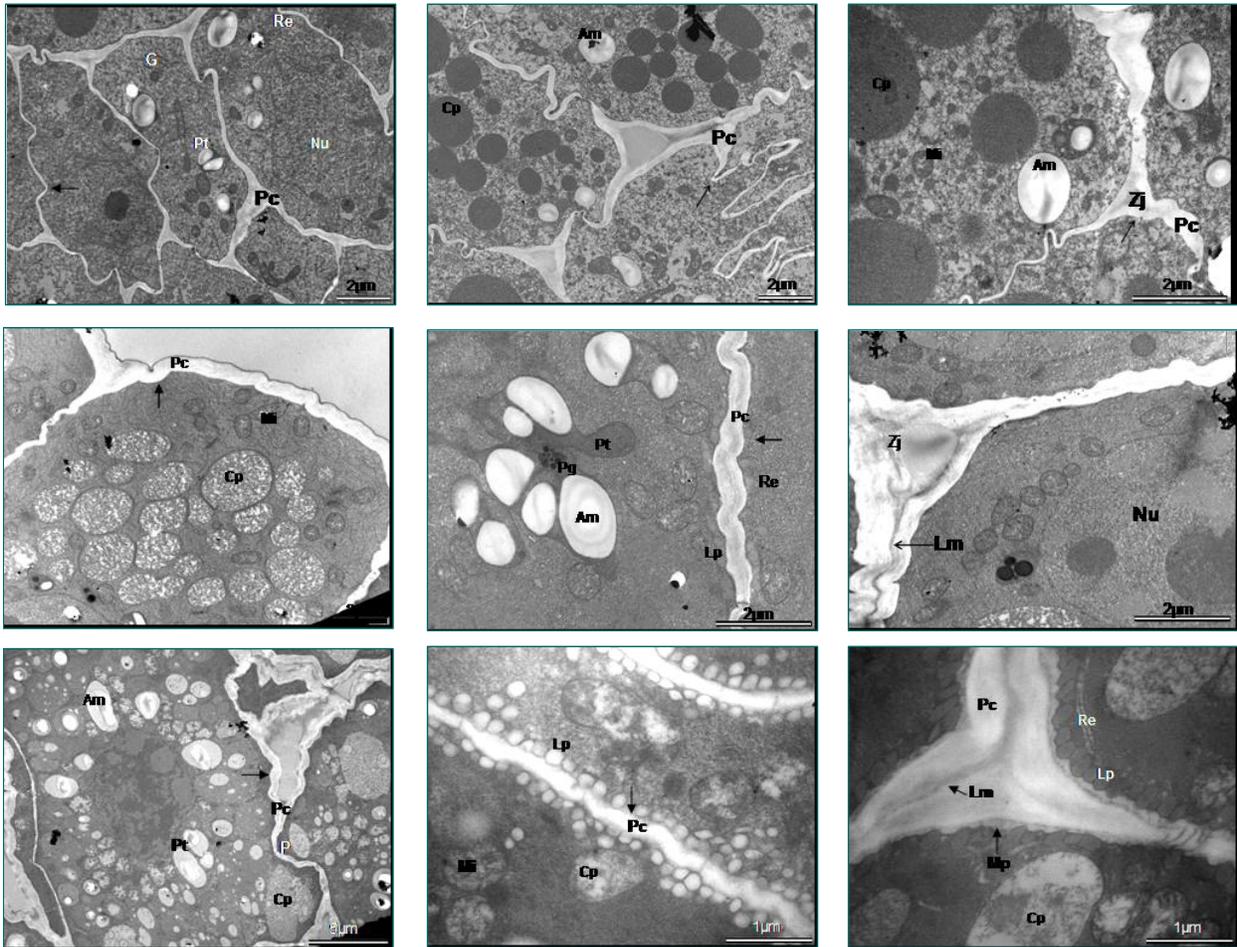
Wesley-Smith, J., Berjak, P., Pammenter, N.W. & Vertucci, C.W. 1995. Ultrastructural evidence for the effects of freezing in embryonic axes of *Pisum sativum* L. at various water contents. *Annals of Botany* 76: 59-64.

Yamada, T., Kieroda, K., Jitsuyama, Y., Takezama, K., Arakawa, K. & Fujikawa, S. 2002. Roles of the plasma membrane and cell wall in the responses of plant cells to freezing. *Planta* 215: 770-778.

7. Anexos

7.1. Análises Ultra-estruturais das sementes de paubrasil (eixo e cotilédones) durante a maturação

Eixo embrionário



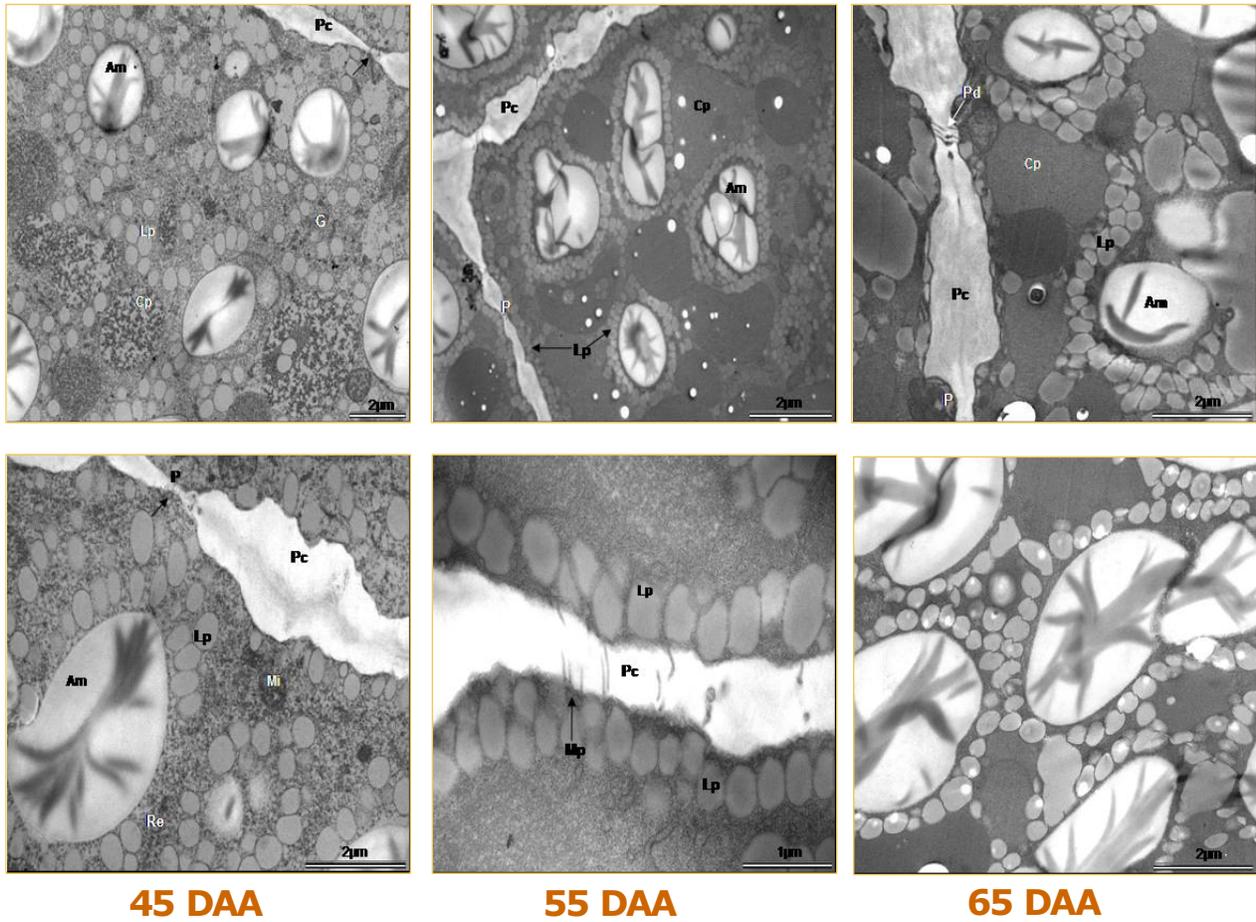
45 DAA

55 DAA

65 DAA

Eletromicrografias de cortes transversais do eixo embrionário de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) nos três estádios de maturação. As setas indicam dobras na parede celular. Am: Grão de amido; Cp: Corpo proteico; G: Complexo de Golgi; Nu: Núcleo; Mi: Mitocôndria; Pt: plastídeo, Re: Reticulo endoplasmático; Lm: Lamela média; Zj: Zona de junção das células; Lp: Vesícula de lipídio.

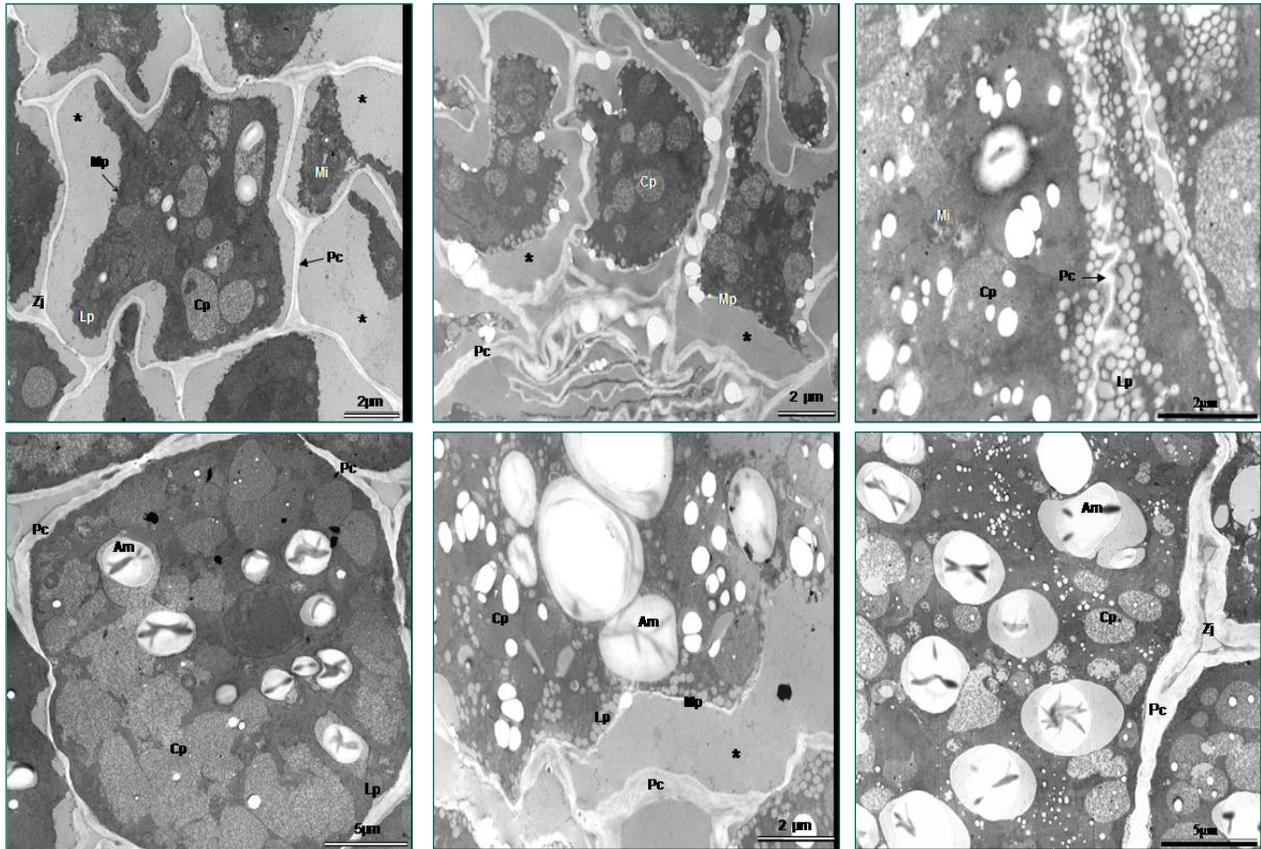
Cotilédones



Eletromicrografias de cortes transversais de cotilédones de sementes de *C. echinata* (pau-brasil) nos três estádios de maturação. (Pc) com a seta indicando campo de pontoação (P). Am:Grão de amido; Cp: Corpo proteico; G: Complexo de Golgi; Lp: Vesícula de lipídeo; Re: Retículo endoplasmático; Mp: Plasmalema; Pd: Plasmodesmata.

7.2. Análises Ultra-estruturais das sementes de paubrasil (eixo e cotilédones) durante o armazenamento

Eixo embrionário



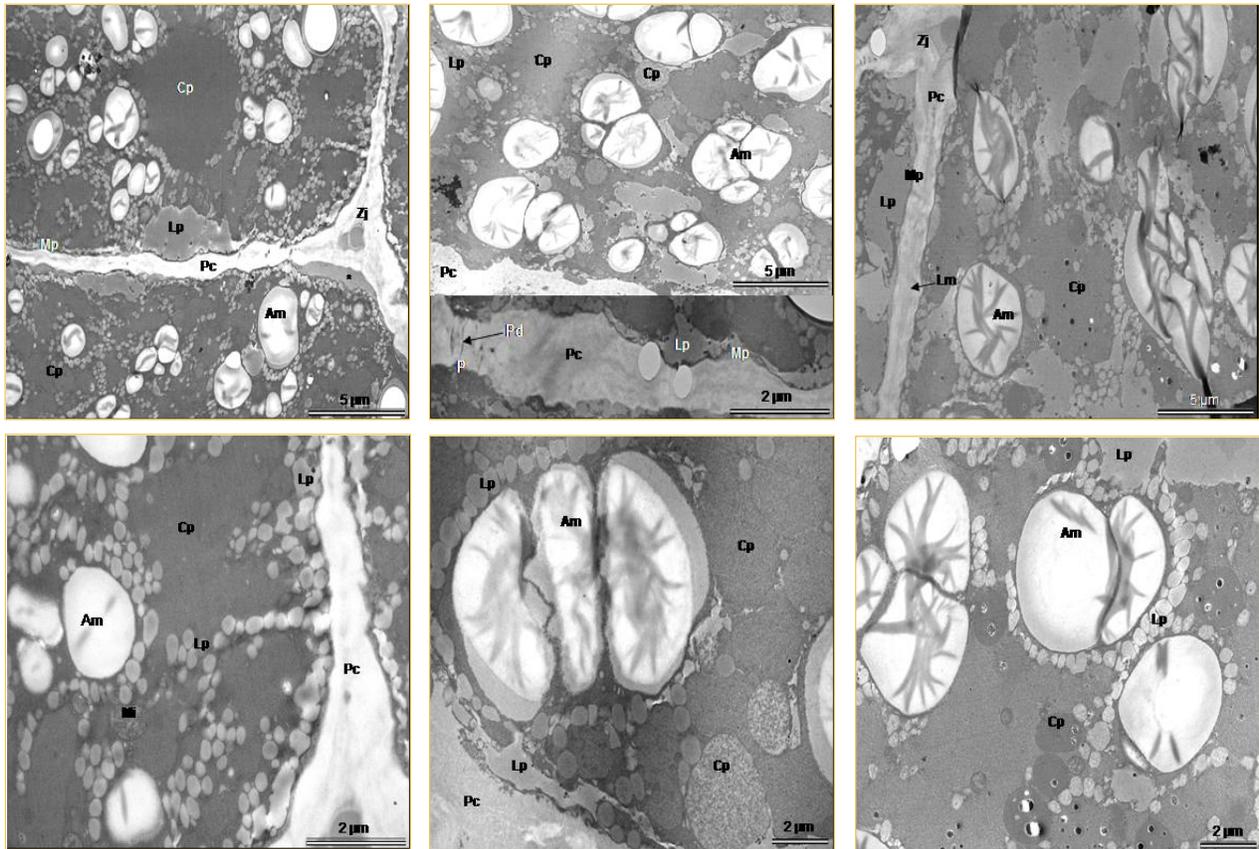
25 C

7 °C

-18°C

Electron micrographs of transverse sections of the embryonic axis of seeds of *C. echinata* (pau-brasil) stored for 338 days at different temperatures. (Pc) Cell wall; Zj: Cell junction zone; (*) Protoplast retraction; Am: Starch granule; Cp: Protein body; Lp: Lipid vesicle; Mi: Mitochondria; Mp: Plasmalema;

Cotilédones



25 °C

7 °C

-18°C

Electromicrografias de cortes transversais de células dos cotilédones de sementes de *C. echinata* (paubrasil) armazenadas por 338 dias em diferentes temperatura. (Pc) Parede celular; (Lp) Vesículas de lipídio; (Mp) Plasmalema; (*) Retração do protoplasto junto à zona de junção (Zj) das células; Grão de amido; Cp: Corpo proteico; Lp: Vesícula de lipídeo; Mp:Plasmalema; P: Campo primário de pontoação; Pd: Plasmodesmata.