

ROSELI BETONI BRAGANTE

**METABOLISMO E POTENCIAL DE  
ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE  
LEGUMINOSAS NATIVAS**

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

SÃO PAULO  
2016

ROSELI BETONI BRAGANTE

**METABOLISMO E POTENCIAL DE  
ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE  
LEGUMINOSAS NATIVAS**

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

ORIENTADORA: DRA. RITA DE CASSIA LEONE FIGUEIREDO RIBEIRO

CO-ORIENTADOR: CLAUDIO JOSE BARBEDO

2016

Dedico

*Ao meu esposo Leandro, aos meus pais Valter e Geralda e a  
toda minha família pelo amor, apoio, paciência e  
compreensão nos momentos de ausência.*

*“Quiseram nos enterrar, mas não sabiam que éramos sementes”*  
Provérbio Mexicano

## Agradecimentos

Ao Instituto Federal do Triângulo Mineiro por me dar a oportunidade de continuar meus estudos;

Ao Instituto de Botânica de São Paulo que possibilitou a realização deste trabalho;

À Pós-Graduação do Instituto de Botânica e aos seus funcionários, Márcia e Shirlei;

A minha orientadora Dra. Rita de Cassia Leone Figueiredo Ribeiro por me aceitar como aluna e pela oportunidade concedida de aprender a fazer ciência como se deve; pelas palavras, carinho e compreensão dedicados a mim;

Ao meu co-orientador Dr. Claudio José Barbedo, por acreditar em mim e me desafiar a realizar esse projeto. Por todas as conversas, incentivo e confiança e por ser meu “pai científico”;

Ao Dr. Danilo da Cruz Centeno, pelo auxílio nas análises metabolômicas, pela disposição e injeção de ânimo nos momentos mais difíceis de acreditar que eu conseguia;

Ao meu amigo e eterno “calouro” Paulo Roberto Ortiz que me trouxe de volta ao Botânico e me apresentou ao Dr Claudio me fazendo acreditar que conseguia;

Ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, seus pesquisadores, alunos e funcionários, em especial a Mary e Pedro pelo apoio técnico;

Aos pesquisadores Dra. Márcia Regina Braga, Dra. Luce Maria Brandão Torres, Dra. Marília Gaspar e Dr. Marco Aurélio Tiné, com quem pude aprender no tempo que passei no Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Fisiologia, seja em disciplinas, conversas de corredor ou ainda pelas dúvidas sanadas; em especial à Dra. Maria Angela Machado que além do incentivo científico me dedicou muito carinho e apoio emocional nos momentos mais difíceis;

Ao Núcleo de Pesquisa em Sementes, seus pesquisadores, alunos e funcionários, pelo incentivo, risadas e conversas no café que tornavam o ambiente de trabalho sempre mais agradável em especial a Dra. Marina Crestana Guardia, que permitiu o uso das instalações do Núcleo, Adriana Fidalgo pelo auxílio no laboratório e viagens de coleta. Aos queridos Nelson, José Marcos, Waldir e Monica pelo apoio de sempre.

Ao senhor Edsnon da Campininha que sempre me ajudou nas coletas com muita dedicação

À querida Msc Aline Forgatti Hell pela amizade e apoio incondicional desde as primeiras dúvidas no laboratório até o apoio na interpretação de dados de metabolômica;

À Vera Lygia El Id pela amizade e colo em todos os anos que estive no Botânico;

Ao João Paulo Naldi pela amizade, exemplo de profissionalismo e apoio em todos os sentidos;

A Cibele Françoso pelas conversas e por me ensinar a ter paciência;

A Ana Clara Araújo por todo o auxílio e amizade;

A Daiane, Sandra, Juliana, Camila, Isabela, Aline, Mariane, Giovana, Emanuella, Kassinha, Athos, Sanches, Cabral, Evandro, Leila pelas conversas e risadas durante as “marmitadas” na cozinha, corredores e botecos.

Ao Dr. Edmir Vicente Lamarca, pelas sugestões durante a elaboração do projeto e pelo auxílio nos experimentos “pilotos”;

A todos os inúmeros amigos da fisiologia, sementes e alojamento que fiz nessa jornada e que infelizmente não caberiam nessa página, por toda amizade, auxílio em coletas, beneficiamento de sementes, conversas e diversão;

A Prefeitura de Paulínia-SP, Núcleo de Pesquisa Reserva Biológica de Mogi Guaçu, Instituto Federal do Triângulo Mineiro-Campus Uberaba, ao Instituto de Botânica de São Paulo/SP, e aos alunos Bruno Vasquez e Vitor Martini Neto, ao funcionário Edson e pesquisadores Dr. João Del Giudice Neto, Dr. Marcos Mecca Pinto pelo apoio nas coletas;

Aos amigos Marcia, Marcos, Vladmir, Cristiane, Aline pela ajuda na extração das sementes de pau-ferro;

E em especial ao meu pai Valter Spada Betoni que veio do Mato Grosso do Sul para me ajudar nas coletas e me encher de ânimo sempre;

A equipe do Núcleo de sementes pelo mutirão de quebra de frutos de pau-ferro, pois sem o qual seria impossível obter a quantidade necessária de sementes;

Ao nosso querido “teacher” Oda que desde o início me deu suporte no inglês.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para o meu crescimento pessoal, profissional e apoio emocional paraa realização desse trabalho.

**RESUMO GERAL:** A super exploração de *Caesalpiniaechinata* Lam. (pau-brasil) para tintura (Brasil colônia) e para uso da madeira (mais recente), colocaram-na entre as espécies nativas ameaçadas de extinção, podendo o banco de sementes ser uma estratégia importante para a conservação da espécie. Entretanto, o uso de bancos de sementes depende do potencial de armazenamento e da longevidade das sementes. A redução do teor de água e da temperatura é técnica comumente empregada para armazenamento, mas é dependente do grau de tolerância à dessecação das sementes que, em algumas espécies, é extremamente baixo. Há a possibilidade de existir um gradiente contínuo nessa tolerância, desde as sementes mais tolerantes (ortodoxas) até as mais sensíveis (recalcitrantes). Alguns autores consideram que tal variabilidade pode ser decorrente do grau de maturação das sementes no momento de seu desligamento da planta-mãe, uma vez que a tolerância à dessecação é adquirida progressivamente durante a maturação. Sementes de pau-brasil toleram secagem até teores de água próximos a 7%, podendo ser armazenadas por até cinco anos em temperaturas de congelamento (-5 °C a -18 °C) sem perderem a viabilidade; se mantidas à temperatura ambiente, mesmo quando secas, perdem a capacidade germinativa em cerca de três meses. Recentemente foi observado que, durante o armazenamento, essas sementes apresentam elevado consumo de O<sub>2</sub> sem a correspondente liberação de CO<sub>2</sub>, sugerindo que o metabolismo respiratório e/ou oxidativo possam condicionar a sua velocidade de deterioração. Contudo, os processos fisiológicos e metabólicos envolvidos na rápida perda de viabilidade durante o armazenamento ainda permanecem incertos. Tais sementes situariam-se, dessa forma, em posição intermediária entre ortodoxas e recalcitrantes, tendo avançado o processo de maturação o suficiente para adquirir a tolerância à dessecação, mas não o suficiente para desenvolver plenamente os sistemas antioxidantes. O estudo comparado de espécies taxonomicamente próximas e com comportamentos contrastantes poderá ajudar a compreender o envolvimento do processo de tolerância à dessecação com o comportamento de sementes durante o armazenamento. Dentre as Leguminosas, *Libidibia ferrea* (pau-ferro) apresenta sementes ortodoxas clássicas e taxonomicamente é próxima de pau-brasil. O objetivo desse trabalho foi analisar comparativamente sementes de *Caesalpinia echinata* e *Libidibia ferrea* em diferentes estádios de maturação (imatura e madura) e condições de armazenamento (-18 °C e 25 °C por diferentes períodos, na presença e ausência de luz), a fim de avaliar o efeito de fatores físicos (temperatura e luz) como condicionantes das taxas de deterioração das sementes durante o armazenamento, e sua relação com o metabolismo respiratório e perfil metabólico. Os resultados permitiram verificar que sementes imaturas e maduras de *Caesalpinia echinata* e *Libidibia ferrea* podem ser armazenadas por pelo menos 1 ano a -18 °C. O metabolismo primário das sementes de *C. echinata* é reduzido na maturação, mas não como o observado em sementes maduras de *L. ferrea*. Comparando-se o comportamento das sementes das duas espécies estudadas aos descritos para sementes de outras Leguminosas arbóreas, como as recalcitrantes de *Inga vera* e as ortodoxas de *Erythrina speciosa* foi possível constatar um gradiente metabólico no qual sementes com menor teor de água apresentaram menor atividade metabólica. Dessa forma, os resultados encontrados neste trabalho confirmam a hipótese de que as diferenças entre sementes ortodoxas e recalcitrantes decorrem do grau de maturação das mesmas no momento do desligamento da planta-mãe.

**Palavras-chave:** armazenamento, metabolismo, pau-brasil, pau-ferro, respiração.

**SUMMARY:** The overexploitation of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) to dye (Brazil colony) and use of wood (later), led to its inclusion among the native endangered species. Therefore, the seed bank may be an important strategy for the conservation of this species. However, the use of seed banks is dependent on the storage potential, and longevity of seeds. The reduction of the water content and temperature are commonly employed to store tree seeds, but depends on the degree of desiccation tolerance of seeds that, in some species, is extremely low. It is believed to be a continuous gradient of tolerance, from the most tolerant seeds (orthodox) to the most sensitive ones (recalcitrant). Some authors consider even that this variability may be due to the degree of maturation of seeds at shedding time from the mother plant, since desiccation tolerance is gradually acquired during maturation. Brazilwood seeds tolerate drying up water levels close to 7%, and may be stored for up to five years in freezing temperatures (-5 °C to -18 °C) without losing viability; if kept at room temperature, even when dry, they lose their ability to germinate in about three months. Recently it was observed that during storage, these seeds have a higher O<sub>2</sub> consumption without a corresponding release of CO<sub>2</sub>, suggesting that the respiratory metabolism and/or oxidative processes affect the speed of deterioration. However, the physiological and metabolic processes involved in the rapid loss of viability during storage are still uncertain. Such seeds, present, therefore, an intermediate behavior between orthodox and recalcitrant, having advanced the maturation process enough to acquire tolerance to desiccation, but not enough to fully develop the antioxidant systems. The comparative study of taxonomically close species with contrasting behavior may help to understand the involvement of the process of desiccation tolerance with seed behavior during storage. Among Leguminosae, *Libidibia ferrea* (ironwood) features classic orthodox seeds and taxonomically is close to Brazil wood. Therefore, the study of the respiratory behavior of different seeds during the maturation process may extend knowledge about the metabolism of stored seeds and contribute to the conservation of these species. The aim of this work was analyze *Caesalpinia echinata* and *Libidibia ferrea* seeds at different stages of maturation (immature and mature) and storage conditions (-18 °C and 25 °C for different periods in the presence and absence of light), the to assess the effect of physical factors (temperature and light) affecting deterioration rates of the seeds during storage, and its relationship with their respiratory metabolism and metabolic profiles. The results showed that immature seeds of *C. echinata* and mature seeds of *L. ferrea* could be stored for at least 1 year at -18 °C. The primary metabolism of *C. echinata* seeds is reduced during maturation, but not as observed in mature seeds of *L. ferrea*. Comparing the behavior of both seeds to those described for the recalcitrant *Inga vera* and the orthodox *Erythrina speciosa* seeds it is possible to verify a metabolic gradient on which the seeds with lower water content at dispersion exhibit reduced metabolic activity. Thus, the metabolic profile of these seeds reinforces the idea that the differences between orthodox and recalcitrant seeds arise from its degree of maturation at the time of shedding.

**Key words:** storage, metabolism, brazilwood, ironwood, respiration

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Capítulo I–Metabolismo de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> (Leguminosae) em dois estádios de maturação</b>	
<b>Figura 1</b> -Exemplar adulto de <i>Caesalpinia echinata</i> no parque Brasil 500 em Paulínia-SPindicando com detalhes, B. bosque, C. inflorescência, D. frutos imaturos e maduros e E. sementes imaturas e maduras.....	<b>36</b>
<b>Figura 2</b> -Dados meteorológicos da região de Campinas-SP/2014.....	<b>41</b>
<b>Figura 3</b> -Caracterizaçãofisiológica(teor de água, porcentagem de germinaçãoeplântulas normais) antes do armazenamento de sementes imaturase maduras de <i>Caesalpinia echinata</i> sem e com secagem.....	<b>42</b>
<b>Figura 4</b> Caracterizaçãofisiológica de sementes imaturas e maduras secas armazenadas por 1, 2,6 e 12 meses a -18 °C e 25 °C naluz e escuro.....	<b>43</b>
<b>Figura 5</b> -Teste de tetrazólio em sementes imaturas e maduras de <i>Caesalpinia echinata</i> sem armazenamento com e sem secagem.....	<b>44</b>
<b>Figura 6</b> -Coloração do tegumento de sementes imaturas e maduras de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. antes e após armazenamento de 12 meses.....	<b>44</b>
<b>Figura 7</b> -Consumo de O <sub>2</sub> (μmol.gMS <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ), liberação de CO <sub>2</sub> (μmol.gMS <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )e diferença entre O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> de sementes imaturas e maduras de <i>Caesalpinia echinata</i> sem e com secagem antes do armazenamento.....	<b>45</b>
<b>Figura 8</b> -Consumo de O <sub>2</sub> (μmol.gMS <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ), liberação de CO <sub>2</sub> (μmol.gMS <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )e diferença entre O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> de sementes imaturas e maduras de <i>Caesalpinia echinata</i> secas armazenadas.....	<b>46</b>
<b>Figura 9</b> -Perfil metabólico de eixos imaturos e maduros <i>Caesalpiniaechinata</i> antes eapós secagematé 8% de teor de água.....	<b>47</b>
<b>Figura 10</b> -Perfil metabólico de cotilédonesimaturos e maduros <i>Caesalpiniaechinata</i> antes eapós secagem até8 % de teor de água.....	<b>48</b>
<b>Figura 11</b> -Perfil metabólico de eixos embrionáriosimaturos de <i>Caesalpiniaechinata</i> armazenadas por 1 mês a -18 °C e 25 °C no escuro.....	<b>50</b>
<b>Figura 12</b> -Perfil metabólico de eixos embrionários maduros de <i>Caesalpiniaechinata</i> armazenadas por 1 mês a -18 °C e 25 °C no escuro.....	<b>51</b>
<b>Figura 13</b> -Perfil metabólico de cotilédones de sementes imaturas de <i>Caesalpiniaechinata</i> armazenadas por 1 mês a -18 °C e 25 °C no escuro.....	<b>52</b>
<b>Figura 14</b> -Perfil metabólico de cotilédones maduros de <i>Caesalpiniaechinata</i> armazenados por 1 mês a -18 °C e 25 °C no escuro.....	<b>53</b>
<b>Figura 15</b> -Análise de Componentes Principais(PCA)abrangendoa análise doperfil metabólico desementes de <i>Caesalpinia echinata</i> .....	<b>55</b>

**Capítulo II –Physiological and metabolic responses of immature and mature seeds of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) under contrasting storage temperatures**

**Figura 1-***Libidibia ferrea* adult plant from the Campus of the Federal Institute of Education, Science and Technology of the Triângulo Mineiro - Campus Uberaba (IFTM).....87

**Figura 2-**Water content, percentage of germination and normal seedlings of immature and mature *L. ferrea* seeds fresh and dried until 13% without storage treatments.....92

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 3-**Water content, percentage of germination and normal seedlings from immature and mature *Libidibia ferrea* seeds dried and stored for 1, 2, 6 and 12 months at -18 °C and 25 °C in the light and dark.....92

**Figura 4-**Values of O<sub>2</sub> consumption, CO<sub>2</sub> emission and difference between O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in immature and mature *Libidibia ferrea* seeds fresh and dried without storage .....93

**Figura 5-**Seeds from both stages dried and stored by 1, 2, 6 and 12 months at -18 °C and 25 °C in the light and dark.....94

**Figura 6-**Metabolic profile of *Libidibia ferrea* seeds during maturation. Immature and mature seeds fresh and dried until 8% of water content.....95

**Figura 7-**Metabolic profile of immature seeds of *Libidibia ferrea* dried until 8% of water content, stored by 1 and 6 months at -18 °C and 25 °C.....97

**Figura 8-** Metabolic profile of mature seeds of *Libidibia ferrea* dried until 8% of water content, stored by 1 and 6 months at -18 °C and 25 °C.....98

**Figura 9-**Principal component analysis (PCA) covering the analysis of the metabolic profile of immature and mature seeds of *Libidibia ferrea*.....99

**Figura 10-**HPAEC/PAD profile of soluble carbohydrates from immature and mature seeds of *Libidibia ferrea* fresh and dried.....100

**Capítulo III –Fisiologia e perfil metabólico de sementes de Leguminosae arbóreas com diferentes níveis de sensibilidade a dessecação**

**Figura 1-**Caracterização morfológica geral de quatro espécies de Leguminosae: *Inga vera*, *Caesalpinia echinata*, *Libidibia ferreae* e *Erythrina speciosa*.....118

**Figura 2-**Representação esquemática do teor de água de sementes ortodoxas e recalcitrantes durante a maturação.....120

<b>Figura 3</b> -Porcentagem de ácidos graxos saturados (coluna preta) e insaturados (coluna cinza) em lipídeos armazenados em sementes de quatro espécies Leguminosas com diferentes níveis de sensibilidade a dessecação.....	<b>123</b>
<b>Figura 4</b> -Consumo de O <sub>2</sub> e liberação de CO <sub>2</sub> e diferença entre O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> de quatro espécies de Leguminosas em dois estádios de maturação.....	<b>126</b>
<b>Figura 5</b> -Análise de Componentes Principais(PCA)abrangendo a análise do perfil metabólico de cotilédones de sementes de <i>Inga vera</i> , <i>Caesalpinia echinatae</i> <i>Libidibia ferrea</i> .....	<b>131</b>
<b>Figura 6</b> -Teor de água ao longo da maturação de quatro espécies de Leguminosas em dois estádios de maturação.....	<b>136</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo III – Fisiologia e perfil metabólico de sementes de Leguminosas arbóreas com diferentes níveis de sensibilidade a dessecação

<b>Tabela 1</b> -Composição de carboidratos solúveis neutros(mgg <sup>-1</sup> MS) em sementes de quatro espécies arbóreas tropicais com sensibilidade diferente à dessecação.....	<b>122</b>
--	------------

## Sumário

RESUMO GERAL.....	6
SUMMARY .....	7
Introdução .....	13
Literatura Citada .....	23
Capítulo 1Metabolismo de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> (Leguminosae) em dois estádios de maturação .....	30
Introdução .....	31
<b>Material vegetal.....</b>	35
<b>Análises físicas e fisiológicas.....</b>	37
<b>Teste de Tetrazólio.....</b>	37
<b>Análise metabolômica .....</b>	39
<b>Obtenção dos dados climáticos .....</b>	40
<b>Delineamento experimental e análise estatística dos dados .....</b>	40
Resultados .....	41
Conclusões .....	72
Literatura Citada .....	73
Capítulo 2Physiological and metabolic responses of immature and matureseeds of <i>Libidibia ferrea</i> ((Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) under contrasting storage temperatures.....	83
ABSTRACT.....	84
RESUMO .....	84
INTRODUCTION .....	85
MATERIAL AND METHODS .....	88
<b>Plant material .....</b>	88
<b>Fruit and seed analysis .....</b>	88
<b>Respiratory Rates.....</b>	90
<b>Extraction and analysis of the metabolic profile.....</b>	91
<b>Extraction and analyses of soluble carbohydrates.....</b>	92
<b>Statistical Analysis .....</b>	92
RESULTS .....	93
DISCUSSION .....	103
CONCLUSIONS.....	109
REFERENCES.....	109
Capítulo 3Fisiologia e perfil metabólico de sementes de Leguminosas arbóreas com diferentes níveis de sensibilidade a dessecação .....	116
Introdução .....	117
<b>Caracterização das espécies em estudo .....</b>	118
<b>Tolerância a dessecação e armazenamento .....</b>	121
<b>Composição de carboidratos e ácidos graxos .....</b>	122

<b>Taxa respiratória-consumo de oxigênio e liberação de gás carbônico (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>)</b> .....	127
<b>Perfil metabólico</b> .....	132
<b>Considerações Finais</b> .....	135
Conclusões .....	137
Literatura Citada .....	138
Considerações Finais.....	145

## Introdução

Preocupações com a rápida erosão da diversidade de plantas têm gerado várias iniciativas quanto à questão de manutenção e conservação de recursos genéticos em bancos de sementes (Pennisi 2010). Neste particular, a obtenção de novas informações acerca da fisiologia de sementes de espécies florestais é fundamental para fins de conservação, uma vez que as florestas constituem um reservatório da diversidade genética e que exercem papel vital na manutenção da estabilidade do meio ambiente (Walters *et al.* 2008).

Dentre as estratégias de conservação destacam-se a *in situ*, que envolve conservação do material genético em seu habitat natural e a *ex situ*, que é a conservação de genes em condições artificiais (coleções permanentes), tais como pólen, cultura de tecidos, plantas vivas e sementes (Botanic Gardens Conservation International, 2001). Bancos de sementes em todo o mundo são reconhecidos como maneiras para salvaguardar os recursos genéticos vegetais para a melhoria das culturas, conservação de espécies selvagens ameaçadas ou em perigo de extinção, estudos em biologia evolutiva (Khoury & Makkouk 2010, Godefroid *et al.* 2011, Enßlin *et al.* 2011, Hay & Probert 2013, Westengen 2015, Walters 2015a).

A conservação *ex situ* de uma espécie utilizando sementes não significa apenas uma forma de sobrevivência, mas a manutenção da variabilidade genética intraespecífica, e depende da longevidade e do potencial de armazenamento dessas sementes, bem como do conhecimento da fisiologia de sua deterioração, incluindo aspectos bioquímicos e ação de diversos fatores bióticos e abióticos. Assim, a preservação de espécies em bancos de germoplasma e a propagação de suas sementes com reestabelecimento em habitats naturais é de extrema relevância (Bailly 2004, Rocha 2004, McCouch *et al.* 2013, Kocsy, 2015, Walters 2015a).

O conhecimento sobre a longevidade das sementes no ambiente foi inicialmente baseado na capacidade destas em resistirem à secagem. Dessa forma, a secagem e o armazenamento em temperaturas baixas tornaram-se a principal técnica para conservação de sementes. Reduções do teor de água e na temperatura diminuem a atividade metabólica, consequentemente minimizando as

reações de deterioração durante o armazenamento (Delouche 1968, Popinigis 1977, Bewley *et al.* 2013, Marcos Filho 2015). No entanto, nem todas as sementes resistem à secagem, sendo viável a redução no teor de água apenas para aquelas tolerantes à dessecação.

Como a capacidade de armazenamento depende do grau de tolerância à dessecação, para fins tecnológicos, as sementes foram agrupadas em duas categorias: ortodoxas e recalcitrantes. Foram denominadas sementes ortodoxas aquelas que toleram o processo natural de secagem durante a maturação, sendo liberadas da planta mãe com baixo teor de água e resistindo à secagem artificial até 10% de água, característica que permite armazená-las em temperaturas negativas, mantendo a viabilidade por períodos prolongados. Em contraste ao comportamento ortodoxo, sementes que não toleram a perda acentuada no teor de água, foram denominadas recalcitrantes e apresentam maior dificuldade no armazenamento a longo prazo (Roberts 1973). Essa classificação é ainda aceita no meio tecnológico, incluindo-se um terceiro grupo de sementes, que apresenta comportamento intermediário entre as anteriores (Roberts 1973, Mai-Hong *et al.* 2006, Usberti *et al.* 2006). A tolerância à dessecação é um pré-requisito para as sementes adquirirem longevidade, havendo forte interdependência entre as duas características (Verdier *et al.* 2013, Dekkers *et al.* 2015).

Além da capacidade de tolerar a dessecação, sementes ortodoxas apresentam metabolismo distinto de sementes recalcitrantes. Assim, a atividade metabólica e as taxas de consumo de oxigênio e liberação de gás carbônico vêm sendo utilizadas como ferramentas no estudo da tolerância a dessecação e deterioração de sementes (Bonjovani 2011, Lamarca & Barbedo 2012, Caccere *et al.* 2013, Hell 2014). De um modo geral, as sementes são metabolicamente muito ativas durante o desenvolvimento, principalmente nas fases iniciais da embriogênese e durante o acúmulo de reservas (Borisjuk & Rolletschek 2008). Essa alta atividade metabólica é correlacionada com a necessidade do embrião em obter energia para o crescimento e síntese de compostos de reserva (Vigeolas *et al.* 2003, Borisjuk *et al.* 2004).

Durante a maturação das sementes, o teor de água diminui lentamente e continuamente até atingir valores próximos de 50%. A variação do teor de água até este ponto é estritamente a mesma

para sementes sensíveis e tolerantes a dessecação, porém, a partir deste ponto, o comportamento das sementes pode divergir de acordo com a espécie e com as condições ambientais (Barbedo *et al.* 2013). Em geral, sementes tolerantes à dessecação diminuem seu metabolismo durante a fase de aquisição da tolerância à dessecação de modo a ajustá-lo às condições de baixa disponibilidade hídrica, enquanto sementes sensíveis mantêm alta atividade metabólica (Pammeter & Berjak, 1999). A fase final da maturação de sementes ortodoxas é marcada pela secagem natural com grande perda de água e reversão geral do metabolismo do módulo de desenvolvimento para o de germinação, sendo considerada como uma preparação para o período de repouso no estado seco, enquanto mudanças moleculares e metabólicas consideráveis ocorrem (Barbedo & Marcos Filho 1998, Fait *et al.* 2006, Angelovici *et al.* 2010). Alterações nessa fase coincidem com um aumento gradual na longevidade das sementes (Chatelain *et al.* 2012, Verdier *et al.* 2013).

As baixas taxas de respiração e metabolismo, inferidas pelo decréscimo de compostos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, caracterizam a permanência das sementes em estado de criptobiose (Fait *et al.* 2006, Hell 2014, Marcos Filho 2015). Fait *et al.* (2006) observaram alterações no perfil metabólico e de transcritos durante o desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis thaliana*, considerada ortodoxa, indicando redução no metabolismo durante a fase de secagem. Em sementes de *Erythrina speciosa*, espécie nativa da Mata Atlântica brasileira também considerada ortodoxa, a diminuição do metabolismo ocorre antes mesmo das maiores perdas no teor de água, e pode ser observada através de clara mudança no perfil metabólico (Hell *et al.* comunicação pessoal 2016).

Em sementes ortodoxas secas observa-se, ainda, acúmulo de proteínas LEA (“Late Embryogenesis Abundant”) e de açúcares não redutores, como a sacarose e oligossacarídeos da série da rafinose (OSR) em quantidades relativamente elevadas (Hoekstra *et al.* 2001, Baud *et al.* 2002, Angelovici *et al.* 2010). Ciclitóis livres e galactosil ciclitóis também parecem contribuir para a tolerância à dessecação de maneira semelhante aos oligossacarídeos da série da rafinose (OSR) (Obendorf 1997, Peterbauer & Richter 2001), quando estes OSR não estão evidenciados

(Horbowicz *et al.* 1998, Steadman *et al.* 2000, Borges *et al.* 2006). Proteínas LEA protegem estruturas de membranas celulares, proteínas e outras macromoléculas, atuando como um tampão de hidratação e sequestrando íons (Tunnacliffe & Wise 2007). Açúcares não redutores preenchem o volume livre entre moléculas grandes, criado durante a desidratação, formando o estado vítreo, que imobiliza estruturas macromoleculares na matriz proporcionando tal proteção (Leopold *et al.* 1994, Crowe *et al.* 1997a e 1997b, Buitink & Leprince 2004, 2008). Com o baixo teor de água, a viscosidade extrema do estado vítreo restringe movimentos moleculares e difusão de reagentes necessários para outros tipos de reações químicas. Porém, a disponibilidade de oxigênio e sua tendência de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) permitem reações de radicais livres, embora em taxas muito mais lentas do que ocorreria sem o estado vítreo (Foyer & Noctor 2005, Bailly *et al.* 2008, Kranner *et al.* 2010, Walters *et al.* 2015a). Acredita-se que muitos compostos atuam minimizando o excesso de EROS, tais como glutationa, ascorbato, tocoferóis, quinonas, flavonóides, compostos fenólicos e polióis, como o galactinol (Kranner & Birtic 2005, Nishizawa *et al.* 2008). Além deste, outros polióis, como *myo*-inositol, manitol e sorbitol também são capazes de diminuir os efeitos das espécies reativas de oxigênio (Smirnoff & Cumbes, 1989). No entanto, a produção excessiva de EROS e uma ação limitada de defesas antioxidantes podem induzir estresse oxidativo (Dekkers *et al.* 2015).

Plantas tolerantes à dessecação não apenasevitam a perda de água, mas se protegem contra a remoção desta desligando o metabolismo e ativando mecanismos de proteção (Farrant 2007), situação similar ao que deve ocorrer com as sementes. Em contraste, o desenvolvimento de sementes recalcitrantes não segue esse padrão, faltando a propriedade para desligar o metabolismo como ocorre durante a maturação das sementes ortodoxas (Barbedo & Marcos Filho 1998, Berjak & Pammenter 2013). Algumas sementes recalcitrantes podem tolerar certo nível de perda de água porém sem ocorrer desidratação acentuada na etapa de pré-maturidade, sendo dispersas com teor de água ainda elevado, progredindo a seguir para a germinação imediata (Farrant *et al.* 1992, Berjak *et al.* 1993, Barbedo & Marcos Filho 1998, Caccere *et al.* 2013, Marcos Filho 2015).

Características metabólicas que requerem elevadas taxas respiratórias e grande consumo de reservas têm sido propostas como uma das possíveis razões básicas das sementes recalcitrantes serem sensíveis a dessecação e não passarem pelo estado de quiescência, restringindo o período no qual essas sementes podem ser armazenadas (Berjak & Pammeter 2013). Sementes de *Inga vera*, as quais possuem um dos maiores níveis de recalcitrância conhecidos, apresentam alterações no perfil metabólico durante o seu desenvolvimento, no entanto, estas alterações não estão relacionadas ao desligamento do metabolismo como ocorre em sementes ortodoxas, portanto, não sendo suficientes para a aquisição da tolerância à dessecação. Além disso, durante a maturação de sementes de *Inga vera* foi observado aumento no número e no tamanho de vacúolos, em cotilédones e eixos embrionários, indicando alta atividade metabólica (Caccere *et al.* 2013).

Durante o período no qual as sementes mantêm intensa atividade metabólica, mas não completam a germinação, o metabolismo pode ser desordenado, com consumo de reservas e liberação de radicais livres. Ambas as atividades prejudicam a manutenção da viabilidade das sementes durante o armazenamento e, consequentemente, favorecem sua rápida deterioração (Barbedo & Marcos Filho 1998, Ferreira & Borghetti 2004, Andréo *et al.* 2006, Berjak & Pammeter 2008). Outra possibilidade seria a presença de reações oxidativas que não a respiração, tais como a peroxidação de lipídios e oxidação de compostos fenólicos que podem estar envolvidos com a deterioração das sementes (Hendry 1993, McDonald 1999, Bailly 2004, Berjak & Pammeter 2008, Roach *et al.* 2010). A perda da viabilidade das sementes recalcitrantes é consequência dos danos ligados ao metabolismo germinativo, que simulando uma condição de germinação muito lenta, culminaria com a falta de água livre suficiente para os processos de divisão e expansão celular (Pammeter *et al.* 1994).

Aparentemente, a capacidade da semente em se manter viável com a remoção de grandes quantidades de água, ou seja, a sua tolerância à dessecação, é um dos principais condicionantes de longevidade. Esta característica garante que as sementes mantenham a viabilidade no estado seco, por longos períodos de tempo (até centenas de anos em alguns casos), sob condições naturais ou

artificiais (Kermode & Finch-Savage, 2002). Embora muito diferente de sementes tolerantes em termos fisiológicos, as sementes sensíveis à dessecação exigem igual - ou até maior - atenção aos detalhes em termos de armazenamento de curto prazo e conservação de germoplasma a longo prazo (Berjak & Pammerer 2013).

Sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) são tolerantes a dessecação (Barbedo *et al.* 2002) podendo ser consideradas organismos anidrobióticos (Lamarca & Barbedo, 2012). Essas sementes toleram redução do teor de água até 7% (Barbedo *et al.* 2002) e, em baixas temperaturas, positivas (7 °C) e de congelamento (-5 a -18 °C) podem ser armazenadas por até 18 meses (Hellmann *et al.* 2006) ou até 5 anos (Mello *et al.* 2013). Contudo, quando mantidas sob temperatura ambiente (*ca.* 25 °C), mesmo secas, não ultrapassam três meses de armazenamento, perdendo rapidamente a viabilidade (Barbedo *et al.* 2002, Hellmann *et al.* 2006).

A perda de viabilidade de sementes de pau-brasil quando armazenadas sob temperatura ambiente, mesmo com baixo nível de hidratação (10% de água), poderia ser atribuída a processos oxidativos uma vez que, nessas condições, apresentam elevado consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>) sem a correspondente liberação de gás carbônico (CO<sub>2</sub>). De acordo com Lamarca & Barbedo (2012), os valores de consumo de O<sub>2</sub> nessas sementes chegam a ser aproximadamente 50 vezes maiores que a liberação de CO<sub>2</sub>. Dessa forma, outros fatores além da tolerância a dessecação devem estar envolvidos no comportamento dessas sementes durante o armazenamento.

*Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L. P. Queiroz) basiônimo *Caesalpinia ferrea* var. *pleiostachya* Benth. ex Mart., é conhecida como "pau-ferro" ou Jucá (Queiroz 2010). Quando maduras suas sementes germinam somente após escarificação, devido à dormência imposta no amadurecimento, causada pela impermeabilidade do tegumento à água (Crepaldi *et al.* 1998, Maia 2004, Lima *et al.* 2006). Sementes com tegumento impermeável à água apresentam elevada longevidade natural (Zanon & Ramos, 1986). Quando armazenadas em embalagem permeável em ambiente não controlado, suas sementes podem permanecer viáveis por mais de 15 meses (Silva & Moraes 1986, Lorenzi 1992). Contudo, sementes desta espécie não têm boa conservação, mesmo

quando armazenadas em câmara seca. No entanto, embora sementes de *L. ferrea* sejam consideradas ortodoxas (Lewis 1987, Barroso *et al.* 1999, Lorenzi 1992, 2000), não foram encontrados trabalhos com armazenamento nas condições que permitam conservação em bancos de sementes, como efeitos de secagem e temperaturas negativas.

De maneira geral, para garantir a qualidade do armazenamento, a coleta de sementes deve ser realizada ao final da maturação, quando as mesmas alcançam o máximo valor de matéria seca, sendo que sementes maduras têm maior chance de sobreviver no armazenamento devido ao maior acúmulo de reservas, dentre outros fatores (Popinigis 1977, Bewley *et al.* 2013). A partir desse estádio, ocorre queda progressiva e irreversível na qualidade das sementes, em função do processo de deterioração (Abdul-Baki & Anderson 1972, Carvalho & Nakagawa 2000). No entanto, definir o ponto de maturidade fisiológica e o momento ideal da coleta tem sido uma tarefa difícil para muitas espécies e requer investigação. A identificação do momento em que as sementes recalcitrantes se desligam da planta mãe é ainda um dos maiores desafios aos pesquisadores dedicados aos estudos com essas sementes (Barbedo *et al.* 2013, Marcos Filho 2015).

Além da classificação já existente, em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias, há grande variação de respostas dentro de cada uma dessas categorias, levando alguns autores a considerarem a existência de níveis de recalcitrância (Pammenter *et al.* 2003). Sementes intermediárias, como o próprio nome diz, apresentam características de sementes recalcitrantes e ortodoxas, ilustrando que, a convenção de usar duas categorias exclusivas de tolerante e intolerante a dessecação é muito simplificada. A existência de uma categoria intermediária na definição pós-colheita demonstra a variação natural nas respostas de sementes à perda de água (Walters *et al.* 2015b).

A designação dessas sementes em categorias particulares é baseada nas respostas de sementes em plena maturidade, antes do início da germinação, o que é uma tarefa difícil devido à falta de um ponto definido entre maturação e germinação em muitas sementes recalcitrantes (Berjak & Pammenter 2008). A maioria dos resultados obtidos com sementes recalcitrantes são quase perfeitamente ajustados a um período específico do desenvolvimento de sementes ortodoxas

(Delgado & Barbedo 2012, Pérez *et al.* 2012, Barbedo *et al.* 2013). Assim, algumas sementes podem parecer recalcitrantes se elas forem dessecadas antes que tenham adquirido plenamente a tolerância à dessecação (Bewley *et al.* 2013).

Uma semente verdadeiramente recalcitrante, é claro, nunca se torna completamente tolerante, pelo menos sob condições naturais de secagem, pois sob certas condições algumas sementes com comportamento recalcitrante podem sobreviver a desidratação artificial. Por exemplo, os eixos isolados de algumas espécies, como o sicômoro, mostram mais tolerância à dessecação do que os embriões ou sementes intactas. A taxa de secagem também é importante e, em muitos casos, a desidratação lenta é mais prejudicial do que a secagem rápida (Bewley *et al.* 2013).

Mais recentemente, alguns autores têm considerado a possibilidade de que as sementes não pertençam, de fato, a grupos distintos (ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias), mas que as diferenças na tolerância a dessecação, viabilidade e potencial de longevidade, a curto e médio prazo, dependam do quanto as sementes se desenvolveram, ou seja do grau de maturação no qual são dispersas pela planta-mãe (Barbedo *et al.* 2013, Berjak & Pammerer 2013, Bewley *et al.* 2013). Assim, o comportamento recalcitrante das sementes seria o resultado da dispersão prematura dessas pela planta-mãe; nesse contexto, o ciclo de maturação de sementes recalcitrantes se encaixaria num período específico da maturação de sementes consideradas ortodoxas, podendo, portanto, ser comparáveis a ortodoxas imaturas (Barbedo *et al.* 2013, Newton *et al.* 2013, Verdier *et al.* 2013).

Com base nesse conceito, algumas características dependem do grau de maturação antes da dispersão e o teor de água poderia ser um indicador do quanto essas sementes avançaram nesse processo e consequentemente, quão recalcitrante ou ortodoxa esta semente pode ser, de acordo com o grau de maturação. Assim, um gradiente de comportamento deveria ser encontrado entre sementes de diferentes espécies (Barbedo *et al.* 2013). De acordo com esses autores, esforços devem se concentrar em estudos de maturação completa de sementes recalcitrantes ou em fase imatura nas consideradas ortodoxas.

Acredita-se que a baixa viabilidade de sementes de *Caesalpinia echinata* poderia estar relacionada ao grau de maturação no qual essas sementes são dispersas, e que apesar de ser classificada como ortodoxa, suas sementes apresentam características intermediárias dentro desse possível gradiente de recalcitrância. Para melhor compreensão desse possível gradiente, o presente trabalho foi concentrado em estudar sementes ortodoxas imaturas e maduras, procurando-se evidências de proximidade de comportamento fisiológico e metabólico de sementes de espécies taxonomicamente próximas em diferentes estádios de maturação.

*Libidibia ferrea* (pau-ferro) foi escolhida como modelo comparativo por ser taxonomicamente próxima de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), por ser tolerante à dessecção e por apresentar comportamento distinto durante o armazenamento. Sementes de *L. ferrea* são ortodoxas clássicas com dormência tegumentar, diferentemente de sementes de *C. echinata* que não tem dormência e apresentam dificuldades na manutenção da viabilidade no armazenamento em temperatura ambiente, como já enfatizado. Espera-se, dentro desta perspectiva, que sementes imaturas e maduras de *C. echinata* e *L. ferrea* encontrem-se dentro do gradiente de recalcitrância e ortodoxia, no qual sementes maduras de *C. echinata* sejam metabolicamente comparáveis a sementes ortodoxas imaturas de *L. ferrea*, apresentando comportamento intermediário entre as mais recalcitrantes e as mais ortodoxas.

Pelo exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento de sementes imaturas e maduras de *C. echinata* e *L. ferrea*, bem como avaliar a contribuição das alterações bioquímicas e fisiológicas nessas sementes no entendimento dos padrões de comportamento de sementes dentro do possível gradiente de recalcitrância e ortodoxia.

O comportamento das sementes de *C. echinata* e *L. ferrea* está apresentado nos capítulos 1 e 2, respectivamente. Um terceiro capítulo está apresentado incluindo a comparação dos resultados mostrados nos capítulos 1 e 2, com informações já disponíveis na literatura dessas espécies e de outras espécies da família Leguminosae que apresentam diferentes níveis de sensibilidade à dessecção, como *Inga vera* e *Erythrina speciosa* imaturas e maduras. A comparação de quatro

espécies em dois estádios de maturação pretende levantar dados relevantes para a compreensão do possível gradiente e sua relação com o potencial de armazenamento das espécies em estudo. Posteriormente, esses resultados poderão auxiliar no desenvolvimento de tecnologias que permitam o armazenamento a longo prazo de sementes em bancos de germoplasma, sendo fundamental para a formulação de estratégias sólidas para a conservação de espécies florestais nativas.

## Literatura Citada

- Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A.R., Fait.** 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science* 15:211–218.
- Bailly, C.** 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14, 93-107. doi:10.1079/SSR2004159
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., & Corbineau, F.** 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes rendus biologies*, 331(10), 806-814.
- Barbedo, C. J. & Marcos-Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botânica Brasílica* 12: 145- 164.
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Brazilian Journal of Botany* 25: 431–439.
- Barbedo, C.J., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40: 583-593.
- Barroso, G.M., Morim, M.P., Peixoto, A.L., Ichaso, C.L.F.** 1999. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. 443 p
- Baud, S., Boutin, J.P., Miquel, M., Lepiniec, L., Rochat, C.** 2002. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology Biochemistry* 40:151–160.
- Berjak, P., Vertucci, C.W. & Pammenter, N.W.** 1993. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. *Seed Science Research* 3(03), 155-166.
- Berjak, P. & Pammenter, N.W.** 2008. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Annals of Botany* 101(2), 213-228.
- Berjak, P. & Pammenter, N.W.** 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science*. 4, 478 1-9. doi: 10.3389/fpls.2013.00478
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., Nonogaki, H.** 2013. Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd ed. Springer, New York.
- Bonjovani, M.R.** 2011. Taxa respiratória em sementes recalcitrantes de *Inga vera* Wild. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington. Tese de Doutorado Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 130p.

- 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.
- Borisjuk, L. & Rolletschek, H.** 2008. The oxygen status of the developing seed. *New Phytologist* 182, 17-30. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02752.x
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Radchuk, R., Weschke, W., Wobus, U., Weber, H.** 2004. Seed development and differentiation: a role for metabolic regulation. *Plant Biology* 6, 375-86. doi:10.1055/s-2004-817908
- Botanic Gardens Conservation International.** 2001. Normas internacionais de conservação para jardins botânicos. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede Brasileira de jardins botânicos/Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC, Rio de Janeiro, 109p.
- Buitink, J. & Leprince, O.** 2004. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology* 48(3), 215-228.
- Buitink, J. & Leprince, O.** 2008. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C R Biol* 331:788–795
- Caccere, R., Teixeira, S.P., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Braga, M.R.** 2013. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. *Journal of Plant Physiology* 170, 791-800.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p.
- Chatelain, E., Hundertmark, M., Leprince, O., Le Gall, S., Satour, P., Deligny-Penninck, S., Rogniaux, H., Buitink, J.** 2012. Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. *Plant Cell Environtal* 35:1440–1455.
- Crepaldi, I.C., Santana, J.D. & Lima, P.B.** 1998. Quebra de dormência de sementes de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul.-Leguminosae, Caesalpinoideae). *Sitientibus* 18, 19-29.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Prestrelski, S.J., Hoekstra, F.A., De Araujo, P. & Panek, A.D.** 1997a. Anhydrobiosis: cellular adaptations to extreme dehydration. In *Handbook of Physiology*, Section 13, *Comparative Physiology*, Vol. II, (Dantzler, W.H., ed.). Oxford: Oxford University Press, pp. 1445–1477.
- Crowe, J.H., Oliver, A.E., Hoekstra, F.A. & Crowe, L.M.** 1997b. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: The role of vitrification. *Cryobiology* 35, 20–30.

- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2012. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. Brazilian Archives of Biology and Technology 55, 583-590.
- Delouche, J.C.** 1968. Precepts for seed storage. In: Proceedings Short Course For Seeds- Men.State College, Mississippi State University p.85-119.
- Dekkers, B.J., Costa, M.C.D., Maia, J., Bentsink, L., Ligterink, W., Hilhorst, H.W.M.** 2015. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. *Planta* 241:563–577.
- Enßlin, A., Sandner, T.M. & Matthies, D.** 2011. Consequences of *ex situ* cultivation of plants: genetic diversity, fitness and adaptation of the monocarpic *Cynoglossum officinale* L. in botanic gardens. *Biological Conservation* 144: 272-278
- Farrant, J.M.** 2007. Mechanisms of desiccation tolerance in angiosperm resurrection plants. *Plant Desiccation Tolerance* 51-90.
- Farrant, J.M., Pammerer, N.W. & Berjak, P.** 1992. Development of the recalcitrant (homoiohydrous) seeds of *Avicennia marina*: anatomical, ultrastructural and biochemical events associated with development from histodifferentiation to maturation. *Annals of Botany* 70(1), 75-86.
- Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A.R., Galili, G.** 2006. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology* 142, 839-854. doi:10.1104/pp.106.086694
- Ferreira, A.G. & Borghetti, F.** 2004. Interpretação de resultados de germinação. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 209-222.
- Foyer, C. & Noctor, G.** 2005. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866–1875.
- Godefroid, S., Piazza, C., Rossi, G., Buord, S., Stevens, A.D., Aguraiuja, R., Vanderborgh, T.** 2011. How successful are plant species reintroductions? *Biological Conservation* 144(2), 672-682.
- Hay, F. R., & Probert, R. J.** 2013. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research., *Conservation Physiology*, (1), cot030.
- Hell, A.F.** 2014. Alterações metabólicas em função de variáveis ambientais e sua contribuição para a tolerância à perda de água em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. Inst. Dissertação de Mestrado - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 97 p.
- Hell, A.F., Centeno, D.C., & Braga, M.R.** 2016. Comunicação pessoal: Caracterização do metabolismo primário durante o desenvolvimento de sementes de *Erythrina speciosa*. Trabalho de iniciação científica realizado no Instituto de Botânica e em fase de redação.

- Hellmann, M.E., Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Barbedo, C.J.** 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. *Brazilian Journal of Botany* 29, 93-101. [Freezing tolerance in seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) as influenced by the initial water content].
- Hendry, G.A.** 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans-a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New phytologist* 3-14.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J.** 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6, 431-438.
- Horbowicz, M., Brenae, P., Obendorf, R.L.** 1998. Fagopytrol B1, O-a-D-galactopyranosyl-(1®2)-D-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with dessication tolerance. *Planta* 205:1-11.
- Kermode, A. R., & Finch-Savage, B. E.** 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *Desiccation and survival in plants: Drying without dying*, 149-184.
- Kranner, I. & Birtić, S.** 2005. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology* 45(5), 734-740.
- Kranner, I., Roach, T., Beckett, R. P., Whitaker, C., & Minibayeva, F. V.** 2010. Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *Journal of plant physiology*, 167(10), 805-811.
- Kocsy, G.** 2015. Die or survive? Redox changes as seed viability markers. *Plant, cell & Environment* 38:1008–1010. DOI: 10.1111/pce.12515
- Khoury, W.E. & Makkouk, K.** 2010. Integrated plant disease management in developing countries. *Journal of Plant Pathology* S35-S42.
- Lamarca, E.V. & Barbedo, C.J.** 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. *Hoehnea* 39: 577-586.
- Leopold, A. C., Sun, W. Q., & Bernal-Lugo, I.** 1994. The glassy state in seeds: analysis and function. *Seed Science Research*, 4(03), 267-274.
- Lewis, G.P.** 1987. Legumes of Bahia. Royal Botanic Gardens Kew, Surrey.
- Lima, J.D., Almeida, C.C., Dantas, V.A.V., Silva, B.M., Moraes, W.S.** 2006. Efeito da temperatura e do substrato na germinação de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (*Leguminosae*, *Caesalpinoideae*). Revista Árvore 30:513-518.  
<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v30n4/31671.pdf>
- Lorenzi, H.** 1992. *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *leiostachya* Benth. In: Lorenzi, H. (Ed.). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum. p.147.

- Lorenzi, H.** 2000. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum.
- Maia, G.N.** 2004. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades, São Paulo: Leitura e Arte, 413p.
- McCouch, G.J., Baute, J., Bradeen, P., Bramel, P.K., Bretting, E., Buckler et al.** 2013. Feeding the future. *Nature* 499:23–24.
- Marcos Filho, J.** 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Abrates, Londrina 660p.
- Mai-Hong, T., Hong, T.D., Hien, N.T., Hai, H.H., Tung, T.D., Le-Tam, T., Ngoc-Tam, B., Ellis, R.H.** 2006. Seed development, maturation and storage behaviour of *Mimusops elengi* L. *New Forest* 32:9-19.
- McDonald, M.B.** 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and technology* 27(1), 177-237.
- Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Barbedo, C.J.** 2013. Sub-zero temperature enables storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. *Journal of Seed Science* 35, 519-523.
- Newton, R.J., Hay, F.R., Ellis, R.H.** 2013. Seed development and maturation in early spring-flowering *Galanthus nivalis* and *Narcissus pseudonarcissus* continues post-shedding with little evidence of maturation in planta. *Annals of Botany* 111, 945-55.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. & Shigeoka, S.** 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* 147: 1251-1263.
- Obendorf, R.L.** 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research*. 7:63-74.
- Pammerer, N.W., Naidoom S., Berjakm P., Nicolásm G., Bradford, K.J., Côme, D. & Pritchard, H.W.** 2003. Desiccation rate, desiccation response and damage accumulation: can desiccation sensitivity be quantified? In *The biology of seeds: recent research advances*. Proceedings of the Seventh International Workshop on Seeds, Salamanca, Spain, 2002. pp. 319-325.
- Pammerer, N.W., Berjak, P., Farrant, J.M., Smith, M.T. & Ross, G.** 1994. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? *Seed Science Research* 4(02), 187-191.
- Pammerer, N.W. & Berjak, P.** 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9, 13-37.
- Pennisi, E.** 2010. Armed and dangerous. *Science* 329, 1274
- Pérez, H.E., Hill, L.M. & Walters, C.** 2012. An analysis of embryo development in palm: interactions between fymatter accumulation and water relations in *Pritchardia remota* (Arecaceae). *Seed Science Research* 22: 97-111.
- Peterbauer, T. & Richter, A.** 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11:185-197.

- Popinigis, F.** 1977. Fisiologia da semente (No. QK661 P6).
- Queiroz, L.P.** 2010. New combinations in *Libidibia* (DC.) Schltdl. and *Poincianella* Britto & Rose (Leguminosae, Caesalpinoideae) Neodiversity 5: 11–12.
- Roach, T., Beckett, R.P., Minibayevam F.V., Colville, L., Whitaker, C., Chen, H., Bailly, C. & Kranner, I.** 2010. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds Plant, Cell and Environment 33, 59–75 doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02053.
- Roberts, E.H.** 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology 1: 499-514.
- Rocha, Y.T.** 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de Doutorado Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Silva, A. & Moraes, E.** 1986. Programa de produção e tecnologia de sementes florestais desenvolvido pelo Instituto Florestal do Estado de São Paulo. In: Simpósio Brasileiro Sobre Tecnologia De Sementes Florestais, 1. 1984, Belo Horizonte. Anais...Brasília: ABRATES. p.35-57.
- Smirnoff, N. & Cumbess, Q.J.** 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochemistry 37: 1057-1060.
- Steadman, K.J., Burgoon, M.S., Schuster, R.L., Lewis, B.A., Edwardson, S.E., Obendorf, R.L.** 2000. Fagopyritols, D-chiro-inositol and other soluble carbohydrates in buckwheat seed milling fractions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 2843-2847.
- Tunnacliffe, A.& Wise, M.J.** 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. Naturwissenschaften 94, 791–812.
- Usberti, R., Roberts, E.H., Ellis, R.H.** 2006. Prediction of cottonseed longevity. Pesquisa Agropecuária Brasileira 41:1435-1441.
- Verdier, J., Lalanne, D., Pelletier, S., Torres-Jerez, I., Righetti, K., Bandyopadhyay, K., Leprince, O., Chatelain, E., Vu, B.L., Gouzy, J., Gamas, P., Udvardi, M.K., Buitink, J.** 2013. A regulatory networkbased approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. Plant Physiology 163:757–774.
- Vigeolas, H., Van Dongen, J.T., Waldeck, P., Hühn, D., Geigenberger, P.** 2003. Lipid storage metabolism is limited by the prevailing low oxygen concentrations within developing seeds of oilseed rape. Plant Physiology 133, 2048-2060. doi:10.1104/pp.103.031963.

- Walters, C.** 2015a. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta* 242:397–406 DOI 10.1007/s00425-015-2312-6
- Walters, C.** 2015b. The modern seed bank: Promise, uncertainties and cross-cutting issues. *Anais: Seed for future generations-Determinants of Longevity*. Wernigerode, Germany. ISSS 150p. 3.
- Walters, C., Volk, G.M., Richards, C.M.** 2008. Genebanks in the post-genomic age: emerging roles and anticipated uses. *Biodiversity* 9: 68-71.
- Westengen, O.** 2015. The global back-up. *Anais: Seed for future generations-Determinants of Longevity*. Wernigerode, Germany. ISSS. 150p. 8.
- Zanon, A. & Ramos, A.** 1986. Armazenamento de sementes de espécies florestais. In: Simpósio Brasileiro sobre tecnologia de sementes florestais, 1., 1984. Belo Horizonte. Anais... Brasília: ABRATES, p.285-316.

## Capítulo 1

**Metabolismo de sementes de *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) em dois estádios de maturação**

## **Metabolismo de sementes de *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) em dois estádios de maturação**

ROSELI BETONI BRAGANTE<sup>1</sup>, DANILo DA CRUZ CENTENO<sup>2</sup>, CLAUDIO JOSÉ BARBEDO<sup>3</sup>; RITA DE CÁSSIA LEONE FIGUEIREDO-RIBEIRO<sup>3</sup>

1Estudante de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo -SP, Brasil, e-mail: roselibetoni@yahoo.com.br 2Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, Brasil. 3Instituto de Botânica, São Paulo -SP.

### **Introdução**

Durante o desenvolvimento, as sementes devem passar por três fases distintas: embriogênese, fase de síntese e acúmulo de compostos de reserva e, por último, a fase de desidratação, após o término do acúmulo de massa seca. A transição da segunda para a terceira fase normalmente coincide com a aquisição da tolerância à dessecação (Berjak & Pammerer 2000, Daws *et al.* 2004). Sementes são então classificadas quanto à sua capacidade de tolerância à dessecação. Dessa forma, as que resistem à secagem até teor de água abaixo de 10% e ao congelamento são classificadas como ortodoxas, e podem ser armazenadas por períodos prolongados. Sementes dispersas da planta mãe ainda úmidas, intolerantes à secagem abaixo de 20%, e que não suportam longos períodos de armazenamento são classificadas como recalcitrantes (Roberts 1973). Sementes dispersas com elevado teor de água mas que resistem à secagem até 12% de umidade, foram classificadas como intermediárias (Hong & Ellis 1996).

Sementes ortodoxas passam naturalmente pela fase de dessecação sendo dispersas com o máximo acúmulo de massa seca e redução do metabolismo, enquanto nas sementes recalcitrantes o peso seco continua aumentando até o momento da abscisão do fruto. Assim, a dispersão de sementes recalcitrantes ocorre antes que estas completem a segunda fase do desenvolvimento. Não há redução metabólica ou qualquer mudança clara entre as fases de desenvolvimento e germinação, sendo difícil determinar o momento no qual elas se desligam fisiologicamente da planta mãe. Logo a definição do momento ideal da coleta tem sido uma tarefa difícil para muitas espécies e requer investigação (Berjak & Pammerer 2013, Marcos Filho 2015).

Recentemente, alguns autores têm considerado a possibilidade de que as sementes não pertençam, de fato, a grupos distintos, considerando-se que haja um gradiente de tolerância à dessecação, formado pelo máximo de ortodoxia em um extremo e o máximo de recalcitrância em outro (Berjak & Pammeter 2000). Acredita-se que o estágio de desenvolvimento em que a semente se desliga da planta mãe define o quanto recalcitrante essa semente é (Barbedo *et al.* 2013). Definido esse ponto de desligamento, diferentes resultados podem ser observados, dependendo de quanto evoluiu a maturação, em conjunto com as condições ambientais e as características genéticas de cada espécie acumuladas durante o processo evolutivo (Barbedo *et al.* 2013). Além disso, este conceito de gradiente e/ou *continuum* engloba a grande variabilidade que ocorre não apenas entre, mas também dentro da mesma espécie, que pode ser diferente de acordo com o local de origem das sementes (Daws *et al.* 2004, 2006). As variações na sensibilidade à dessecação dependem da origem do material e podem estar relacionadas com as condições hídricas e térmicas do ambiente de formação, as quais condicionam o ciclo de maturação bem como a tolerância à dessecação (Pratavieira *et al.* 2015).

*Caesalpinia echinata* Lam., popularmente conhecida como pau-brasil, é uma espécie de floresta tropical e, neste bioma, estima-se que muitas espécies produzem sementes com comportamento recalcitrante ou intermediário, e via de regra, germinam imediatamente após serem dispersas, sem apresentar dormência (Rocha 2004). Apresentam ciclo de maturação relativamente curto, com cerca de 65 dias, quando comparado ao de outras espécies como *Libidibia ferrea* com 180 dias, e *Poincinella pluviosa* com 315 dias (Borges *et al.* 2005, Silva *et al.* 2014, Capítulo 2 deste trabalho), e portanto, exige muita atenção no momento da coleta para obtenção de sementes de alta qualidade fisiológica.

Vários fatores podem interferir na manutenção da viabilidade e conservação das sementes, principalmente a qualidade fisiológica inicial. A colheita precoce pode resultar em sementes imaturas, debaixo vigor. Assim, a manutenção da viabilidade dessas sementes pode ser prejudicada, devido a desenvolvimento incompleto do embrião e/ou da indisponibilidade de

reservas necessárias para a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas. Por outro lado, a colheita desemente depois do ponto dematuridade fisiológica também pode resultar em aceleração da deterioração (Mayer & Poljakoff-Mayber 1982, Barbedo *et al.* 2008, Carvalho & Nakagawa 2012).

A rápida redução do teor de água de sementes de *C. echinata* é, sem dúvida, o primeiro passo para a manutenção da sua viabilidade no armazenamento. No entanto, isoladamente a secagem não garante a conservação dessas sementes, sendo necessária a redução da temperatura de armazenamento (Barbedo *et al.* 2008). Todavia, sementes ortodoxas clássicas não exigem preocupação tão grande com a redução da temperatura. Teoricamente, o potencial de conservação das ortodoxas tem relação inversa com o teor de água das sementes e temperatura ambiente, dentro de amplos limites (Marcos Filho 2015). Dessa forma, sementes de *C. echinata* toleram redução do teor de água até 4% (Martini-Neto 2011) e em temperaturas negativas de armazenamento, -5 °C a -18 °C, é possível manter essas sementes viáveis por até 5 anos (Hellmann *et al.* 2006, Mello *et al.* 2013) devido à redução da atividade metabólica.

No entanto, se mantidas com elevado teor de água em temperaturas abaixo de zero as sementes de pau-brasil não sobrevivem, possivelmente por danos mecânicos ocasionados em suas membranas pela expansão da água em sua forma sólida (Hellmann *et al.* 2006). Dessa forma o teor de água das sementes no momento da coleta é fundamental para a conservação dessas.

Quando mantidas sob temperatura ambiente (*ca.* 25 °C), mesmo secas, não ultrapassam três meses de armazenamento, apresentando redução acentuada na capacidade germinativa e, praticamente, perdem a capacidade de produzir plântulas normais (Barbedo *et al.* 2002, Hellmann *et al.* 2006).

Acredita-se que os processos de deterioração que ocorrem em sementes de pau-brasil estão relacionados com a respiração e possivelmente com outros processos oxidativos. Um dos primeiros sinais de deterioração das sementes é o rápido aumento nas taxas respiratórias (Guimarães 1999). O aumento da temperatura de armazenamento pode incrementar esses efeitos, causando em curtos

períodos a morte de tecidos embrionários e a perda da viabilidade das sementes (Lamarca & Barbedo 2012). De acordo com esses autores os valores de consumo de oxigênio ( $O_2$ ) chegam a ser 50 vezes o valor da liberação gás carbônico ( $CO_2$ ) nessas sementes. Esses resultados demonstraram que os processos de deterioração que ocorrem nas sementes de *C. echinata* estão relacionados com a respiração e possivelmente com outros processos oxidativos, causando em curtos períodos a morte de tecidos embrionários e a perda da viabilidade das sementes.

O armazenamento e o controle da longevidade das sementes dependem basicamente de três fatores: água, temperatura e oxigênio (Groot *et al.* 2012). O aumento da atividade respiratória da semente pode ser avaliado pela quantidade  $CO_2$  liberado e pela quantidade de  $O_2$  consumido (Popinigis 1977, Castro 2011). A medição da atividade respiratória de sementes em condições de laboratório é uma técnica utilizada na determinação do vigor pela alta relação com a qualidade de sementes (Pereira 2013). Dessa forma, a taxa de respiração e o perfil metabólico vêm sendo utilizados como ferramentas no estudo do armazenamento e deterioração de sementes (Bonjovani 2011, Lamarca & Barbedo 2012, Caccere *et al.* 2013).

Sementes ortodoxas, ao final da maturação, apresentam baixa taxa de metabolismo e respiração, inferidos pelo decréscimo de compostos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (Marcos Filho 2015). Esta diminuição na respiração contribui para a prevenção de processos oxidativos na mitocôndria ocasionando maior longevidade (Pammenter & Berjak 1999). Em contraste, sementes recalcitrantes de *Inga vera* apresentam rápida e breve redução do metabolismo observada no início da maturação, porém sem desligamento metabólico (Caccere *et al.* 2013). A continuidade do metabolismo acelerado pode ser considerada fator determinante da sensibilidade de sementes recalcitrantes (Marcos Filho 2015).

As informações científicas existentes sobre *C. echinata* já permitem o desenvolvimento de tecnologia suficiente para a obtenção e preservação de lotes de elevada qualidade. Porém, muitos aspectos ainda precisam ser investigados. Dentre eles, inclui-se a ampliação do período favorável para coleta de sementes, uma vez que vários processos como a longevidade das sementes,

dependem da sua qualidade inicial. É necessário o desenvolvimento de tecnologias para armazenamento em temperatura ambiente, principalmente devido ao elevado custo de manutenção de câmaras frigoríficas e da necessidade de mão de obra qualificada (Barbedo *et al.* 2008).

Além da questão da conservação, considerando-se a existência de um gradiente contínuo entre sementes recalcitrantes e ortodoxas, é fundamental ampliar o conhecimento sobre o comportamento de sementes imaturas de uma espécie bem estudada como *C. echinata*, visando ao levantamento de informações que auxiliem o entendimento desse processo. Assim, o presente estudo teve por objetivo a avaliação das alterações fisiológicas e metabólicas de sementes de *Caesalpinia echinata* em dois estádios de maturação, a fim de compreender o comportamento dessas dentro do possível gradiente de recalcitrância e ortodoxia.

## **Material e Métodos**

### **Material vegetal**

Frutos de *Caesalpinia echinata* Lam. foram coletados em bosque já estabelecido no Parque Brasil 500 (22°47'9"S 47°9'42"W) localizado em Paulínia-SP, em cerca de 80 matrizes em outubro e novembro de 2014 (Figura 1). Os frutos foram colhidos diretamente de árvores, seguindo os aspectos do estádio de maturidade desejado conforme definido por Borges *et al.*(2005). As sementes foram extraídas pela abertura manual dos frutos e beneficiadas eliminando-se as que estavam fora do padrão de qualidade, incluindo sinais de danos por insetos ou fungos. Em seguida foram classificadas em imaturas (sementes de cor verde com manchas púrpuras) e maduras (sementes de cor acastanhada - pouco antes da dispersão) (Borges *et al.*2005).



Figura 1. A. Exemplar adulto de *Caesalpinia echinata* no parque Brasil 500 em Paulínia-SP indicando com detalhes, B. bosque, C. inflorescência, D. frutos imaturos e maduros e E. sementes imaturas e maduras. Escala 1cm.

Após a caracterização dos grupos imaturos e maduros, as sementes foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C, até atingirem teores de água de aproximadamente 10% (Barbedo *et al.* 2002).

Em seguida, sementes imaturas e maduras foram separadas em frescas e secas e realizada uma caracterização inicial, para saber o efeito da secagem nessas sementes - esses resultados foram denominados "controle com e sem secagem". As sementes secas foram armazenadas durante 1, 2, 6 e 12 meses sob as temperaturas de -18 °C e 25 °C, em dois regimes de luz, constituído por luz e escuro contínuos (luz contínua- Gerbox® transparente permitindo a passagem de luz da BOD e escuro contínuo- Gerbox® preto não permitindo a passagem de luz). No controle e após cada período de armazenamento, as sementes foram avaliadas quanto ao teor de água, massa seca,

potencial hídrico, porcentagem de germinação, plântulas normais, respiração e perfil metabólico conforme descrito abaixo.

### **Análises físicas e fisiológicas**

*Determinação do teor de água, matéria seca e potencial hídrico das sementes:* Após extração e beneficiamento as sementes foram imediatamente caracterizadas quanto ao teor de água, potencial hídrico, massa seca e germinação. O conteúdo de água, apresentado em porcentagem de base úmida Brasil (2009) e a massa seca das sementes ( $\text{g.semente}^{-1}$ ) de todos os estádios foram determinados por gravimetria em estufa a  $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 17 h , de acordo com a ISTA (2015), utilizando-se três repetições de cinco sementes cada.

O potencial hídrico das sementes foi medido utilizando-se três repetições de cinco sementes cada, cortadas ao meio e com tegumento. A aferição foi realizada em equipamento Decagon WP4 (USA) com base na temperatura do ponto de orvalho (Decagon Devices, 2001) (Delgado 2006).

*Testes de Germinação:* As sementes foram submetidas a testes de germinação e análise da produção de plântulas normais em rolos de papel Germitest (Brasil, 2009), com três repetições de 20 sementes cada. Os testes de germinação foram realizados em sala de germinação com temperatura controlada a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ , e 90% ( $\pm 5\%$ ) de umidade relativa e luz contínua como recomendado por Mello & Barbedo (2007). As sementes foram avaliadas a cada 2 dias até 20 dias, registrando-se a porcentagem de sementes germinadas (protrusão de pelo menos 5 mm de raiz primária), desenvolvimento de plântulas normais (plântulas com pelo menos 1 par de folhas e sem malformações visuais). As sementes que não foram classificadas como germinadas estavam com extravazamento do conteúdo celular, sendo consideradas como deterioradas e mortas.

### **Teste de Tetrazólio**

A qualidade fisiológica das sementes no momento da coleta e após a secagem foi analisada pelo teste de tetrazólio, segundo a metodologia descrita por Lamarca *et al.*(2009). Amostras com 3 repetições de 5 sementes de cada tratamento foram pré-condicionadas em água por 2 horas a  $25^{\circ}\text{C}$

em papel Germitest. A seguir foram removidos os tegumentos, os cotilédones foram separados manualmente no sentido longitudinal, para expor o eixo embrionário e incubados em solução de cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio a 0,05% por 2 h a 35 °C, na ausência de luz (gerbox preto envolvido por papel alumínio). Em seguida as sementes foram lavadas em água corrente, avaliadas e classificadas de acordo com categorias de coloração rosa suave representando tecido saudável, vermelho intenso representando tecidos em deterioração e cor natural do tecido para tecidos mortos (Delouche *et al.* 1976, França Neto *et al.* 1998) considerando-se 8 classes de deterioração (Lamarca *et al.* 2009).

#### **Taxas respiratórias (consumo de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub>)**

O consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>) e a produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) foram determinados em analisador modelo 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsburg, EUA), utilizando-se três repetições de dez sementes cada, seguindo metodologia descrita por Lamarca & Barbedo (2012).

As taxas respiratórias das sementes foram estimadas em frascos de vidro (600 ml) hermeticamente fechados, com tampas perfuradas, formando orifícios que foram recobertos por um septo de borracha, por este septo foram inseridos os eletrodos do equipamento por onde foi tomada a amostra do ar da embalagem. O fechamento das embalagens foi determinado como sendo o início do experimento, o tempo zero correspondendo a atmosfera normal (21% de oxigênio e 0,03% de dióxido de carbono). O consumo de O<sub>2</sub> e a produção de CO<sub>2</sub> pelas sementes embaladas foram estimados pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal. Após cada medida, as embalagens eram abertas por alguns minutos para reequilíbrio com a atmosfera normal sendo, em seguida, novamente fechadas para a continuidade do experimento. Considerando a pressão atmosférica local como 0,90 atm os valores obtidos em porcentagem de volume de O<sub>2</sub> ou de CO<sub>2</sub> foram convertidos para pressão parcial do gás, segundo a fórmula  $p1/P = v1\% / V\%$  (Feltre, 1982), onde:

$p1$  = pressão parcial do gás (em atm);

P = pressão atmosférica local (=0,90 atm);

v1% = volume do gás, em porcentagem;

V% = volume total (=100%).

A seguir, baseando-se no volume das embalagens (volume do frasco - volume das sementes) e na temperatura registrada em cada avaliação, os valores foram convertidos para  $\mu\text{mol}$  de  $\text{O}_2$  e de  $\text{CO}_2$ , pela equação de Clapeyron,  $pV=nRT$ , onde:

p=pressão parcial do gás (em atm)

V = volume total de ar do frasco (em L)

n = número de moles do gás

R = constante universal dos gases perfeitos ( $0,082 \text{ atm L mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

T = temperatura (em Kelvin)

Os valores obtidos nas avaliações foram somados e divididos pela massa seca total da amostra de sementes e pelo número de dias em que as sementes permaneceram nas embalagens (7, 15 e 30 dias), obtendo-se o valor expresso em micromol por grama de massa seca por dia ( $\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ).

Também foi calculada a diferença entre o consumo de  $\text{O}_2$  e de emissão de  $\text{CO}_2$ , para a estimativa do  $\text{O}_2$  consumido e não envolvido na respiração aeróbica (aqui chamado de  $\text{O}_2$  não respiratório -  $\text{NRO}_2$ ), a fim de estimar se outras possíveis reações oxidativas poderiam estar envolvidas na deterioração das sementes.

## Análise metabolômica

Amostras de sementes de cada estádio (20 mg em seis repetições de 10 sementes) foram extraídas em 500  $\mu\text{l}$  da solução metanol: clorofórmio: água (12:5:1- v/v) e 50  $\mu\text{l}$  de adonitol (0,2 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), adicionado como padrão interno para quantificação. A mistura foi agitada e incubada num banho seco ( $60^\circ\text{C}$ , 30 min), centrifugada (13000 g, 2 min) e 350  $\mu\text{L}$  do sobrenadante transferido para um outro frasco, onde também foi adicionado o mesmo volume de água. A centrifugação foi repetida depois de incubação à temperatura ambiente durante 5 min, e 300  $\mu\text{L}$  da

fase superior separada e completamente seca. O resíduo seco foi re-dissolvido em 200  $\mu\text{L}$  de piridina e derivatizado com 50  $\mu\text{L}$  de BSTFA (N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) num banho seco ( $75^\circ\text{C}$ , 60 min), de acordo com Sugiyama *et al.* (2014). Finalmente, as amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC Agilent 6890, MSD 5973N). Cromatografia gasosa foi realizada utilizando uma coluna MS HP-5ms (30m x 0,25m x 0,23 $\mu\text{m}$  - Supelco, EUA). A temperatura de injeção foi ajustada para  $230^\circ\text{C}$ , a interface em  $250^\circ\text{C}$ , e a fonte de íons ajustada em  $150^\circ\text{C}$ . O gás hélio foi utilizado como carreador com fluxo de  $1\text{ mL min}^{-1}$ . As análises foram realizadas de acordo com a seguinte programação: 5 minutos de aquecimento isotérmico a  $70^\circ\text{C}$ , seguido por uma taxa de elevação da temperatura do forno de  $5^\circ\text{C min}^{-1}$  até  $310^\circ\text{C}$ , e um 1 min final de aquecimento a  $310^\circ\text{C}$ . Os espectros de massas foram registados a  $2\text{ varreduras.s}^{-1}$  com uma faixa de massas de 50-600  $m/z$ . Os cromatogramas e dados de espectrometria de massas foram avaliados utilizando o programa Chemstation (Agilent Technologies, EUA). Os picos foram identificados e comparados com padrões autênticos, com a NIST 08 Mass Spectral Library (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia) e com o Banco de Dados Golm Metabolome Database- GMD (Hummel *et al.* 2010). Os dados metabólicos foram relatados aqui como conteúdo relativo de metabolitos como é comumente utilizado em estudos de perfil metabólico para facilitar a interpretação de grandes conjuntos de dados.

### **Obtenção dos dados climáticos**

A caracterização climatológica (temperaturas máxima e mínima – mensal e precipitação-mensal) foi obtida através de dados das estações meteorológicas do Instituto Agronômico de Campinas (CIIAGRO), Campinas- SP, e do Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo, São Paulo- SP.

### **Delineamento experimental e análise estatística dos dados**

A caracterização inicial (controle sem e com secagem) foi realizada em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (estádio x secagem). O experimento de armazenamento, apenas com sementes secas, foi realizado em esquema fatorial 2 x

2 x 4 (temperatura x condição de luz x armazenamento) dentro de cada estádio, com três repetições para todas as avaliações. Os resultados foram submetidos à análise de variância sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Santana & Ranal 2004).

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando-se o software PAST (Hammer *et al.* 2001), sendo incluídos na análise apenas os compostos presentes em todos os tratamentos.

## Resultados

A floração de *C. echinata* ocorreu entre o final do inverno e começo da primavera, sendo os frutos dispersos nesta mesma estação no mês de novembro (Figura 2). De acordo com Borges *et al.* (2005) a deiscência natural dos frutos ocorre próximo aos 55 DAA sendo associada a condições ambientais, principalmente a redução da precipitação, da umidade relativa e da temperatura mínima. No entanto, as sementes maduras do presente trabalho não foram dispersas, mas sim coletadas ainda na planta mãe em novembro, período no qual deveriam estar maduras.

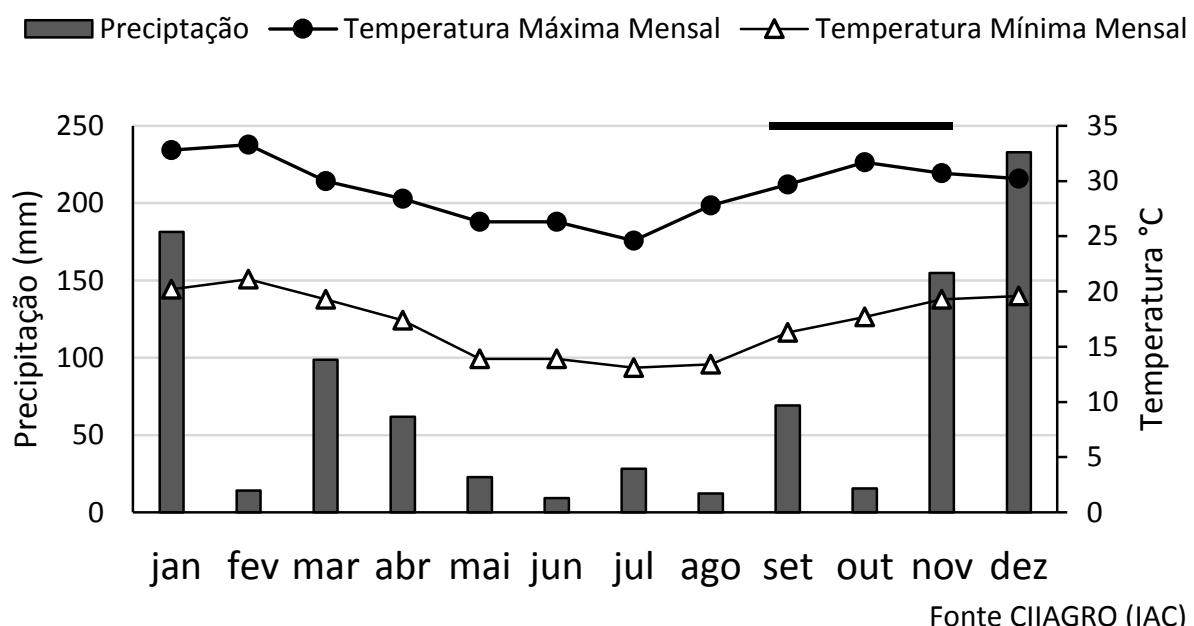


Figura 2. Dados meteorológicos da região de Campinas-SP no ano de 2014. Dados médios mensais de: temperatura máxima (círculo fechado), temperatura mínima (triângulo aberto), precipitação (colunas) e período compreendido entre a floração e a coleta dos frutos (barra preta transversal).

O grupo de sementes imaturas foi constituído por sementes com teores de água de 44 a 55% e o grupo de sementes maduras por sementes com teor de água variando de 23 a 36%. As sementes imaturas foram secas até 7,9% e as maduras até 8% de teor de água.

Os valores de germinação e plântula normal antes e depois da secagem diferiram significativamente (Figura 3). Com a secagem a germinação foi reduzida em 11% nas sementes imaturas e 33% nas maduras. A porcentagem de plântulas normais foi reduzida em 10% nas imaturas e 22% nas maduras (Figura 3).

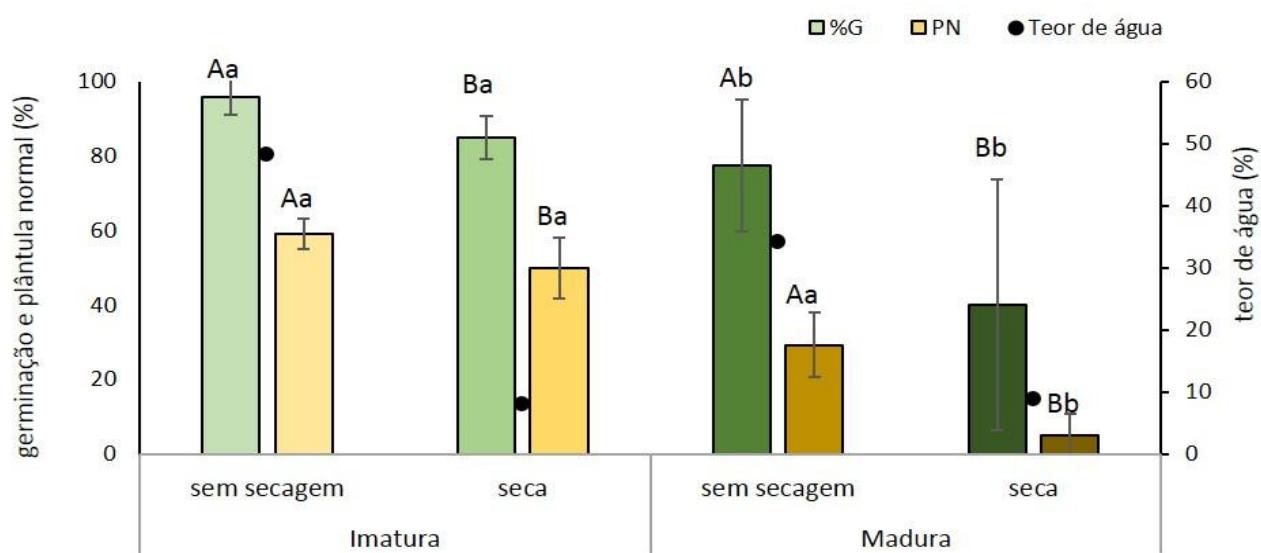


Figura 3. Caracterização fisiológica (teor de água, porcentagem de germinação e plântulas normais) antes do armazenamento de sementes imaturas e maduras de *Caesalpinia echinata* sem e com secagem. Círculos pretos representam teor de água. Colunas verdes representam a porcentagem de germinação de: sementes imaturas sem secagem (■), imaturas com secagem (■), sementes maduras sem secagem (■) e maduras com secagem (■). Colunas amarelas representam a porcentagem de plântulas normais de: sementes imaturas sem secagem (■), imaturas com secagem (■), sementes maduras sem secagem (■) e maduras com secagem (■). Letras maiúsculas comparam as médias de secagem dentro de cada estádio e letras minúsculas comparam média de secagem entre estádio.

A Figura 4a mostra que no primeiro mês de armazenamento não houve diferenças significativas na porcentagem de germinação e plântulas normais e entre tratamentos de temperatura e luminosidade para cada estádio; houve diferença apenas entre os estádios, sendo que os valores de germinação das imaturas foram maiores que das maduras (Figura 4a).

No entanto, não houve aumento de plântulas anormais, mas sim de plântulas mortas (dados mostrados pela diferença entre plântulas normais e anormais). A quantidade de sementes maduras mortas ou deterioradas aumentou a partir do sexto mês de armazenamento principalmente a 25°C, perdendo completamente a viabilidade após um ano de armazenamento (Figura 4c, d).

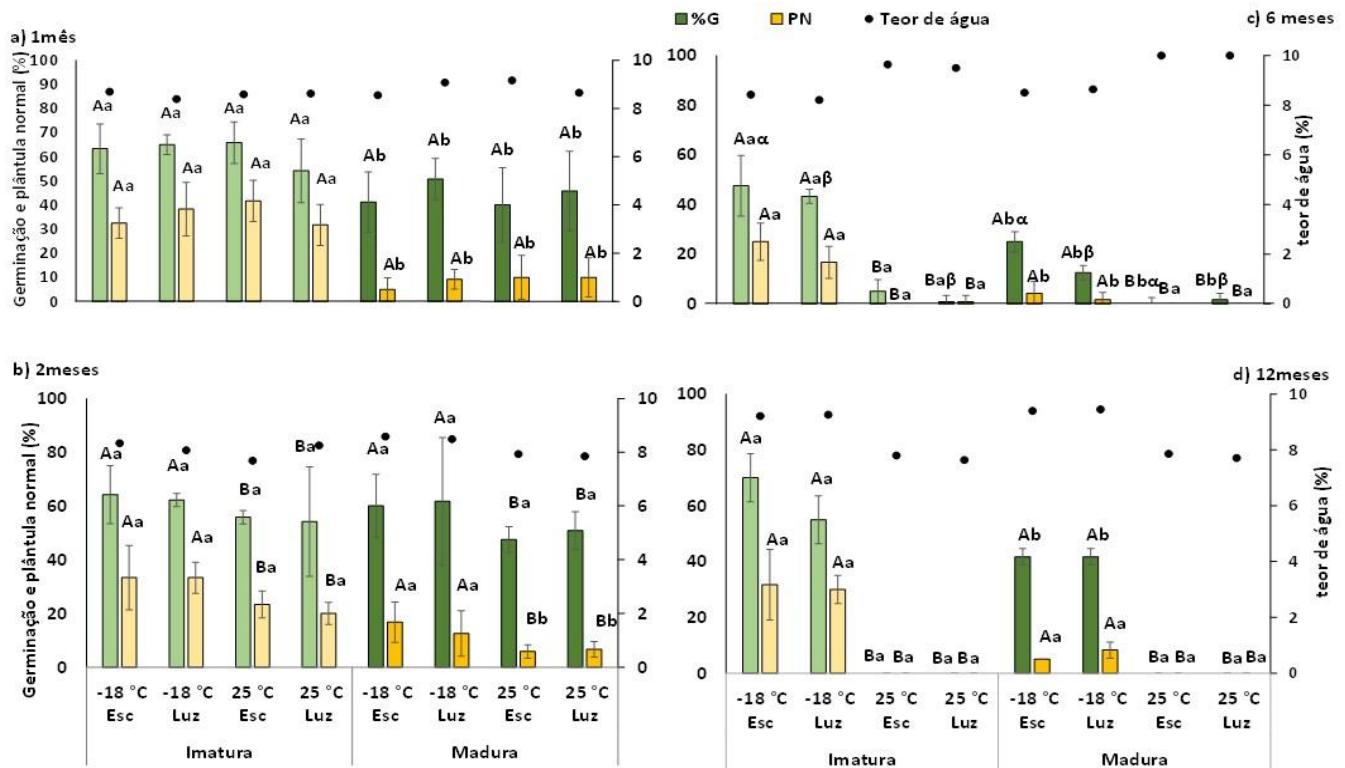


Figura 4. Caracterização fisiológica (teor de água, porcentagem de germinação e plântulas normais) de sementes imaturas e maduras secas armazenadas por a) 1 mês, b) 2 meses, c) 6 meses e d) 12 meses a -18 °C e 25 °C na luz e escuro (médias e desvios-padrão). Círculos pretos representam teor de água (●). Colunas na cor verde representam porcentagem de germinação de sementes imaturas (◻) e sementes maduras (■). Colunas na cor amarelo representam porcentagem de plântulas normais de sementes imaturas (◻) e maduras (◻). Letras maiúsculas compararam as médias das temperaturas dentro de cada estádio, letras minúsculas compararam médias de estádio dentro de temperatura, letras gregas compararam luz e escuro dentro da temperatura.

No entanto, a partir do segundo mês, independente da condição de luz, a temperatura de 25 °C passou a ser prejudicial para sementes imaturas e maduras, tanto na porcentagem de germinação quanto na de plântulas normais (Figura 4b). O sexto mês de armazenamento a 25 °C foi praticamente letal para sementes dos dois estádios de maturação, sendo a germinação das sementes imaturas significativamente menor na presença de luz (Figura 4c).

Após um ano de armazenamento a -18 °C sementes imaturas e maduras mantiveram-se viáveis (Figura 4d). No entanto, sementes imaturas, apesar de apresentarem maiores valores de

porcentagem de germinação do que as maduras, tiveram redução de 17% no escuro e 35% na luz, enquanto sementes maduras reduziram apenas 2% em relação ao controle antes do armazenamento. Entretanto, houve perda completa da viabilidade de sementes, imaturas e maduras armazenadas a 25 °C (Figura 4d).

Os testes de tetrazólio indicaram que as sementes maduras apresentaram sinais de deterioração mesmo antes da secagem, visualizado pelas manchas vermelhas (Figura 5c), danos esses incrementados após a secagem (Figura 5d).



Figura 5. Sementes imaturas e maduras de *Caesalpinia echinata* sem armazenamento com e sem secagem submetidas ao teste de tetrazólio 0,05% por 2 h a 35 °C. A. imatura sem secagem, B. imatura seca, C. madura sem secagem e D. madura seca. Escala 1 cm.

A primeira modificação visual das sementes de *C. echinata* armazenadas em diferentes temperaturas foi a coloração do tegumento (Figura 6). Após um ano, sementes armazenadas a -18 °C permaneceram com as mesmas características visuais iniciais observadas no controle (Figura 6a), ou seja, pardas com manchas púrpureas bem definidas, enquanto as armazenadas a 25 °C apresentaram tegumento escurecido (Figura 6d e 6e), não se identificando mais as manchas púrpuras iniciais.



Figura 6. Coloração do tegumento de sementes imaturas e maduras de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) antes e após armazenamento de 12 meses. A. sementes imaturas antes do armazenamento; B-E. sementes imaturas após 12 meses armazenadas a -18 °C na luz (B), -18 °C no escuro (C), 25 °C na luz (D), 25 °C no escuro (E). F. sementes maduras antes do armazenamento;

G-J. sementes maduras após 12 meses armazenadas a -18 °C na luz (G), -18 °C no escuro (H), 25 °C na luz (I), 25 °C no escuro (J). Barra = 1 cm.

Essa alteração ocorreu em todas as sementes armazenadas a 25°C, independentemente do estádio de desenvolvimento ou condição de luz (Figuras 6 d, e, i, j). Essas sementes foram então submetidas ao teste de tetrazólio, apresentando perda completa de viabilidade (dados não mostrados), confirmando os resultados obtidos nos testes de germinação.

As taxas de consumo de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub> foram mais altas em sementes imaturas do que em sementes maduras de *C. echinata* antes da secagem. Sementes imaturas consumiram cerca de 94 µmol O<sub>2</sub> g MS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e liberaram 54 µmol de CO<sub>2</sub> g MS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, enquanto as maduras consumiram 53 µmol de O<sub>2</sub> e 10 µmol de CO<sub>2</sub> (Figura 7), no entanto, nos dois estádios de maturação, as taxas respiratórias foram maiores antes da secagem.

Depois da secagem e armazenamento as taxas de consumo de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub> reduziram significativamente para cerca de 5 µmol.gMS<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub> e 2 µmol.gMS<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>, embora o consumo de oxigênio continuou sendo maior do que liberação de gás carbônico (Figuras 7 e 8).

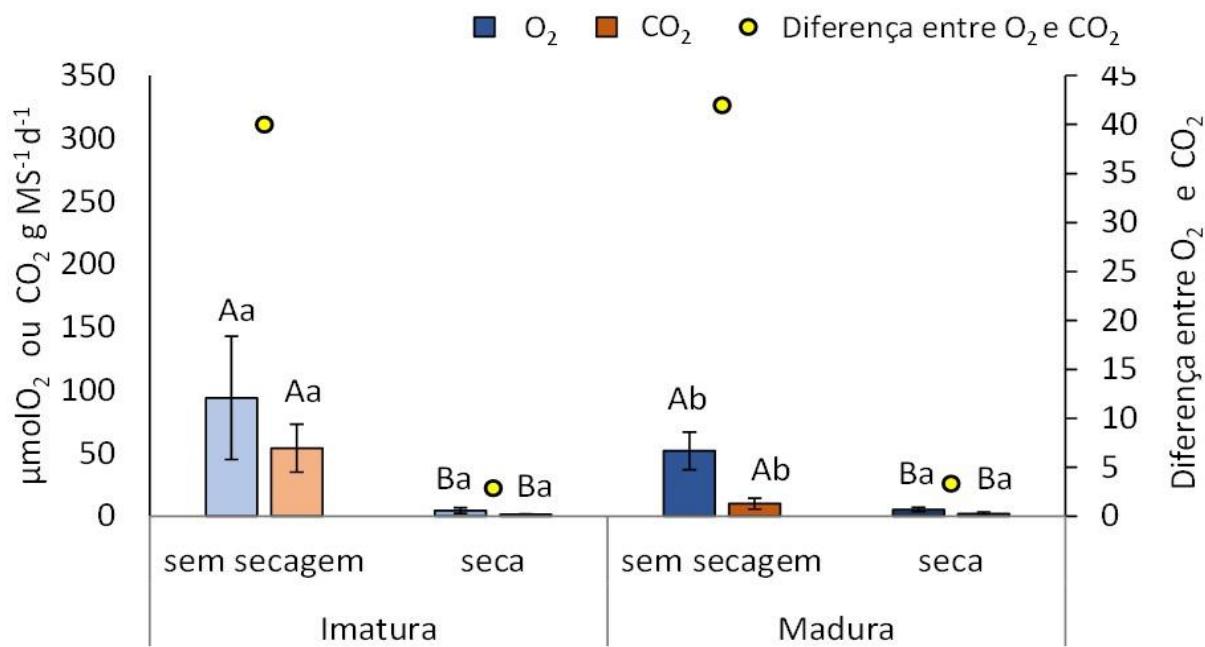


Figura 7. Consumo de O<sub>2</sub> (μmol.gMS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), liberação de CO<sub>2</sub> (μmol.gMS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) e diferença entre O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> de sementes imaturas e maduras de *Caesalpinia echinata* sem e com secagem antes do armazenamento. Círculos na cor amarela representam diferença entre O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (●). Colunas na cor azul representam os valores de O<sub>2</sub> de: sementes imaturas sem secagem (□), sementes imaturas secas (□), sementes maduras sem secagem (■), sementes maduras secas (■). Colunas na cor laranja representam os valores de CO<sub>2</sub> de: sementes imaturas sem secagem (□), sementes imaturas secas (□), sementes maduras sem secagem (■), sementes maduras secas (■). Letras maiúsculas comparam médias de secagem dentro de cada estádio e letras minúsculas comparam médias de cada estádio dentro de secagem. Valores (médias e desvios padrões).

De maneira geral, essas diferenças permaneceram ao longo dos tratamentos de armazenamento, no entanto em escalas bem menores quando comparadas ao controle sem secagem (Figura 8). Após o 1º mês de armazenamento o consumo de oxigênio aparece numericamente maior a -18º C e menor a 25º C (Figura 8a) e aos seis meses houve diferença significativa para o consumo de O<sub>2</sub> nas sementes imaturas e maduras armazenadas a -18 ° C (Figura 8c).

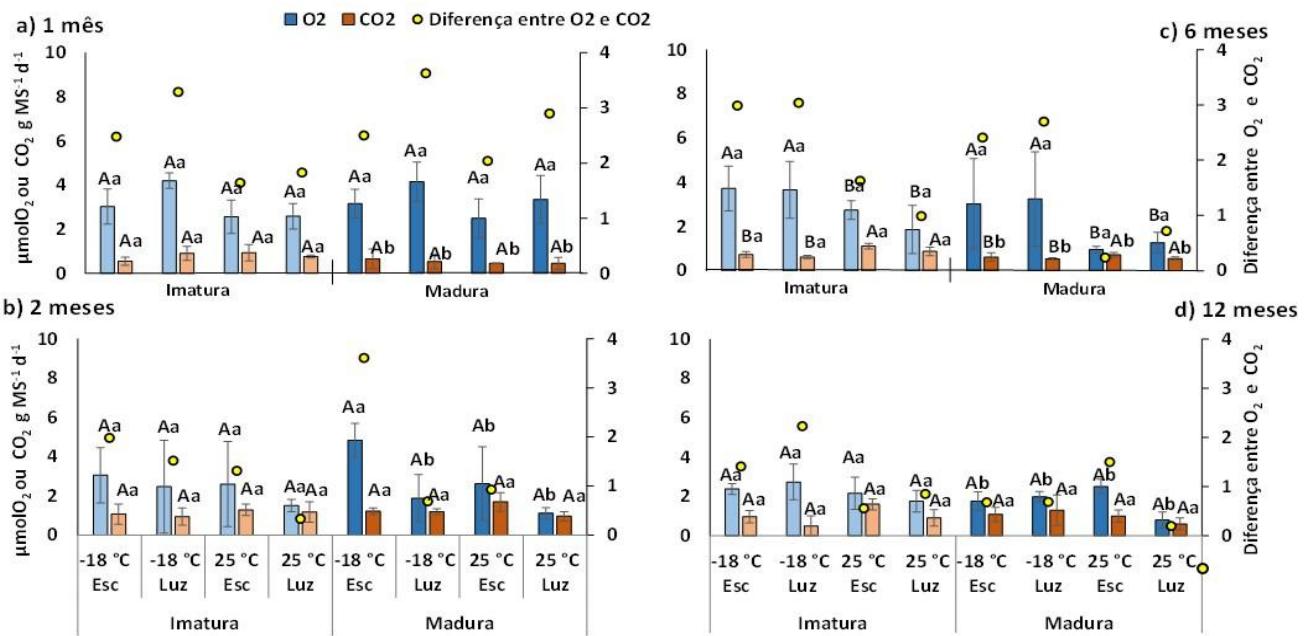


Figura 8. Consumo de O<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol.gMS}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), liberação de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol.gMS}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e diferença entre O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> de sementes imaturas e maduras de *Caesalpinia echinata* secas armazenadas a -18 °C e 25 °C no escuro e na luz por a) 1 mês, b) 2 meses, c) 6 meses e d) 12 meses. Círculos na cor amarela representam diferença entre O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (●). Colunas na cor azul representam os valores de O<sub>2</sub> de sementes imaturas (■) e sementes maduras (■■). Colunas na cor laranja representam os valores de CO<sub>2</sub> de sementes imaturas (□) e sementes maduras (□□). Letras maiúsculas comparam as médias das temperaturas dentro de cada estádio, letras minúsculas comparam médias de estádio dentro de temperatura.

As alterações na proporção dos metabólitos foram visualizadas quanto ao metabolismo primário, por meio da quantificação de ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares (incluindo açúcares álcoois). Alguns dos compostos encontrados nos eixos embrionários não foram detectados nos cotilédones, como os ácidos succínico, ascórbico e malônico bem como os aminoácidos fenilalanina e asparagina (Figuras 9 e 10). De maneira geral, a proporção dos compostos encontrados no eixo embrionário de sementes de *C. echinata* diminuiu ou não se modificou ao longo da maturação (Figura 9).

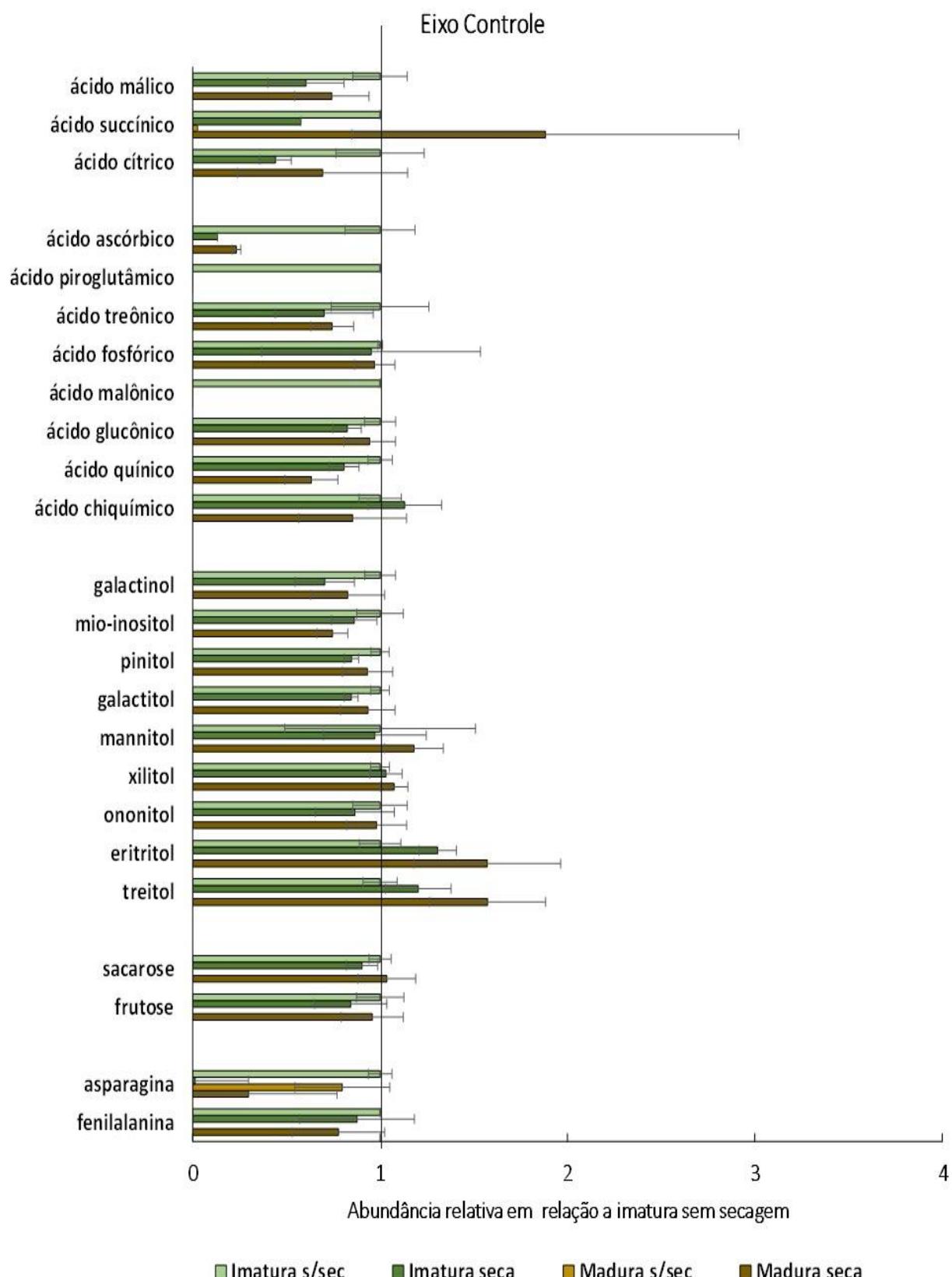


Figura 9. Perfil metabólico de eixos imaturos sem secagem (■) e secos até 8% de teor de água (□) e maduros sem secagem (■) e secos (□) de sementes *Caesalpinia echinata*. Os compostos foram detectados por CG / EM. Todos os valores foram normalizados a partir dos encontrados em imatura sem secagem.

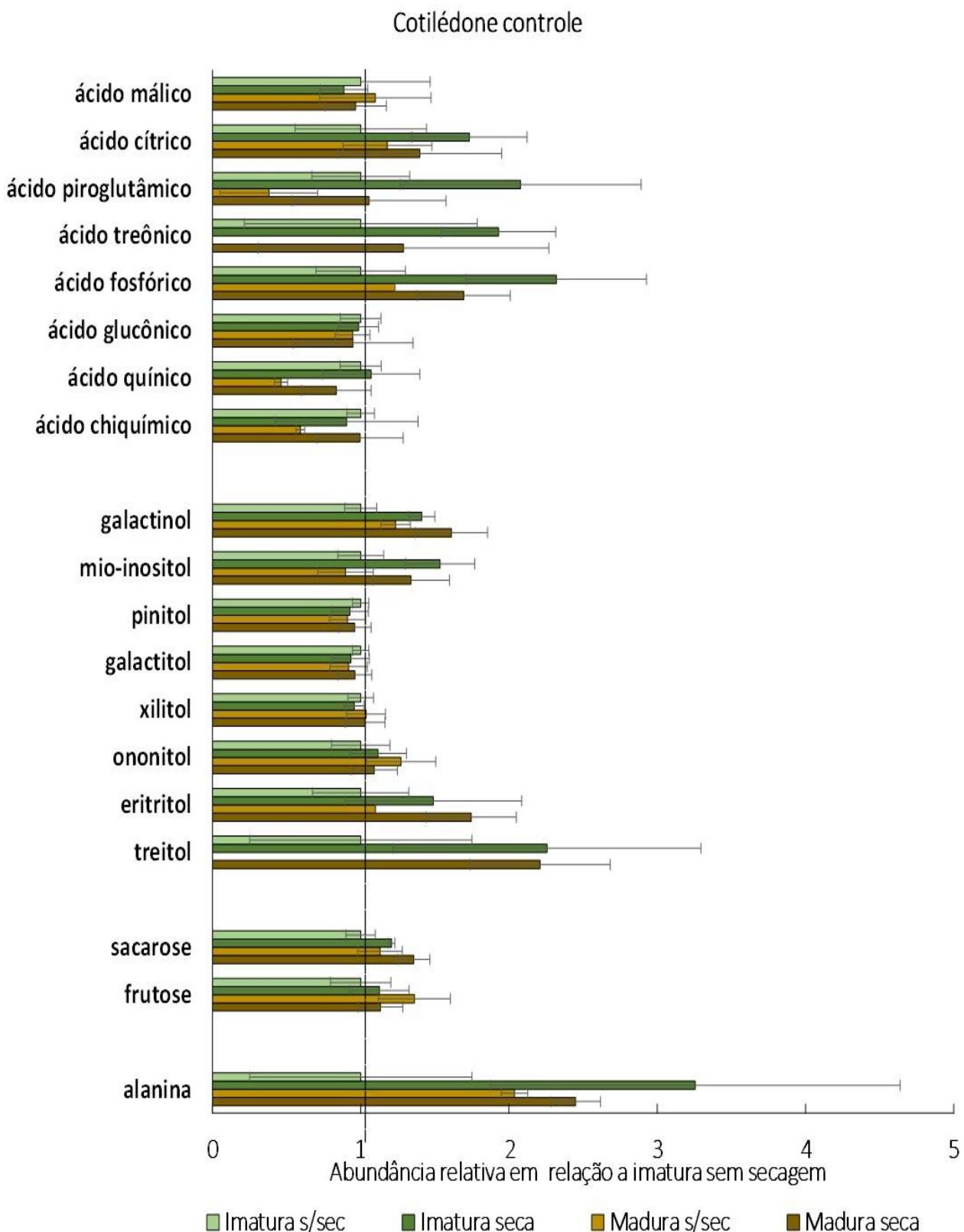


Figura 10. Perfil metabólico de cotilédones imaturos sem secagem (■) e secos até 8% de teor de água (■) e maduros sem secagem (■) e secos (■) de sementes *Caesalpinia echinata*. Os compostos foram detectados por CG / EM. Todos os valores foram normalizados a partir dos encontrados em imatura sem secagem.

Com exceção de ácido succínico, intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico e, dos polióis eritritol, treitol e manitol que aumentaram proporcionalmente com a maturação e secagem, o galactinol e os ácidos ascórbico, quínico, málico e cítrico diminuíram com a maturação. Açúcares alcoois e aminoácidos pouco se alteraram, porém as variações encontram-se dentro dos desvios. Ácido ascórbico apresentou redução nas suas proporções ao longo da maturação, porém só foi observado no eixo embrionário (Figura 9).

Nos cotilédones (Figura 10) alguns compostos aumentaram com a secagem das sementes imaturas e maduras, tais como os ácidos cítrico, piroglutâmico, fosfórico, aminoácido alanina e os açúcares alcoois eritritol, treitol, galactinol e *myo*-inositol. Não houve um padrão uniforme de alteração nos compostos dos cotilédones das sementes imaturas e maduras antes do armazenamento, mas alguns deles responderam mais à secagem do que à maturação, com poucas variações (Figura 10).

Após 1 mês de armazenamento, já foram observadas mudanças no padrão dos compostos em sementes imaturas, principalmente nos eixos (Figura 11). Considerando que a linha tracejada corresponde aos dados observados em eixos imaturos antes do armazenamento, houve aumento nas proporções de todos os compostos, em geral maior a 25 °C, com exceção de ácido ascórbico que não foi observado nessa temperatura, mas a -18 °C. Os compostos que mais aumentaram foram manitol, galactose, ácidos chiquímico e cítrico, principalmente a 25 °C no escuro. Também ocorreu aumento dos compostos nos eixos de sementes maduras (Figura 12) em relação ao controle sem armazenamento, mas não ocorreram mudanças marcantes como observado nos eixos imaturos.

No entanto, houve uma tendência de redução na proporção dos compostos a 25 °C e aumento a -18 °C como observado para ácido cítrico, málico, succínico, chiquímico e quínico; galactose, frutose, glicose metil-inositol e fenilalanina foram observados em maiores proporções a -18 °C do que a 25 °C.

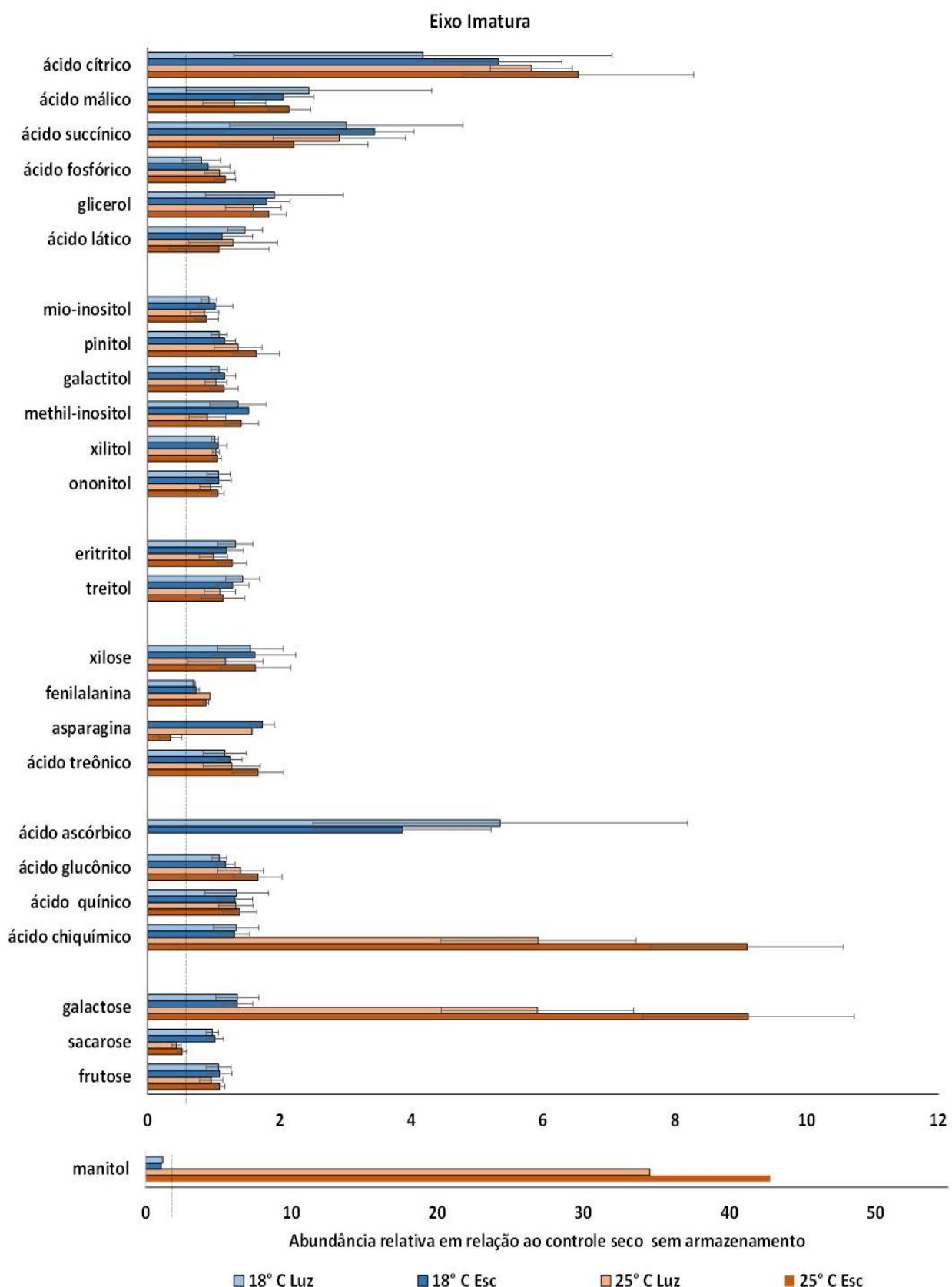


Figura 11. Perfil metabólico de eixos embrionários imaturos de *Caesalpinia echinata* armazenadas por 1 mês a -18 °C na luz (□) e escuro (■) e a 25 °C na luz (□) e no escuro (■). Os compostos foram detectados por CG / EM. Todos os valores foram normalizados a partir dos encontrados no eixo controle de sementes imaturas secas antes do armazenamento (tracejado).

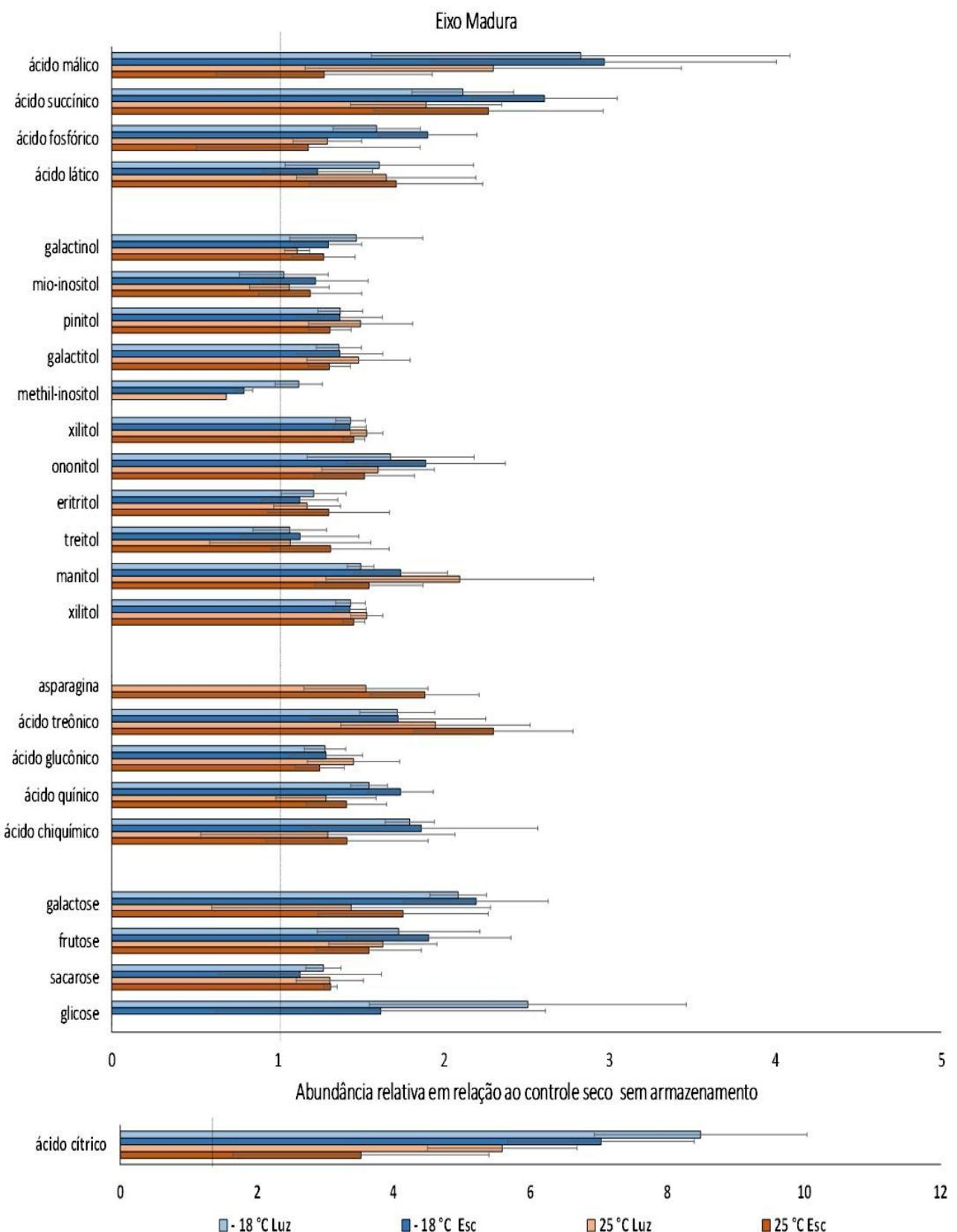


Figura 12. Perfil metabólico de eixos embrionários maduros de *Caesalpinia echinata* armazenadas por 1 mês a -18 °C na luz (□) e escuro (■) e a 25 °C na luz (□) e no escuro (■). Os compostos foram detectados por CG / EM. Todos os valores foram normalizados a partir dos encontrados no eixo controle de sementes maduras secas antes do armazenamento (tracejado).

Nos cotilédones, os perfis metabólicos parecem manter os padrões de comportamento dentro de cada estádio. Assim como nos eixos, os compostos nos cotilédones de imaturas foram observados em maiores proporções a 25 °C em relação ao controle (Figura 13).

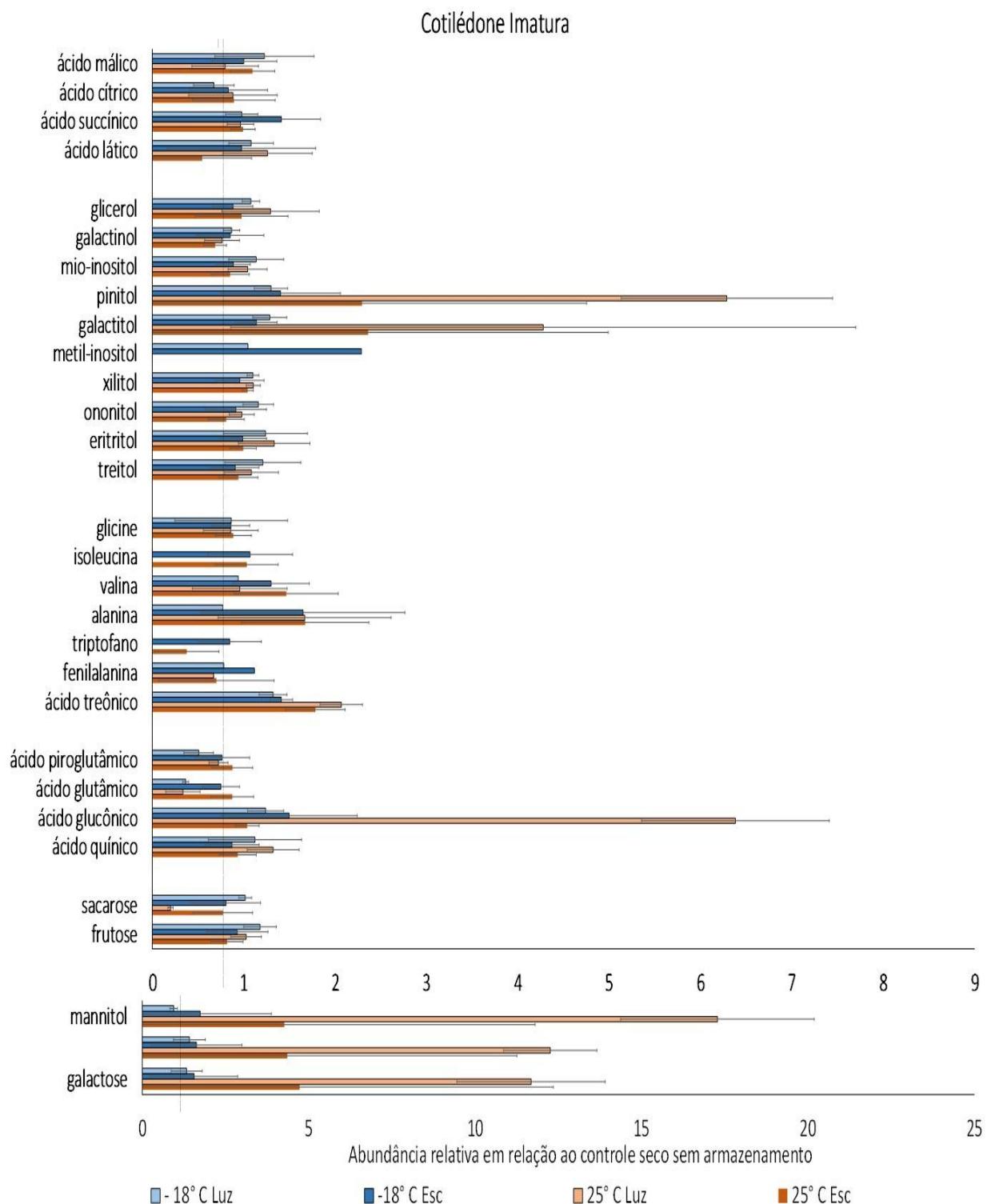


Figura 13. Perfil metabólico de cotilédones de sementes imaturas de *Caesalpinia echinata* armazenadas por 1 mês a -18 °C na luz (□) e escuro (■) e a 25 °C na luz (■) e no escuro (■). Os compostos foram detectados por CG / EM. Todos os valores foram normalizados a partir dos encontrados no cotilédone controle de sementes secas antes do armazenamento (tracejado).

Houve incremento de manitol, ácido chiquímico, galactose, pinitol, galactitol e ácido glucônico, principalmente a 25 °C na luz, no entanto sem haver variação nas proporções de ácidos TCA (cítrico, mágico e succínico). Nos cotilédones maduros, durante o armazenamento, a maioria dos compostos diminuiu em relação ao controle, como indicado pela linha tracejada (Figura 14).

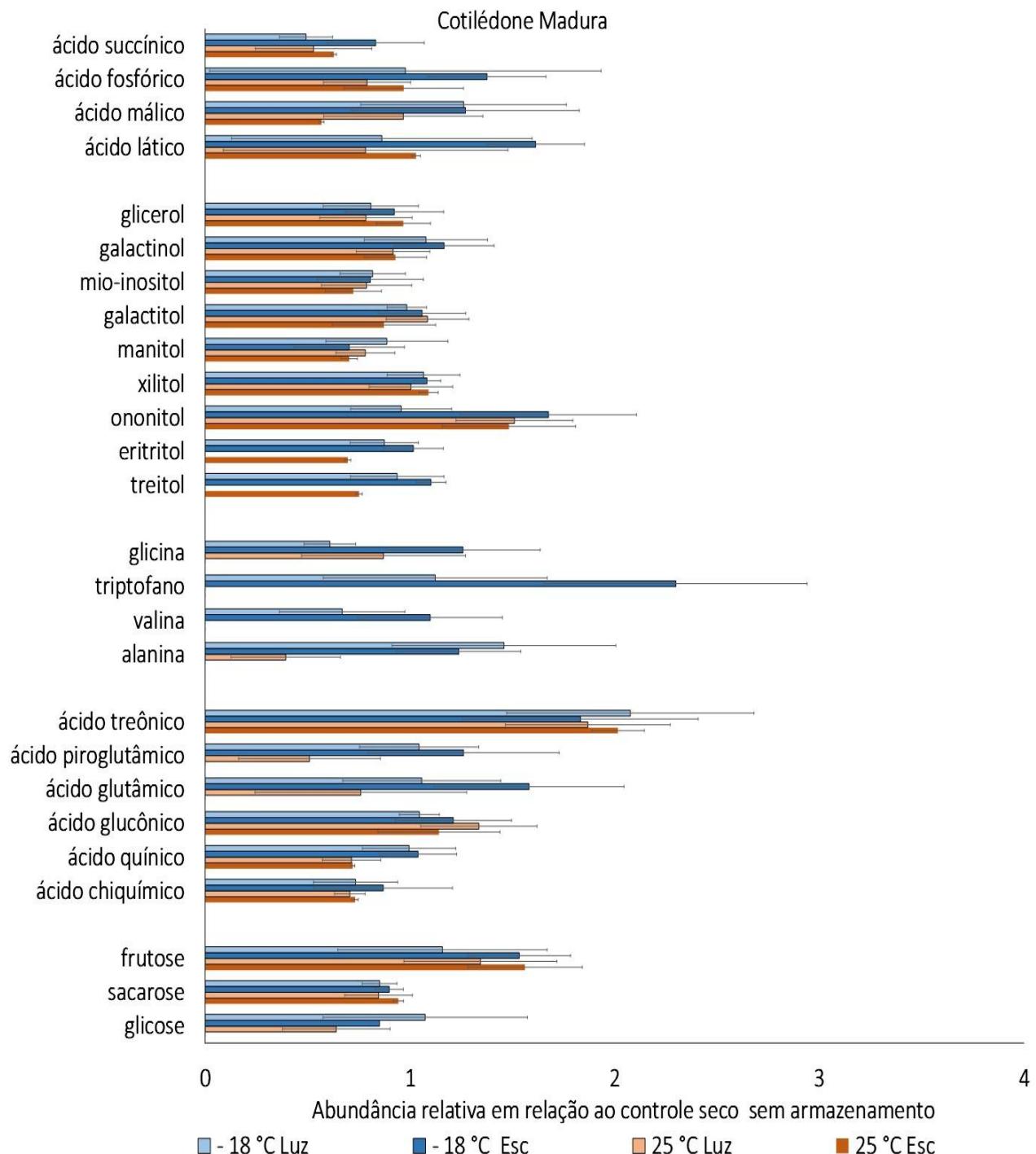


Figura 14. Perfil metabólico de cotilédones maduros de sementes de *Caesalpinia echinata* armazenadas por 1 mês a -18 °C na luz (□) e escuro (■) e a 25 °C na luz (■) e no escuro (■). Os compostos foram detectados por CG / EM. Todos os valores foram normalizados a partir dos encontrados no cotilédone controle de sementes secas antes do armazenamento (tracejado).

A temperatura de 25 °C afetou menos os valores de compostos como ácido cítrico, málico, quínico e chiquímico bem como de treitol e eritritol. Os dados dos cotilédones maduros armazenados na temperatura de -18 °C não variam muito em relação ao controle, mas em geral foram os que apresentaram as maiores proporções dos compostos (Figura 14). Dentre eles, ácido málico, lático, piroglutâmico e glutâmico, aminoácidos glicina, triptofano, valina e alanina. Os compostos ononitol, ácido treônicoo e frutose apareceram em maiores proporções que o controle em todas as condições de armazenamento.

Para observar melhor os padrões de comportamento entre eixos e cotilédones, de sementes imaturas e maduras, antes e após o armazenamento foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) utilizando apenas os dados do controle (sem armazenamento) de sementes secas (Figura 15). Os resultados da PCA, associando as condições de armazenamento às alterações metabólicas, demonstrou a separação dos estádios em relação às condições de armazenamento (controle, 1 mês a -18 °C e 25°C). As maiores alterações metabólicas ocorreram nos eixos embrionários de sementes imaturas, sendo que o tratamento de 25 °C (representado pelos quadrados brancos) encontra-se bem disperso dos tratamentos controle e -18 °C, que apesar de também estarem dispersos, encontram-se mais próximos entre si (Figura 15a).

No eixo de sementes maduras é possível observar uma pequena separação dos compostos nas sementes armazenadas a -18 °C, embora de maneira geral todos os tratamentos estejam menos dispersos em comparação aos eixos imaturos (Figura 15a). Os dados de todos os tratamentos de cotilédones encontram-se menos dispersos do que o observado nos eixos, tanto para sementes maduras quanto em imaturas, sendo mais dispersos nas imaturas (Figura 15b).

Ademais, o Componente 1, relacionado principalmente com os estádios, foi responsável por aproximadamente 49,4% das variações encontradas nos eixos e 48,5 % nos cotilédones. Já o Componente 2, responsável pela separação dos tratamentos de armazenamento, explicou 12,2% das variações dos eixos e 14,1% nos cotilédones. Juntos, os componentes 1 e 2 explicaram 61,6% da variação dos eixos e 62,6% da variação dos cotilédones de sementes de *C. echinata* (Figura 15).

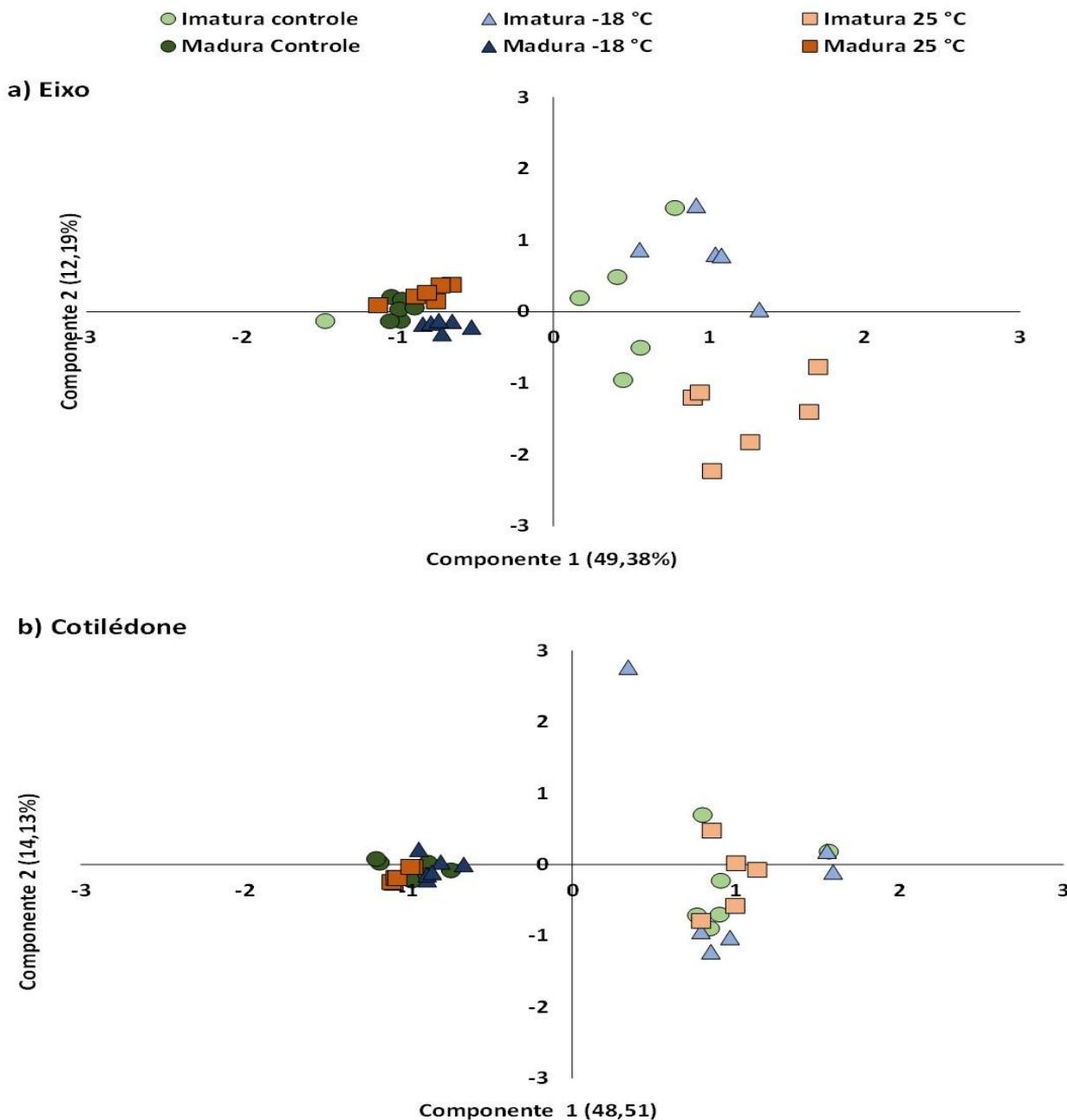


Figura 15. Análise de Componentes Principais (PCA) abrangendo a análise do perfil metabólico de sementes de *Caesalpinia echinata*. a. Eixos e b. Cotilédones. Sementes imaturas (●) e maduras (●) controle sem armazenamento. Sementes imaturas (△) e maduras (△) armazenadas a -18 °C. Sementes imaturas (□) e maduras (□) armazenadas a 25 °C, durante 1 mês. A PCA é mostrada como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica em separado.

## Discussão

Sementes imaturas de *C. echinata* apresentaram-se mais vigorosas que as maduras desde o início do experimento, com maiores valores de porcentagem de germinação e plântulas normais antes e após a secagem. Deve-se ressaltar que o grupo de sementes maduras foi heterogêneo devido a presença de sementes com diferentes teores de água e sinais de deterioração. Sementes dessa

espécie são dispersas do fruto de forma explosiva após a dessecação natural e esclerificação dos tecidos do fruto que se rompem ocasionando sua abertura (Teixeira *et al.* 2008).

Espécies com frutos deiscentes e secos apresentam sementes susceptíveis à dispersão no ponto de equilíbrio com o microclima, sendo este o momento recomendável para a colheita, possibilitando máxima longevidade no armazenamento em bancos de sementes (Hay & Probert 1997, Hay & Smith 2003). No entanto, isso não foi verificado devido ao aumento das chuvas no período final da coleta das sementes de *C. echinata*, conforme observado pelos dados climáticos apresentados na figura 2. Esse fato pode ter ocasionado redução da viabilidade das sementes uma vez que estas ficaram retidas no fruto devido a umidade, ao invés de terem sido dispersas.

A deterioração das sementes do grupo maduro foi detectada pelo teste de tetrazólio no início do experimento (Figura 5). A perda da integridade das membranas, um dos primeiros sinais da deterioração, ocasiona aumento na difusão da solução de tetrazólio nos tecidos que apresentam-se mais avermelhados, demonstrando que as sementes maduras estavam mais deterioradas que as imaturas mesmo antes da secagem. Dados semelhantes foram destacados por Lamarca *et al.* (2009), Delouche (2002) e França Neto *et al.* (1998) para sementes de outras espécies. Essa deterioração pode ter ocorrido devido a oscilação climática, com as altas temperaturas e chuvas ocorridas no período da coleta.

As variações das condições ambientais, nas quais as sementes estão sujeitas durante os processos de maturação e armazenamento, podem interferir diretamente na qualidade fisiológica causando alterações metabólicas degenerativas, podendo ainda adiantar ou atrasar o processo de maturação das sementes. A temperatura tem sido citada como um dos fatores mais importantes na aceleração ou retardamento desse processo (Silva *et al.* 2014, Mata *et al.* 2013, Nery 2005).

Estudos realizados por Martins *et al.* (2009), Lamarca *et al.* (2013) e Mata *et al.* (2013), respectivamente com *Euterpe edulis*, *Eugenia pyriformis* e *Inga striata* demonstraram que variações nas condições ambientais, representadas pela temperatura do ar, índice de pluviosidade e balanço hídrico, durante o desenvolvimento e maturação de frutos e sementes, condicionam a duração do

ciclo de maturação e o momento da dispersão dos frutos, bem como a qualidade final das sementes. Análises de sementes de *Eugenia pyriformis* oriundas de diferentes regiões demonstraram que estas sementes apresentam metabolismo distinto. Eses dados corroboram com a hipótese de que variações ambientais contribuem para diferenças fenotípicas encontradas. Não apenas a somatória de graus-dia, mas também a temperatura máxima e a chuva acumulada, dentre as variáveis analisadas, foram importantes fatores para o desenvolvimento de sementes de *E. pyriformis* (Hell 2014).

O curto período de maturação de sementes de *C. echinata* aliado a estreita correlação entre os fenômenos climáticos que podem ocorrer no final desse processo, são fatores críticos para a obtenção de lotes de sementes com alta qualidade fisiológica (Barbedo *et al.* 2002, Pinto *et al.* 2008). Assim, a obtenção de sementes maduras ainda ligadas a planta mãe depende muito das condições climáticas durante o desenvolvimento das sementes e do momento da coleta das mesmas.

Após a secagem, sementes imaturas de *C. echinata* apresentaram menor taxa de deterioração do que as maduras, provavelmente devido a heterogeneidade desse grupo. Segundo Barbedo *et al.* (2002) sementes de *C. echinata* são tolerantes à dessecação, mas a sensibilidade à secagem pode ser influenciada pela qualidade inicial das mesmas e pela heterogeneidade do lote. Dessa forma, as baixas taxas de germinação e plântulas normais, observadas após a secagem de sementes maduras, podem estar relacionadas com a baixa qualidade inicial do grupo, devido a presença de sementes deterioradas, com teores de água diferentes e possivelmente causados pela chuva no momento da coleta.

Hellmann *et al.* (2006), estudando sementes de *C. echinata* dispersas após chuva, com 21,9% de água, observaram apenas 25% de germinação. Nos primeiros 15 dias de armazenamento essas sementes perderam a capacidade germinativa, independentemente da condição de armazenamento, confirmado, dessa forma, a importância da qualidade inicial das sementes de *C. echinata* para a conservação de sua viabilidade em armazenamento (Barbedo *et al.* 2002).

Deve-se considerar, ainda, o teor de água no qual as sementes maduras foram coletadas (entre 23 e 36%). Alterações associadas com teor de água e potencial hídrico foram relacionadas a mudanças na atividade de água no interior das sementes. Diferentes tipos de água nas sementes representam diferentes potenciais de água devido às forças de atração de água (Vertucci & Ross 1993, Marcos Filho 2015), sendo classificadas em tipos de água de 1 a 5. Em diferentes níveis de hidratação podem ocorrer diferentes processos metabólicos devido às propriedades termodinâmicas de mudanças de tipo de água (Vertucci e Farrant, 1995). De acordo com essas autoras, na faixa de 20 a 33% de teor de água, as sementes apresentam água do tipo 3, na qual a atividade fisiológica da semente se altera dramaticamente. A respiração é intensificada, mas os sistemas de reparo ainda não são ativados nessas condições. É um nível de hidratação perigoso para as sementes porque não permite reações de síntese, mas há condições de deterioração e perda da viabilidade, principalmente quando a temperatura contribui para acelerar as reações oxidativas que causam danos. Sementes nessa faixa de teor de água quando submetidas a secagem podem estar sujeitas a maiores graus de deterioração devido à falta de sistemas de reparo (Vertucci & Farrant 1995, Bewley *et al.* 2013, Marcos Filho 2015).

Devido a esses fatores anteriormente mencionados, possivelmente o grupo de sementes maduras apresentou redução na porcentagem de germinação após a secagem. No entanto, a redução da germinação de sementes secas foi estabilizada durante o armazenamento. Isso pode indicar uma seleção das sementes mais maduras e mais vigorosas do grupo, e, portanto, manutenção da viabilidade destas ao longo do armazenamento.

De acordo com a literatura, um lote de sementes raramente é constituído exclusivamente por sementes de alto ou baixo vigor, sendo composto por sementes com níveis fisiológicos variados. O fato das sementes serem susceptíveis a dispersão significa que elas são frequentemente coletadas antes de estarem completamente maduras. Além disso, dada a variabilidade no tempo de floração para muitas espécies selvagens, tanto dentro quanto entre indivíduos de uma população, é inevitável que a coleta de sementes irá contém uma significativa proporção de sementes que são

menos ou mais maduras (Hay & Probert 2013, Borba *et al.* 2014, Marcos Filho 2015). O potencial fisiológico médio das sementes vai diminuindo, mas como há sementes mais vigorosas que outras, algumas teriam a capacidade de manter a viabilidade relativamente elevada, mesmo após secagem e armazenamento prolongado. A deterioração de sementes geralmente ocorre em lotes que tiveram maturação precoce ou que são oriundos de armazenamento inadequado, podendo, nestes casos, ocorrer produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (Borba *et al.* 2014, Marcos Filho 2015).

Sementes de *C. echinata* apresentam como característica uma rápida e eficiente germinação mesmo quando imaturas. Apesar de imaturas, mesmo após a secagem, essas sementes apresentaram-se vigorosas no início do experimento, porém tiveram redução nas porcentagens de germinação e de plântulas normais a partir do primeiro mês de armazenamento. Esse resultado já era esperado uma vez que dificilmente sementes imaturas produzem plantas sadias e vigorosas após armazenamento prolongado (Barbedo *et al.* 2008). É natural que as sementes percam vigor e os sinais da deterioração apareçam à medida que o armazenamento avança (Zimmer 2012, Oliveira *et al.* 2015).

Quanto mais imaturas forem as sementes menor a chance de sobreviverem à secagem aplicada pós-colheita (Hay & Probert 2013). Newton *et al.* (2013) observaram que apenas uma parte do lote de sementes de *Narcissus pseudonarcissus* L. coletadas no ponto de dispersão natural foi capaz de tolerar condições de secagem em banco de sementes.

Embora a redução na germinação de sementes imaturas tenha ocorrido em todas as condições de armazenamento, foi mais acentuada a 25 °C uma vez que a taxa de perda de viabilidade das sementes depende principalmente do seu conteúdo de água e da temperatura na qual as sementes são armazenadas. Sementes maduras também apresentaram redução na viabilidade a partir de seis meses de armazenamento. Esses dados corroboram com os observados por Barbedo *et al.* (2002), nos quais sementes mesmas secas quando mantidas nessa temperatura não ultrapassam três meses de armazenamento, perdendo rapidamente a viabilidade.

As melhores condições para preservar a qualidade de sementes são baixos teores de água e de umidade relativa do ar e temperatura, pelo fato de minimizar a atividade respiratória, mantendo a semente com baixa atividade metabólica (Menezes & Villela 2009, Carvalho & Nakagawa, 2012, Bewley *et al.* 2013). Dessa forma, a temperatura de 25 °C, provavelmente determinou maior atividade metabólica produzindo as maiores mudanças observadas no metabolismo nessa condição térmica.

A temperatura de -18 °C manteve a viabilidade das sementes maduras após um ano de armazenamento, conforme previamente reportado (Barbedo *et al.* 2002, Hellman *et al.* 2006, Mello *et al.* 2013), enquanto apenas metade das sementes imaturas mantiveram-se viáveis nessa condição. Essa temperatura é recomendada para conservação em bancos de sementes e já vem sendo utilizada para sementes maduras de *C. echinata* armazenadas nessa condição por até 5 anos (FAO 2013, Mello *et al.* 2013).

Considerando que as sementes utilizadas nesse estudo eram tolerantes a dessecação é improvável que exista apenas uma causa da deterioração de sementes, em vez disso os danos se acumulam enquanto processos de proteção e reparação são insuficientes. O atraso na emergência de radícula seguido pela perda progressiva na capacidade de germinação normal é um dos sintomas visuais da deterioração de sementes, dentre tantos outros. As sementes não viáveis de *C. echinata* apresentaram-se embebidas (ou muito inchadas, a ponto de estourarem com um simples toque da pinça), porém sem completar a germinação. Isso pode ter sido causado pela ausência de membranas íntegras, ocasionando perda da permeabilidade seletiva e extravasamento de solutos. Quando o dano de sistemas funcionais (membranas, enzimas e ácidos nucléicos) excede a capacidade das sementes em repará-los, esses sistemas começam a falhar e iniciam uma espiral de reações de deterioração em direção à morte (Bewley *et al.* 2013, Borba *et al.* 2014, Silva *et al.* 2014).

Além da perda da viabilidade após um ano de armazenamento a 25 °C, foi observada mudança na coloração do tegumento em sementes, independente do estádio de maturação ou condição de luz. Esses dados corroboram com os previamente observados por Hellmann *et al.*

(2006) para sementes dessa mesma espécie após dois anos de armazenamento. O tegumento dessas sementes é muito sensível e um dos primeiros tecidos a apresentar alteração após a dispersão, podendo reter umidade, ocasionando mudança na coloração e textura, como rugosidades e outras alterações, indicando sementes menos viáveis com baixa capacidade de germinação e armazenabilidade (Hellmann *et al.* 2006, Marcos Filho 2015).

Sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. (uvaia), imediatamente após serem retiradas do fruto, oxidam-se rapidamente provocando um escurecimento nos cotilédones que se inicia na periferia e segue em direção à parte central da semente (Andrade & Ferreira 2000). A oxidação de compostos associada à redução do grau de umidade pode ser uma das razões da perda rápida da viabilidade dessas sementes. Comportamento semelhante foi observado por Wang (1989), em sementes de manga *Mangifera indica*.

Em várias espécies, a permeabilidade do revestimento da semente ao oxigênio é menor do que à água. As razões para estas diferenças não são evidentes em todos os casos, mas uma possibilidade é que não haja resistência à entrada de oxigênio oferecida pelo tegumento. Outra forma em que as camadas agem é através do consumo de oxigênio em si. Isto é provavelmente devido à oxidação enzimática de vários componentes químicos no qual vários compostos fenólicos (por exemplo, ácido clorogênico) estão implicados, uma ocorrência que é conhecida em sementes de maçã (*Pyrus malus* L.) e de outras espécies (Bewley *et al.* 2013).

O escurecimento enzimático pós-colheita de sementes e a perda rápida da viabilidade em sementes podem ser atribuídos à oxidação de compostos fenólicos como cumarina, ácido clorogênico e seus derivados, que ocorrem nos tegumentos das sementes e podem inibir a germinação e a de outras sementes próximas no solo (Bewley & Black, 1994, Alves *et al.* 2014). As reações de escurecimento são geralmente aceitas como uma consequência direta da atividade de polifenoloxidases e peroxidases sobre os polifenóis que produzem a coloração escura (Whitehead & Swardt 1982, Jiang & Li 2001, Wang & Wu 2005, Machado 2015), como observado no tegumento de sementes de *Phaseolus vulgaris* Rios *et al.* (2002).

Sementes de *C. echinata* também apresentam compostos fenólicos no tegumento (Teixeira *et al.* 2004). Provavelmente o escurecimento do tegumento de sementes de *C. echinata* deve-se a oxidação desses compostos fenólicos, como anteriormente mencionado para sementes de outras espécies. A oxidação diminui de forma acentuada a taxa de respiração do embrião e consequentemente ocasiona a deterioração das sementes (Pinol & Palazón 1993).

Diferenças entre armazenamento na luz e escuro de sementes de *C. echinata* em geral não foram significativas. No entanto, os resultados de germinação e plântulas normais de sementes imaturas e maduras, armazenadas na luz, foram inferiores as do escuro, embora as diferenças significativas só tenham ocorrido aos seis meses. Dados semelhantes foram obtidos com sementes de algumas espécies de *Salix*, também tolerantes a dessecação, que apresentam baixa viabilidade quando armazenadas em ambiente sem controle de temperatura e luz (Roqueiro *et al.* 2010). Em *Salix nigra*, a incompleta desdiferenciação dos cloroplastos durante a secagem natural no período da maturação mantém a clorofila, em consequência as sementes são muito sensíveis a fotooxidação durante o armazenamento quando a intensidade da luz aumenta a produção de radicais livres (Maroderet *al.* 2003, Roqueiro *et al.* 2010).

Quanto mais imatura a semente, maior o teor de água, maior a taxa respiratória e maior é a atividade metabólica. Nesse processo, ocorre a oxidação de substâncias orgânicas num sistema celular com a liberação gradativa de energia, por meio de uma série de reações, tendo oxigênio molecular como acceptor final de elétrons. Os substratos respiratórios podem ser carboidratos como amido, sacarose, frutose, glicose e outros açúcares ou mesmo os lipídios, principalmente os triglicerídeos, ácidos orgânicos e proteínas (Marrenco & Lopes 2009, Taiz & Zeiger 2009).

O aumento da atividade respiratória é avaliado pela quantidade de O<sub>2</sub> consumido e CO<sub>2</sub> liberado (Popinigis 1977, Castro 2011). Para a manutenção da viabilidade das sementes ortodoxas, as quais tem nível metabólico reduzido por exemplo, são necessárias poucas moléculas de oxigênio, dessa forma o restante do O<sub>2</sub> atmosférico tem potencial de causar danos oxidativos (Groot *et al.* 2012, Costa 2015). Esse restante de O<sub>2</sub> poderia ser calculado pela diferença entre o O<sub>2</sub> consumido

( $\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) e o  $\text{CO}_2$  liberado ( $\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), supondo que o oxigênio obtido dessa diferença não estaria envolvido na respiração aeróbica e, portanto, envolvido em outros processos oxidativos. No entanto, isso é apenas uma estimativa devido as diversas possíveis rotas metabólicas envolvidas nesse processo. Dessa forma, não há como afirmar quais as rotas, mas apenas supor, a fim de estimar o quanto ativo metabolicamente o tecido se encontra.

Sementes imaturas apresentaram maior atividade respiratória do que as maduras indicando metabolismo mais ativo nas imaturas. Os resultados de consumo de  $\text{O}_2$  e liberação de  $\text{CO}_2$  observados corroboram com os obtidos por Lamarca & Barbedo (2012), para a mesma espécie, indicando possíveis processos oxidativos, que aumentam com o grau de hidratação e portanto com a imaturidade da semente. Assim, foi possível observar que após a secagem, essas diferenças foram minimizadas, reduzindo a quantidade de  $\mu\text{mols}$  de consumo de  $\text{O}_2$  e liberação de  $\text{CO}_2$  de sementes maduras em relação ao controle, diminuindo o metabolismo das mesmas. Provavelmente essas baixas taxas respiratórias após a secagem não tenham proporcionado muitas diferenças entre sementes imaturas e maduras ao longo do armazenamento. Essa paralisação da respiração e a baixa atividade metabólica das sementes secas são importantes para permitir que as sementes sejam armazenadas por um longo período de tempo até que a germinação seja iniciada sob condições favoráveis (Sew *et al.* 2016).

Embora as taxas respiratórias das sementes tenham sido menores do que as observadas por Lamarca & Barbedo (2012), o consumo de  $\text{O}_2$  foi sempre maior do que a liberação de  $\text{CO}_2$ , indicando processos oxidativos. Em sementes de pau-brasil, processos oxidativos, incluindo respiração e a ação dos radicais livres, provavelmente estão relacionados à rápida deterioração quanto mais elevada for a temperatura, semelhante ao que ocorre com sementes de *Jatropha curcas* (Pinto Junior *et al.* 2012, Pereira *et al.* 2013) e de *Tabebuia caraiba* (Guedes *et al.* 2012).

A diferença significativa observada no consumo de oxigênio entre sementes armazenadas a  $-18^\circ\text{C}$  e  $25^\circ\text{C}$ , aos seis meses de armazenamento, deve-se provavelmente ao fato de que nessas condições as sementes já estavam se deteriorando. A medida que as sementes deterioraram, a

respiração se torna gradativamente menos intensa e tem como consequência final o colapso metabólico da semente (Marcos Filho 2015). Há um consenso geral de que os processos oxidativos e peroxidativos encontram-se entre os principais responsáveis por iniciar danos em sementes secas. O estresse oxidativo em organismos desidratados é provável que seja devido a uma descontrolada formação de EROS (Oliver *et al.* 2001). Os radicais livres podem ser gerados espontaneamente e provocar a oxidação de vários constituintes da semente. A menor viscosidade no estado vítreo restringe movimentos moleculares e a difusão de substratos necessários para outras reações químicas, como as de reparo por exemplo. Assim o oxigênio tende a promover o envelhecimento em sementes mais secas, com teores de água inferiores àqueles nos quais o metabolismo é possível, podendo acumular danos oxidativos (Groot *et al.* 2012, Bewley *et al.* 2013, Groot *et al.* 2015, Nagel *et al.* 2016).

O envelhecimento de sementes pode ser retardado provavelmente devido a ação de processos de reparação, que necessitam de energia da respiração aeróbica. As sementes evoluíram um sistema antioxidante complexo para proteger as membranas celulares e organelas contra danos oxidativos, tais como produção e acúmulo de compostos fenólicos, antioxidantes moleculares, estado vítreo e enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), a peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX), redutase monodehydroascorbate (DHAR), redutase desidroascorbato (DHAR), glutationa redutase (GR), e outras substâncias antioxidantes, tais como a glutationa, vitaminas C e E (Leprince *et al.* 1990, Bernal-Lugo & Leopold 1998, Bailly 2004, Walters *et al.* 2005, Berjak, 2006, Dussert *et al.* 2006, Bewley *et al.* 2013, Groot *et al.* 2012, 2015).

O envolvimento de antioxidantes na longevidade das sementes tem sido demonstrado em diversos estudos utilizando plantas mutantes com níveis alterados de moléculas ou enzimas antioxidantes. Por exemplo, a longevidade de sementes de *Arabidopsis thaliana* foi encurtada por efeito combinado de deficiências de glutationa e ácido ascórbico ou ácido ascórbico e catalase (Clerkx *et al.* 2004), ou por deficiência de tocochromanol (Sattler *et al.* 2004, Mene-Saffrane *et al.* 2010). O conteúdo de substâncias antioxidantes inerente em sementes na maturidade, e a sua

capacidade de recuperar a atividade antioxidante rapidamente após embebição, contribuem para sua longevidade e persistência (Long *et al.* 2015).

O equilíbrio entre produção de EROS e defesas celulares determina o grau de estresse oxidativo (Leprince *et al.* 1990, Bailly 2004, Berjak, 2006). Contudo, essa ação de reparo depende da maquinaria disponível em cada espécie e pode variar dependendo do estádio de maturação de cada espécie.

Sementes de *C. echinata* apresentam elevada capacidade antioxidante e quantidades elevadas de glutatona, mas apesar disso a produção de espécies reativas de oxigênio é maior do que a capacidade protetora num curto período de armazenamento, e talvez por esse motivo essas sementes apresentem baixa longevidade (Silva *et al.* 2014). O controle antioxidante insuficiente durante o estado seco permite a acumulação de danos oxidativos para macromoléculas, contribuindo para a deterioração de sementes, levando à perda de viabilidade com severa peroxidação lipídica, em particular dos ácidos graxos poli-insaturados (Pukacka & Ratajczak 2007).

Sementes de *Mimusops elengi* (abricó) apresentaram peroxidação lipídica da membrana durante a dessecação até 6% de água. Essa secagem diminuiu significativamente a viabilidade de 100 para 23%, devido a alterações na atividade de algumas enzimas antioxidantes. A deterioração dessas sementes está relacionada com a produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio e a baixa capacidade de enzimas antioxidantes para eliminar tais produtos tóxicos durante a secagem (Tang 2016).

Os resultados obtidos com as análises fisiológicas e de atividade respiratória obtidos nesse trabalho estão de acordo com os encontrados na análise do perfil metabólico. A maior atividade respiratória observada em sementes imaturas de *C. echinata* antes da secagem foi confirmada pelo perfil de metabólitos primários. Houve uma tendência à redução do metabolismo primário após a secagem, provavelmente por reduzir a atividade respiratória, indicada pela diminuição na proporção da maioria dos compostos do eixo de sementes imaturas. No entanto, essa redução não foi tão

acentuada quanto esperado para sementes com comportamento ortodoxo (Fait *et al.* 2006, Hell *et al.* comunicação pessoal 2016).

O ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) é um componente importante da respiração mitocondrial com papel essencial no fornecimento de esqueletos de carbono, de ATP e de poder redutor para várias reações bioquímicas e biossíntese de estruturas celulares (Sew *et al.* 2016). Como visto anteriormente, a diminuição dos compostos intermediários do ciclodo ciclo de TCA, relacionada com taxas respiratórias baixas é um indicativo metabólico da fase de dessecação durante o desenvolvimento da semente (Fait *et al.* 2006, Marcos Filho 2015). No entanto, houve pouca redução nos ácidos cítrico e málico durante a maturação de sementes de *C. echinata*, indicando uma tendência a redução da atividade metabólica, mas não propriamente um desligamento metabólico, uma vez que os mesmos compostos continuaram presentes nas sementes maduras.

Antes do armazenamento, não houve um padrão uniforme de alteração nos compostos dos cotilédones das sementes imaturas e maduras, mas alguns deles responderam mais à secagem do que à maturação, com poucas variações. No entanto, foram observadas diferenças na quantidade de alguns compostos dos cotilédones durante o desenvolvimento da semente. Alguns dos metabólitos encontrados nos eixos embrionários não foram detectados nos cotilédones indicando maior atividade no eixo. Estudos com sementes mutantes de *Arabidopsis thaliana* que afetam o desenvolvimento de sementes, indicaram diferenças comportamentais entre eixos e cotilédones (Wolkers *et al.* 1998). Sementes mutantes lec2-1 de *A. thaliana* diferem dos mutantes lec1 por terem eixos tolerantes a dessecação e cotilédones sensíveis e, sobreviverem a secagem (Wolkers *et al.* 1998).

As diferenças entre eixos e cotilédones podem ainda ser atribuídas à presença de compostos de reserva em sementes maduras de *C. echinata*. Os cotilédones são constituídos por mais de 40% de amido e 17% de lipídios, correspondendo a uma grande parte da massa seca, diminuindo a concentração de outros metabólitos nesse tecido (Garcia *et al.* 2006, Mello *et al.* 2010).

Corte *et al.* (2010) realizando estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* (Leguminosae) submetidas ao envelhecimento natural e acelerado observaram manutenção da atividade enzimática da SOD em cotilédones durante o envelhecimento acelerado e natural, implicando que o metabolismo é mais lento nos cotilédones, em relação aos eixos embrionários. Dessa forma, considerando que há compartimentos nas sementes mais sensíveis à deterioração do que outros (Das e Sem-Mandi 1992, Marcos Filho 2005), recomenda-se sempre que possível estudar separadamente o eixo embrionário e os cotilédones.

Também foram observadas variações nas proporções de açúcares álcoois no eixo durante a maturação. De forma geral, polióis como ciclitóis livres e galactosil ciclitóis são acumulados em algumas sementes e parecem contribuir na tolerância à dessecação de maneira semelhante aos oligossacarídeos da série da rafinose (Obendorf 1997, Peterbauer & Richter 2001), quando estes não estão evidenciados (Horbowicz *et al.* 1998, Steadman *et al.* 2000, Borges *et al.* 2006), como é o caso das sementes de *C. echinata*.

Galactinol e outros polióis, tais como *myo*-inositol e o manitol são também capazes de reduzir os efeitos de EROS (Smirnoff & Cumbes 1989), que são produzidos pelo metabolismo de sementes e podem ter os seus níveis mais altos durante condições de estresse, tal como a dessecação (Castillo 1990, Nishizawa *et al.* 2008, El Sayed *et al.* 2014).

Estudos indicam fortes correlações entre os conteúdos de galactinol e a longevidade das sementes (He *et al.* 2016), sendo o baixo conteúdo de galactinol diretamente correlacionado com a baixa longevidade das sementes (He *et al.* 2016, Vidigal *et al.* 2016). As proporções de galactinol diminuíram ao longo do armazenamento de sementes *C. echinata* (figura 12) o que poderia estar relacionado com a baixa longevidade dessas sementes.

No entanto, durante a maturação, as proporções de outros polióis, como treitol e eritritol, aumentaram no eixo e cotilédone. A biossíntese desses compostos ainda não está completamente elucidada em qualquer organismo, contudo sua presença tem sido descrita para organismos

tolerantes a dessecação, como *Sporobolus stapfianus* (Oliver *et al.* 2011) e em outros organismos sob temperaturas baixas (-60 °C), como no besouro do Alasca (Walters *et al.* 2009).

Além disso, vale ressaltar que o eritritol pode ser precursor, pela via do metabolismo secundário, de  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) um antioxidante não-enzimático. Vários estudos mostraram a função antioxidante de tocoferol nas sementes, contra a condição de estresse oxidativo, associados com longevidade de sementes (Sattler *et al.* 2004, Kanwischer *et al.* 2005, Mène-Saffrané *et al.* 2010). Alguns polióis foram observados em todos os estádios de maturação sem grandes variações como *myo*-inositol, pinitol e ononitol. A presença dos ciclitóis durante a maturação de *C. echinata*, já havia sido documentada, indicando aquisição de tolerância a dessecação (Borges *et al.* 2006).

Foi observado aumento na proporção de manitol ao longo da maturação e redução na proporção de ácido cítrico. O mesmo foi observado nas proporções de mannitol durante a maturação de sementes de *Arabidopsis* (Sew *et al.* 2016). O manitol é um açúcar álcool e tem importante papel como osmólito e soluto compatível, protegendo contra o estresse salino e atuando na osmorregulação (Stoop *et al.* 1996). Além disso, atua na tolerância à seca, uma vez que tem a capacidade de diminuir os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (Smirnoff & Cumbes 1989).

Durante o armazenamento de sementes imaturas houve maiores modificações nas proporções dos compostos analisados do que nas sementes maduras. Apesar das reduções na capacidade germinativa de sementes imaturas e maduras a 25 °C começarem a aparecer apenas depois do segundo mês de armazenamento, os resultados de metabolômica indicaram mudanças na proporção dos compostos a partir do primeiro mês de armazenamento, com aumento significativo nas proporções de manitol no cotilédone de imaturas por exemplo.

Ácido ascórbico, que confere proteção contra espécies reativas de oxigênio via sistema antioxidante ascorbato-glutatona (Foyer & Noctor 2011) foi observado em menores proporções nas sementes maduras do que imaturas antes do armazenamento. O sistema antioxidante, via ascorbato-

glutatona, é desligado na dessecação natural que ocorre na fase final de maturação em sementes tolerantes à perda de água (Arrigoni *et al.* 1992, Tommasi *et al.* 1999, Van den Ende & Valluru 2009). Durante o armazenamento, esse composto só foi observado no eixo de sementes imaturas armazenadas a -18 °C, não ocorrendo a 25 °C, temperatura que reduz a viabilidade das sementes. Esses resultados podem indicar que sementes imaturas armazenadas nessa temperatura possam utilizar outras rotas antioxidantes na tentativa de controlar a deterioração.

Foram observadas alterações marcantes nos níveis de ácido chiquímico, aumentando as proporções nos eixos e cotilédones de sementes imaturas a 25 °C armazenadas por 1 mês. A presença de ácido chiquímico, precursor de aminoácidos e de compostos fenólicos indica que o metabolismo secundário continua ativo e preparando compostos de defesa (Cocuron *et al.* 2014). *Myo*-inositol, metil-inositol, pinitol e ononitol também são conhecidos por protegerem componentes intracelulares tais como as membranas e enzimas a partir de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidos por estresses abióticos (Conde *et al.* 2011). Dessa maneira, a tendência de aumento destes compostos, juntamente com demais polióis, ao longo dos tratamentos a 25°C, poderia indicar uma proteção alternativa contra a deterioração, ou estresse oxidativo, e que as sementes imaturas não estariam investindo na defesa antioxidante da rota do ácido ascórbico, mas sim, que estariam utilizando a rota de polióis como o manitol, pinitol e metil-inositol, por exemplo.

O ácido glucônico, também foi encontrado em maiores proporções a 25 °C em eixos e cotilédones imaturos e maduros. O ácido glucônico é produzido a partir da glicose através de uma reação simples de desidrogenação catalisada pela glicose oxidase. Cerca de 100% da glicose é convertida em ácido glucônico sob as condições adequadas, sendo abundantemente disponível nas plantas, frutos e outros alimentos. Em sementes de *Oriza sativa* ácido glucônico mostrou correlação positiva com atividades antioxidantes (Ramachandran *et al.* 2006, Matityahu *et al.* 2013, Kim *et al.* 2014). Provavelmente o incremento nas proporções desse composto possa estar relacionado com rotas de produção de antioxidantes nas sementes em deterioração.

Como mencionado anteriormente, na etapa de dessecação de sementes ortodoxas ocorre uma grande perda de água, o que é considerado uma preparação para o período de repouso no estado seco (Angelovici *et al.* 2010). Assim, sementes imaturas de *C. echinata*, mais hidratadas, apresentam maior atividade metabólica em ambos tecidos, cotilédones e eixos, pois apresentam compostos como aminoácidos e intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, enquanto sementes maduras apresentaram menores proporções desses compostos, indicando redução do metabolismo embora sem o desligamento metabólico esperado para sementes ortodoxas como *Libidibia ferrea* (Capítulo 2) e *Arabidopsis* (Yobi *et al.* 2012). A perda da viabilidade de sementes imaturas armazenadas a 25 °C poderia ser explicada pelas maiores alterações nas proporções de metabólitos e portanto maior deterioração observadas nessa temperatura e portanto maior deterioração.

Observando os resultados da PCA, é possível verificar que nos eixos de sementes imaturas houve maior separação dos compostos entre os tratamentos controle e diferentes temperaturas de armazenamento (-18 °C e 25 °C). Nesses tecidos, o tratamento mais prejudicial foi o armazenamento a 25 °C, nos quais houve maiores alterações metabólicas e separação dos compostos. Nesta temperatura houve maior deterioração das sementes ao final do período de armazenamento por 1 ano.

Nos eixos maduros, não houve diferença entre os tratamentos controle e temperaturas de armazenamento (-18 °C e 25 °C), sendo observada pequena separação dos compostos a -18 °C. Nesta temperatura, que induz baixa atividade metabólica, há menor alteração nos compostos mantendo as sementes viáveis por mais tempo.

Nos cotilédones imaturos houve menor separação dos compostos entre os tratamentos controle e temperatura de armazenamento do que o observado nos eixos. Nos cotilédones maduros essa separação foi menor ainda, com os compostos aparecendo todos reunidos. Esses resultados eram esperados e podem ser explicados pela menor atividade metabólica dos tecidos dos cotilédones em relação aos do eixo embrionário, como já comentado.

Vale lembrar que análise de PCA foi realizada com dados de sementes armazenadas por 1 mês, mas que as sementes foram armazenadas por até 12 meses. Provavelmente essas alterações sejam intensificadas com o avanço do período de armazenamento. Esses resultados indicam que a conservação de sementes de *C. echinata* está diretamente envolvida com a atividade metabólica do tecido, seu estádio de desenvolvimento e com as mudanças ocorridas durante o armazenamento.

## Conclusões

- Sementes imaturas de *C. echinata*, desde que já tolerantes à dessecação, podem ser armazenadas por pelo menos 1 ano a -18 °C;
- As maiores alterações metabólicas foram observadas em eixos imaturos armazenados a 25 °C, temperatura na qual as sementes perdem a viabilidade a partir dos 6 meses;
- Sementes maduras de pau-brasil não desligam o metabolismo, como esperado para sementes ortodoxas clássicas, e portanto, não devem ser consideradas ortodoxas clássicas;
- A análise metabolômica pode ser uma ferramenta adicional para caracterizar o estádio de maturação e a viabilidade das sementes durante o armazenamento.

## Literatura Citada

- Andrade, L.R.N.B & Ferreira, A.G.**2000. Revista Brasileira de Sementes, vol. 22, nº 2, p.118-125.
- Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A.R., Fait.** 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. Trends in Plant Science 15:211–218.
- Alves, F. C.** 2014. Eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares para o escurecimento tardio de grãos em feijão-comum. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de Lavras Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.
- Arrigoni, O., De Gara, L., Tommasi, F., Liso, R.** 1992. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. Plant Physiology 99, 235-238.
- Bailly, C.** 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research 14, 93-107. doi:10.1079/SSR2004159
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. Brazilian Journal of Botany 25: 431–439.
- Barbedo, C.J., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Moraes, M.H.D. & Richter, A.A.** 2008. A semente: desenvolvimento, maturação, armazenamento, sanidade e germinação. In: Pau-brasil, da semente à madeira: conhecer para conservar. Figueiredo-Ribeiro, RCL, Barbedo CJ, Alves, ES, Domingos, M e Braga, M. São Paulo: Instituto de Botânica/SMA. 184p.
- Barbedo, C.J., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? Hoehnea 40: 583-593.
- Berjak, P.** 2006. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. Seed Science Research 16: 1-15.
- Berjak, P. & Pammeter, N. W.**2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12 (Edição especial): 22-55.
- Berjak, P. & Pammeter, N.W.** 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. Frontiers in Plant Science 4, 478 1-9. doi: 10.3389/fpls.2013.00478
- Bernal-Lugo, I., & Leopold, A. C.** 1998. The dynamics of seed mortality. *Journal of Experimental Botany*, 49(326), 1455-1461.
- Bewley, J.D.& Black,M.** 1994. Seeds: Histology of development and germination. 2 ed. New York: Plenum. p.245.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. & Nonogaki, H.** 2013. Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd ed. Springer, New York.

- Bonjovani, M.R.** 2011. Taxa respiratória em sementes recalcitrantes de *Inga vera* Wild. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington. Tese d Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 130p.
- Borba, I.C.G., Bandeira, J. M., Marini, P., Martins, A. B. N., & de Moraes, D. M.** 2014. Metabolismo antioxidativo para separação de lotes de sementes de diferentes graus de homogeneidade. Revista Brasileira de Biociências, 12(1), 20-26.
- Borges, I.F., Giudice Neto, J.D., Bilia, D.A.C, Figueiredo-Ribeiro, R.C.L, Barbedo, C.J.** 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic forest. Brazilian Archives of Biology and Technology 48, 851-861.
- 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.
- Brasil.** 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília.
- Caccere, R., Teixeira, S.P., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Braga, M.R.** 2013. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. Journal of Plant Physiology 170: 791-800.
- Castro, M.B.** 2011. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho por meio da atividade respiratória. Dissertação de Mestrado UFLA. 68p.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2012. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5ed. FUNEP, Jaboticabal.
- Castillo, E.M., de Lumen, B.O., Reyes, P.S., de Lumen, H.Z.** 1990. Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. Journal of Agriculture and Food Chemistry 38: 351–355.
- Clerkx, E. J., El-Lithy, M. E., Vierling, E., Ruys, G. J., Blankestijn-De Vries, H., Groot, S. P., ... & Koornneef, M.** 2004. Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed germination and seed longevity traits between the accessions Landsberg erecta and Shakdara, using a new recombinant inbred line population. Plant Physiology, 135(1), 432-443.
- Costa, D. S.** 2015. Interferência do oxigênio na conservação das sementes de arroz (Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”).
- Cocuron, J.C., Anderson, B., Boyd, A., Alonso, A.P.** 2014. Targeted metabolomics of *physaria fendleri*, an industrial crop producing hydroxy fatty acids. Plant Cell Physiology 55(3):620–633 doi:10.1093/pcp/pcu011

- Conde, A., Silva, P., Agasse, A., Conde, C. & Gerós, H.** 2011. Mannitol Transport and Mannitol Dehydrogenase Activities are Coordinated in *Olea europaea* Under Salt and Osmotic Stresses. *Plant Cell Physiology* 52(10): 1766–1775 doi:10.1093/pcp/pcr121
- Corte, V.B., Borges, E.E.D.L., Leite, H.G., Pereira, B.L.C. & Gonçalves, J.F.D.C.** 2010. Enzymatic study of the deterioration of Melanoxylon brauna seeds aged naturally and artificially. *Revista Brasileira de Sementes* 32(1), 83-91.
- Das, G. & Sem-Mandi, S.** 1992. Scutellar amylase activity in naturally aged and accelerated aged wheat seeds. *Annals of Botany* v.69, p.479-501.
- Daws, M.I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C. A. & Pritchard, H. W.** 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157–166.
- Daws, M.I., Cleland, H., Chmielarz, P., Gorian, F., Leprince, O. & Mullins, C.E.,** 2006. Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? *Functional Plant Biology* 33: 59-66.
- Delgado, L.F.** 2006. Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de Eugenia. Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de Eugenia. Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, na Área de Concentração de Plantas Vasculares. Instituto de Botânica de São Paulo. 106p.
- Delouche, J.C., Still, T.W., Raspet, M. & Lienhard, M.** 1976. O teste de tetrazólio para viabilidade da semente. Brasília: Agiplan.
- Delouche, J.C.** 2002. Germinação, deterioração e vigor da semente. *Seed News*, 6(06), 24-31.
- Dussert, S., Davey, M.W., Laffargue, A., Doulbeau, S., Swennen, R., Etienne, H.** 2006. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. *Physiologia Plantarum*, 127: 192-204
- El Sayed, A.I., Rafudeen, M.S., Golldack, D.** 2014 Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress, *Plant Biology* 16 1–8
- FAO.** 2013 Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome.
- Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Feni, A.R., Galili, G.** 2006. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology* 142: 839-854.
- Feltre, R.** 1982. Química geral. 2 ed. Moderna, São Paulo.
- Foyer, C.H. & Noctor, G.** 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155, 2-18. doi:10.1104/pp.110.167569

- França Neto, J.D.B., Krzyzanowski, F.C. & Costa, N.D.** 1998. The tetrazolium test for soybean seeds. Londrina: EMBRAPA-CNPSO
- Garcia, I.S., Souza, A., Barbedo, C.J., Dietrich, S.M.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic forest. Brazilian Journal of Biology 66, 739-745.
- Guedes, R.S., Alves, E.U., Melo, P.A.R.F, Moura, S.S.S., Silva, R.S.** 2012. Storage of *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bureau seeds in different packaging and temperatures. Revista Brasileira de Sementes.34:433-440. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v34n3/10.pdf>
- Guimarães, R.M.** 1999. Fisiologia de sementes. Lavras:UFLA/FAEPE. 81p.
- Groot, S.P.C., Surki, A.A., Vos de, R.C.H., Kodde, J.** 2012. Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analyzing seed ageing under dry conditions. Annals of Botany 110: 1149–1159.
- Groot, S.P., de Groot, L., Kodde, J. & van Treuren, R.** 2015. Prolonging the longevity of ex situ conserved seeds by storage under anoxia. Plant Genetic Resources, 13(01), 18-26.
- Hay, F.R., Probert, R.J., Smith, R.D.** 1997. The effect of maturity on the moisture relations of seed longevity in foxglove (*Digitalis purpurea* L.). Seed Science Research 7: 341–349.
- Hay, F.R., Smith, R.D.** 2003. Seed maturity: when to collect seeds from wild plants. In RD Smith, JB Dickie, S Linington, HW Pritchard, RJ Probert, eds, Seed Conservation – Turning Science into Practice. Royal Botanic Gardens Kew, Kew, pp 97–133.
- Hay, F. R., & Probert, R. J.** 2013. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research., Conservation Physiology, (1), cot030.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D.** 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 1-9.
- He, H., Willems, L., Batushansky, A., Fait, A., Hanson, J., Nijveen, H., Hilhorst, H.W., Bentsink, L.** 2016. Effects of parental temperature and nitrate on seed performance are reflected by partly overlapping genetic and metabolic pathways, Plant Cell Physiology <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcv207>.
- Hell, A.F.** 2014. Alterações metabólicas em função de variáveis ambientais e sua contribuição para a tolerância à perda de água em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. Inst. Dissertação de Mestrado- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 97 p.
- Hell, A.F., Centeno, D.C., & Braga, M.R.** 2016. Comunicação pessoal:Caracterização do metabolismo primário durante o desenvolvimento de sementes de *Erythrina speciosa*. Projeto de iniciação científica IBt.

- Hellmann, M.E., Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Barbedo, C.J.** 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. *Brazilian Journal of Botany* 29, 93-101. [Freezing tolerance in seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) as influenced by the initial water content]
- Hellmann, M.E.** 2006. Tolerância ao congelamento e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Teses de Doutorado-Instituto de Botânica*.
- Hong, T.D. & Ellis, R.H.** 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. *Rome, IPGRI. Technical Bulletin* 1: 62.
- Horbowicz, M., Brenae, P., Obendorfm, R.L.** 1998. Fagopytrol B1, O-a-D-galactopyranosyl-(1®2)-D-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with dessication tolerance. *Planta* 205:1-11.
- Hummel, J., Strehmel, N., Selbig, J., Walther, D., Kopka, J.** 2010. Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles. *Metabolomics* 6: 322-333.
- Ista.** 2015. International Seed Testing Association. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13:356-513. <https://www.seedtest.org/en/international-rules-content--1--1083.html>
- Jiang, Y. & Li, Y.** 2001. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry*, Oxford, v. 73, n. 2, p. 139-143.
- Kanwischer, M., Porfirova, S., Bergmuller, E., Dormann, P.** 2005. Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiology* 137,713–723.
- Kim, G.R., Jung, E.S., Lee, S., Lim, S.H., Ha, S.H. & Lee, C.H.** 2014. Combined mass spectrometry-based metabolite profiling of different pigmented rice (*Oryza sativa* L.) seeds and correlation with antioxidant activities. *Molecules* 19(10).
- Lamarca, E.V., Leduc, S.N.M., Barbedo, C.J.** 2009. Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil - Leguminosae) pelo teste de tetrazólio. *Brazilian Journal of Botany* 32, 793-803. [Viability and vigor of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood - Leguminosae) by tetrazolium test]
- Lamarca, E.V. & Barbedo, C.J.** 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. *Hoehnea* 39: 577-586.
- Lamarca, E.V., Prataviera, J.S., Borges, I.F., Delgado, L.F., Teixeira, C.C., De Camargo, M.B.P., Faria, J.M.R. & Barbedo, C.J.** 2013. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85(1), 223-233.

- Leprince, O., Deltour, R., Thorpe, P.C., Atherton, N.M. & Hendry, G.A.F.** 1990. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). *New Phytology* 116: 573-580.
- Long, R. L., Gorecki, M. J., Renton, M., Scott, J. K., Colville, L., Goggin, D. E., Lucy E. Commander, David A. Westcott, Hillary Cherry & Finch-Savage, W. E.** 2015. The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biological Reviews*, 90(1), 31-59.
- Machado, P. D. S.** 2015. Caracterização do Uxi (Endopleura uchi) em três estádios de desenvolvimento. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Lavras no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A.** 1982 The germination of seeds. 3.ed. New York: Pergamon, 211p.
- Maroder, H., Prego, I., Maldonado, S.** 2003. Histochemical and ultrastructural studies on *Salix alba* and *S. matsudana* seeds. *Trees* 17:193-9.
- Marcos Filho, J.** 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Abrates, Londrina 660p.
- Marrenco, R.A. & Lopes NF** 2009. Fisiologia Vegetal . Viçosa, Universidade Federal de Viçosa.
- Martini-Neto, N.** 2011. Isotermas de sorção de água, potencial de armazenamento e suas relações com as taxas respiratórias em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam.(pau-brasil). Tese de Doutorado-Instituto de Botânica de São Paulo.
- Martins, C. C., Bovi, M. L., Nakagawa, J., & Machado, C. G.** 2009. Secagem e armazenamento de sementes de juçara. *Revista Árvore*, 33(4), 635-642.
- Mata, M. F., Silva, K. B., Bruno, R. D. L. A., Felix, L.P., Medeiros Filho, S.&Alves, E.U.** 2013 Maturação fisiológica de sementes de ingazeiro (*Inga striata*) Benth. Semina: Ciências Agrárias, v.34, n.2, p.549-566.
- Mativityahu, I., Godo, I., Hacham, Y., & Amir, R.** 2013. Tobacco seeds expressing feedback-insensitive cystathionine gamma-synthase exhibit elevated content of methionine and altered primary metabolic profile. *BMC plant biology*, 13(1), 1.
- Mello, J.I.O. & Barbedo, C.J.** 2007. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil *Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae-Caesalpiniodeae. *Revista Árvore* 31: 645-655.
- Mello, J.I.O., Barbedo, C.J., Salatino, A., Figueiredo- Ribeiro, R.C.L.** 2010. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53: 889-899.

- Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Barbedo, C.J.** 2013. Sub-zero temperature enables storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. *Journal of Seed Science*35:519-523.
- Mène-Saffrané, L. Jones, A.D. & DellaPenna, D.** 2010. Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (41), 17815-17820
- Menezes, N.L. & Villela, F.A.** 2009. O Potencial de armazenamento de cada semente. *SEED News* 1:4 ( 22-25).
- Nagel, M., Kodde, J., Pistrick, S., Mascher, M., Börner, A., & Groot, S. P.** 2016. Barley Seed Aging: Genetics behind the Dry Elevated Pressure of Oxygen Aging and Moist Controlled Deterioration. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Nery, M.C.** 2005. Aspectos morfológicos do desenvolvimento de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich.. 95 p. Dissertação de Mestrado em Agronomia-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- Newton, R.J., Hay, F.R., Ellis, R.H.** 2013. Seed development and maturation in early spring-flowering *Galanthus nivalis* and *Narcissus pseudonarcissus* continues postshedding with little evidence of maturation *in planta*. *Annals of Botany*111: 945- 955.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. & Shigeoka, S.** 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant physiology*147(3), 1251-1263.
- Obendorf, R.L.** 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* 7:63-74.
- Oliver, A.E., Leprince, O., Wolkers, W.F., Hincha, D.K., Heyer, A.G., Grawe, J.H.** 2001. Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiology* 43: 151-167.
- Oliver, M.J., Guo, L., Alexander, D.C., Ryals, J.A., Wone, W.M.B., Cushman, J.C.** 2011. A Sister Group Contrast Using Untargeted Global Metabolomic Analysis Delineates the Biochemical Regulation Underlying Desiccation Tolerance in *Sporobolus stapfianus*. *The Plant Cell* 23: 1231–1248.
- Oliveira, L.M., Schuch, L.O.B., Bruno, R.D.L.A. & Peske, S.T.** 2015. Qualidade de sementes de feijão-caupi tratadas com produtos químicos e armazenadas em condições controladas e não controladas de temperatura e umidade. *Semina: Ciências Agrárias* 36(3), 1263-1276.
- Pammeter, N.W. & Berjak, P.** 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9, 13-37.
- Peterbauer, T. & Richter, A.** 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11:185-197.

- Pereira, M.D., Dias, D.C.F.S., Borges, E.E.L., Martins Filho, S., Dias, L.A.S., Soriano, P.E.**  
 2013. Physiological quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds during storage. *Journal of Seed Science* 35, p.21-27. <http://www.scielo.br/pdf/jss/v35n1/03.pdf>
- Pereira, E.D.M.** 2013. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de pimenta e pimentão por meio da atividade respiratória. Dissertação de Mestrado Universidde Federal de Lavras-MG.
- Pinol, M. T., & Palazón, J.** 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. *Fisiología y bioquímica vegetal*.
- Pinto Junior, A.S., Guimarães, V.F., Dranski, J.A.L., Steiner, F., Malavasi, M.M., Malavasi, U.C.** 2012. Armazenamento de sementes de pinhão manso em diferentes embalagens e ambientes. *Revista Brasileira de Sementes*. 34:636-643  
<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v34n4/15.pdf>
- Pinto, M.M., Lopes, M.I.M.S. & Grandi, R.A.P.** 2008. Dinâmica e funcionamento de um arboreto de pau-brasil em Mogi-Guaçu. In: Pau-brasil, da semente à madeira: conhecer para conservar. Figueiredo-Ribeiro, RCL, Barbedo CJ, Alves, ES, Domingos, M e Braga, M. São Paulo: Instituto de Botânica/SMA. 184p.
- Popinigis, F.** 1977. Fisiologia da semente (No. QK661 P6).
- Prataviera, J. S., Lamarca, E. V., Teixeira, C. C., & Barbedo, C. J.** 2015. The germination success of the cut seeds of *Eugenia pyriformis* depends on their size and origin. *Journal of Seed Science*, 37(1), 47-54.
- Pukacka, S. & Ratajczak, E.** 2007. Age-related biochemical changes during storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Seed Science Research* 17, 45-53.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A. & Larroche, C.** 2006. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology and Biotechnology* 44(2): 185-195.
- Rios, A. D. O., Abreu, C. D.& Corrêa, A.** 2002. Efeitos da época de colheita e do tempo de armazenamento no escurecimento do tegumento do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciência Agrotécnica*, 26(3), 550-558.
- Roberts, E.H.** 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.
- Rocha, Y.T.** 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. PhD Thesis, University of São Paulo, São Paulo, Brasil.

- Roqueiro, G., Facorro, G.B., Huarte, M.G., Rubín de Celis, E., García, F., Maldonado, S., Maroder, H.** 2010. Effects of photooxidation on membrane integrity in *Salix nigra* seeds. *Annals of Botany* 105, 1027-1034. doi:10.1093/aob/mcq067
- Santana, D.G. & Ranal, M.A.** 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Editora UnB, Brasília.
- Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallaneslundback, M., Pollard, M., Dellapenna, D.** 2004. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The Plant Cell* v. 16, n. 6, p. 1419-1432.
- Sew, Y. S., Stroher, E., Fenske, R., & Millar, A. H.** 2016. Loss of mitochondrial malate dehydrogenase activity alters seed metabolism impairing seed maturation and post-germination growth in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, pp-01654.
- Silva, J.P.N., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Barbedo, C.J.** 2014. Maturação de sementes de *Poincianella pluviosa* (dc.) L.P.Queiroz (sibipiruna): sementes tolerantes à dessecação e de baixa viabilidade no armazenamento. Tese de Doutorado- Universidade Estadual Paulista Campus de Botucatu-SP.
- Smirnoff, N. & Cumbess, Q.J.** 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 37: 1057-1060.
- Steadman, K.J., Burgoon, M.S., Schuster, R.L., Lewis, B.A., Edwardson, S.E., Obendorf, R.L.** 2000. Fagopyritols, D-chiro-inositol and other soluble carbohydrates in buckwheat seed milling fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2843-2847.
- Stoop, J.M.H., Williamson, J.D., Pharr, D.M.** 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science* 1: 139-144.
- Suguiyama, V.F., Silva, E.A., Meirelles, S.T., Centeno, D.C., Braga, M.R.** 2014. Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbacenia purpurea* Hook. (Velloziaceae) shows two time-dependent responses during desiccation and recovering. *Frontiers in Plant Science* 5:96. 10.3389/fpls.2014.00096
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2009. Fisiologia vegetal. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- Tang, A.** 2016. Desiccation-induced changes in viability, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in *Mimusops elengi* seeds. *African Journal of Biotechnology*, 11(44), 10255-10261.
- Teixeira, S.P., Carmello-Guerreiro, S. & Machado, S. R.** 2004. Fruit and seed ontogeny related to the seed behaviour of two tropical species of Caesalpinia (Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 146(1), 57-70.
- Teixeira, S.P., Dornelas, M.C., Zaia, H.A.B.Q.A. & Correa, A.M.S.** 2008. Formação da flor, do fruto e da semente. In: Pau-brasil, da semente à madeira: conhecer para conservar. Figueiredo-

- Ribeiro, RCL, Barbedo CJ, Alves, ES, Domingos, M e Braga, M. São Paulo: Instituto de Botânica/SMA. 184p.
- Tommasi, F., Paciolla, C., Arrigoni, O.** 1999. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. *Physiologia Plantarum* 105, 193-198. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.105202.x
- Van den Ende, W. & Valluru, R.** 2009. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany* 60, 9-18.
- Vertucci, C.W. & Roos, E.E.** 1993. Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research*, 3(03), 201-213.
- Vertucci, C.W. & Farrant, J.M.** 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In J Kigel, G Galili, eds, *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York, pp 237-271.
- Vidigal, D.S., Willems, L., van Arkel, J., Dekkers, B.J., Hilhorst, H.W. & Bentsink, L.** 2016. Galactinol as marker for seed longevity. *Plant Science* 246, 112-118.
- Wang, X.** 1989. Substance oxidation, another reason for recalcitrance? The project on handling and storage of recalcitrant and intermediate. Rome: IPGRI, 59p
- Wang, J. W.N & Wu, J. Y.** 2005. Nitric oxide is involved in methyl jasmonate-induced defense responses and secondary metabolism activities of *Taxus* cells. *Plant and Cell Physiology*, Kyoto, v. 46, n. 6, p. 923-930.
- Walters, C., Hill, L.M., Wheeler, L.M.** 2005. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. *Integrative and Comparative Biology* 45(5) 751-758.
- Walters K,R., Pan, Q., Serianni, A.S., Duman, J.G.** 2009. Cryoprotectant biosynthesis and the selective accumulation of threitol in the freeze-tolerant Alaskan beetle, *Upis ceramboides*. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 16822-16831. doi:10.1074/jbc.M109.013870
- Whitehead, C.S. & Swardt, G.H.** 1982. Extraction and activy of polyphenoloxidase and peroxidase from senescing leaves of *Protea nerifolia*. *South African Journal of Botany*, Pretória, v. 1, p. 127-130.
- Wolkers, W.F., Alberda, M., Koornneef, M., Léon-Kloosterziel, K.M. & Hoekstra, F.A.** 1998. Properties of proteins and the glassy matrix in maturation-defective mutant seeds of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(2): 133-143.
- Yobi, A., Wone, W.M.B., Xu, W., Alexander, D.C., Guo, L., Ryals, J.A., Oliver, M.J., Cushman, J.C.** 2012. Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of *Selaginella* reveals insights into the resurrection trait. *The Plant Journal* 72: 983-999.
- Zimmer, P.D.** 2012. Fundamentos da qualidade da semente. In: Peske, S. T.; Villela, F. A.; Meneghelli, G. E. (Ed.). *Sementes:fundamentos científicos e tecnológicos*. Pelotas: UFPEL. p. 106-160.

## Capítulo 2

**Physiological and metabolic responses of immature and mature seeds of *Libidibia ferrea*  
((Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) under contrasting storage temperatures**

Artigo a ser submetido ao periódico “Brazilian Journal of Botany”  
(A formatação do texto, segue as normas para publicação do periódico)

**Physiological and metabolic responses of immature and mature seeds of *Libidibia ferrea* ((Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) under contrasting storage temperatures**

ROSELI BETONI BRAGANTE<sup>1\*</sup>, ALINE FORGATTI HELL<sup>2</sup>, JOÃO PAULO NALDI SILVA<sup>3</sup>,  
DANILO DA CRUZ CENTENO<sup>3</sup>, CLAUDIO JOSÉ BARBEDO<sup>4</sup>; RITA DE CÁSSIA LEONE  
FIGUEIREDO-RIBEIRO<sup>4</sup>

1 Graduate Student in Plant Biodiversity and Environment, Botanical Institute, São Paulo - SP, Brazil, e- mail: [roselibetoni@yahoo.com.br](mailto:roselibetoni@yahoo.com.br) 2 Graduate Student in Biotechnoscience, 3 Federal University of ABC, São Bernardo do Campo, Brazil. 4 Institute of Botany, São Paulo – SP.

**ABSTRACT:** *Libidibia ferrea* is a leguminous tree species with seedstolerant to desiccation and physical dormancy when mature.In this work,immature and matureseeds collected from trees were driedand stored at-18°C and25°C under continuouslight or darkness for1, 2, 6 and 12 months andevaluated with respect tomoisture content, germination, respiration andmetabolomic. At the beginningof the storage period, seeds ofboth stageshowedhighO<sub>2</sub> consumptionand low CO<sub>2</sub>emission, due possibly to oxidative processes, which were reducedafter both drying and storage. This could explain thehigher viabilityof mature seeds stored at 25 °C and-18 °C, whilethe immature ones deteriorate, mainly at 25°C. The presenceor absence oflight did notaffect substantiallythe seed physiology during storage. Metabolomic analysis revealed a decrease in the proportion of some intermediates of the tricarboxylic acid cycle, such as citric and malic acids, in mature seeds, indicating a metabolic switch. After artificial drying, immature seeds showed equal proportions of malate, citrate and high levels of reducing sugars and amino acids, which could indicate an active metabolism. However, these compounds were not observed in mature seeds. Our results indicate that the primary metabolism of *L. ferrea* seeds is decreased at seed maturity, similar to what occurs in classic orthodox seeds, while the immature ones are comparable to seeds with recalcitrant behavior. For better preservation, matureseeds of *L. ferrea* should be stored for about 12 months at -18 °C.

**Key words:** Conservation, ironwood, metabolomics, respiration.

**RESUMO:** *Libidibia ferrea* é uma leguminosa arbórea com sementes tolerantes à dessecação e dormência física quando maduras. Neste trabalho, sementes imaturas e maduras coletadas de árvores foram secas e armazenadas a -18 °C e 25 °C, sob luz contínua ou escuro por 1, 2, 6 e 12 meses e avaliadas quanto ao teor de água, germinação, respiração e metabolômica. No início do período de armazenamento, sementes de ambas as fases mostraram alto consumo de O<sub>2</sub> e baixa emissão de CO<sub>2</sub>, devido possivelmente a processos oxidativos, que foram reduzidos após a secagem e armazenamento. Isto poderia explicar a maior viabilidade de sementes maduras, armazenadas a 25 °C e a -18 °C, enquanto as imaturas deterioraram-se, principalmente a 25°C. A presença ou ausência de luz não afetou substancialmente a fisiologia de sementes durante o armazenamento. Análise metabolômica revelou diminuição na proporção de alguns intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, como ácidos cítrico e málico, nas sementes maduras, indicando mudança metabólica nessa fase. Após a secagem artificial, sementes imaturas mostraram proporções iguais de malato, citrato e altos níveis de açúcares redutores e aminoácidos, que poderia indicar um metabolismo ativo. No entanto, estes compostos não foram observados nas sementes maduras. Nossos resultados indicam que o metabolismo primário de sementes de *L. ferrea* é reduzido na semente madura, similar ao que ocorre em sementes ortodoxas clássicas, enquanto nas imaturas é comparável a sementes com comportamento recalcitrante. Para melhor conservação, sementes maduras de *L. ferrea* devem ser armazenadas por cerca de 12 meses a -18 °C.

**Palavras-chave:** Conservação, metabolômica, pau-ferro, respiração.

## INTRODUCTION

Storage of seeds is an important tool for *ex situ* conservation, however it is crucial to understanding the behavior of seeds in respect of tolerance to desiccation and freezing, storage capacity, longevity and the physiology of deterioration (Bailly 2004, Waterworth et al. 2015, Costa et al. 2015). Seeds of some species can maintain viability for thousands of years, representing an important feature for plant survival (Sallon et al. 2008). However, the longevity of seeds can be regulated by how the maturation process advanced when they were dispersed from the mother plant. An incomplete process can result in both low seed germination and short persistence in seed banks (Kermode 1990, Barbedo et al. 2013).

Decreasing seed water content and storage under low temperatures are strategies commonly used to preserve seeds and allow retention of seed viability for long periods since metabolism and degradation reactions are decreased under such conditions (Delouche 1968, Popinigis 1977, Bewley et al. 2013, Marcos Filho 2015). However, the reduction of water content is recommended only for seeds that tolerate desiccation and can be stored in the dried state under low relative humidity – around 15% – and sub-zero temperatures, generally -18 °C (Roberts 1973, FAO 2013). In contrast to this orthodox behavior, seeds that do not tolerate the sharp loss in water content are named recalcitrant and have more difficulties to long-term storage. There is also a third group of seeds, which shows an intermediate behavior (Roberts 1973, Mai-Hong et al. 2006, Usberti et al. 2006). Orthodox seeds survive drying until low water contents while some seeds do not survive after appreciable drying, but ‘low’ and “appreciable” have rather nebulous definitions (Walters 2015). Therefore, there is great variation of responses within each of these groups, leading to some authors to consider the existence of different levels of recalcitrance (Pammerer et al. 2003).

The sharp reduction of water content is observed during late maturation of orthodox seeds leads to several changes in transcriptome and metabolome levels, characterizing the quiescent stage (Barbedo & Marcos Filho 1998, Fait et al. 2006, Angelovici et al. 2010). These changes generally

coincide with a gradual increase in seed longevity (Chatelain et al. 2012, Verdier et al. 2013). Late embryogenesis abundant proteins (LEA) and non-reducing sugars, such as sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs), have been shown to accumulate to relatively high levels during this period (Hoekstra et al. 2001, Baud et al. 2002, Angelovici et al. 2010). RFOs act by preventing sucrose to crystallize allowing the formation of the glassy state of the water, essential for survival of dry seeds while maintaining structural and functional integrity of the macromolecules (Steadman et al. 1996). Storage of lipids also fill up the cells and offer resistance against cellular collapse upon drying (Leprince et al. 2000).

The formation of a glassy state is essential for the longevity of cells in the dehydrated state. The lower viscosity of the vitreous state restricts molecular movements and diffusion of substrates needed for other chemical reactions (Buitink & Leprince 2008, Colville & Kranner 2010, Leprince & Buitink 2010, Bewley et al 2013, Walters 2015). Therefore, it is believed that degradative processes are reduced under this condition. Free cyclitols and galactosyl cyclitols are also accumulated in some seeds, with similar behavior and that do not contain large amounts of RFOs. Therefore, cyclitols also have been proposed to contribute to the structural stability of organelles, membranes, enzymes and other macromolecules, and the glassy state formation (Obendorf 1997, Peterbauer & Richter 2001).

The point of physiological maturity and the ideal time for harvesting seeds have been a difficult task for many species and require more investigation. According to Berjak & Pammerer (2013), the storage behavior of seeds is related to the degree of species-specific embryo development when they are shed. For other authors, the recalcitrant behavior could result from premature shedding by the mother plant (Barbedo et al. 2013, Newton et al. 2013, Verdier et al. 2013). Therefore, considering a continuous gradient between recalcitrant and orthodox seeds, analyzing immature orthodox seeds could provide evidences of physiological and metabolic traits involved in seed behavior during storage.

*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) basionym *Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth. in Mart., is known as leopard-tree, “pau-ferro or jucá” (Querioz 2010). *L. ferrea* is a legume tree species from neo-tropical forests, with seeds, bark and leaves used in folk medicine for several therapeutically purposes (Sawada et al. 2014). *L. ferrea* has black color pods, smooth and indehiscent bacoid legumes and endospermic orthodox seeds (Lewis 1987, Barroso et al. 1999, Lorenzi 1992, 2000). When mature, these seeds germinate only after scarification because exhibit dormancy at ripening, caused by the impermeability of the seed coat to water (Crepaldi et al. 1998, Maia 2004, Lima et al. 2006). In this type of dormancy the seeds are viable and do not germinate even under favorable conditions because the tissue surrounding exert an impediment that cannot be overcome. This is known as dormancy imposed by the integument (Grus et al. 1984, Lewis 1987, Crepaldi et al. 1998, Lopes et al. 1998, Barroso et al. 1999, Fowler & Bianchetti 2000, Biruel et al. 2007, Matos et al. 2015).

Seeds that have impermeable seed coat to water are usually of high natural longevity (Zanon & Ramos 1986) and may be packed in permeable containers and stored in uncontrolled environments (Silva & Moraes 1986). In this condition, the seeds of *L. ferrea* can remain viable for more than 15 months (Lorenzi 1992). The maintenance of *L. ferrea* seeds inside the pods is a viable alternative for at least short-term storage, between two consecutive years of collecting. The pods are very woody and extremely hard and probably can protect seeds of environmental variations (Grus et al. 1984, Medeiros Filho et al. 2005, Lima et al. 2006, Biruel et al. 2007).

The seeds of *L. ferrea* are composed mainly of carbohydrates, particularly galactomannan, accumulated in the endosperm as energy source, and possibly preventing protein denaturation during dehydration, due to its high capacity to retain water (Dias et al. 2013, Lopes et al. 2013). Studies on maturation and storage of *L. ferrea* seeds were not found in the literature. In this study, we analyzed immature and mature seeds of *L. ferrea* in order to outline the metabolic processes involved in their storage potential. The aim was primarily to understand if the metabolism of these seeds is shutdown during maturation, as expected for classic orthodox seeds. In

addition, this study may contribute to the development of technologies for long-term storage of seeds in gene banks as a strategy for the conservation of wild species from neo-tropical forests.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material

Immature and mature fruits of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz were collected in a planted population (Figure 1) located in the Campus of the Federal Institute of Education, Science and Technology of the Triângulo Mineiro - Campus Uberaba (IFTM) in Uberaba-MG, Brazil ( $19^{\circ} 38' 27.19''$  S  $47^{\circ} 56' 56''$  W, 717m altitude). A voucher specimen (SP 474928) of this species was deposited in the SP Herbarium of the Botanical Institute in São Paulo, SP, Brazil.

Fruit and seed maturation was monitored from flowering (November 2013) to shedding (April to May 2014), in 19 individuals. We used only inflorescences with at least three opened flowers. Immature seeds were obtained from fruits harvested directly in trees and mature seeds were obtained from the ground, not exceeding 48 h after shedding. The immature seeds were removed by hand from the pods. Fruits and seeds obtained for each maturation stage were classified according to the color and hardness of the seed coat and characterized using physical and physiological parameters as summarized in figure 1. These seeds were named fresh seeds. Samples of seeds of each stage were dried in an oven with forced air at  $40^{\circ}\text{C}$  until they reach water content of approximately 10%, constituting the group of dried seeds.

The dried seeds were stored at  $25^{\circ}\text{C}$  and  $-18^{\circ}\text{C}$ , in two light regimes, constituted by continuous darkness and continuous light, respectively in black and transparent gerbox® for 1, 2, 6 and 12 months. After each storage period, the seeds were evaluated for moisture content, dry mass, germination and normal seedlings, respiratory rates and metabolic profile as described below.

### Fruit and seed analysis

The water content (percentage, wet basis) and seed dry mass ( $\text{gDM seed}^{-1}$ ) were determined gravimetrically in an oven at  $103^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  for 17 h, according to ISTA (2015), using

three replicates of 5 seeds each. The seed water potential was measured with a Decagon WP4 potentiometer (Pullman, USA) based on the dew point temperature of the air after equilibrium with the sample, according to Bonjovani & Barbedo (2008).

Mature seeds, fresh and dried, that have impermeable coats, were scarified mechanically to overcome dormancy (Coelho et al. 2010). Germination tests were carried out in three replicates of 15 seeds each, using rolls of Germitest® paper previously moistened with tap water, with two sheets for the base and one for the covering (Lima et al. 2006; ISTA 2015). The rolls were maintained in a germination chamber ( $25 \pm 1$  °C) and were evaluated every 2 days until 30 days, when there was stabilization of germination (Lima et al. 2006). The percentage of germinated seeds (protrusion of at least 5 mm of primary root) and normal seedling development (seedlings with at least 1 cm in length and no visual malformations) was also registered. Non-germinated seeds at the end of the test were soaked and analyzed for cellular leakage contents to be considered deteriorated or dead.



Figure 1.A.*Libidibia ferrea*adult plant from the Campus of the Federal Institute of Education, Science and Technology of the Triângulo Mineiro - Campus Uberaba (IFTM) indicating in detail; B:inflorescence,C. immature pods (green) and mature pods (brown), D. immature (Im) and mature (M) seeds. Scale 1cm.

## Respiratory Rates

The consumption of oxygen ( $O_2$ ) and carbon dioxide ( $CO_2$ ) production were determined in the analyzer Model 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsburg, USA) using three replicates of ten seeds each, following the methodology described by Lamarca & Barbedo (2012).

The respiratory rates of the seeds were estimated in sealed glass flasks (600 ml) with perforated lids, forming holes covered with a rubber septum. The electrodes were inserted inside the flasks, through the septum, where the air samples have been taken. The closure of packaging has been determined as the start of the experiment, the time zero corresponding to normal atmosphere (21% oxygen and 0.03% carbon dioxide). The  $O_2$  consumption and  $CO_2$  production in packaged seeds were estimated by the difference between the measured values and the normal atmosphere. After each measurement, the flasks were opened for a few minutes to re-balancing with the normal atmosphere and then closed again to continue the experiment. Considering and local atmospheric pressure as 0.90 atm values obtained in volume percentage of  $O_2$  or  $CO_2$  were converted to partial pressure of gas, according to the formula  $p_1 / P = v1\% / V\%$  (Feltre, 1982), where :

$p_1$  = partial pressure of gas (atm);

$P$  = local atmospheric pressure (atm = 0.90);

$v1\%$  = gas volume in percentage;

$V$  = total volume% (= 100%).

Next, based on the volume of flasks (volume of flasks - volume of seeds) and recorded temperature in each evaluation, the data have been converted to micromol  $O_2$  and  $CO_2$ , by the equation of Clapeyron,  $pV = nRT$  where:

$p$  = partial pressure of gas (atm)

$V$  = total volume of flasks (L)

$n$  = number of moles of gas

$R$  = gas constant (0.082 atm L mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)

$T$  = temperature (in Kelvin)

The values obtained in the evaluations were summed and divided by the total dry mass of the seed sample and the number of days when the seeds remained in packaging to give a value expressed in micromoles per gram of dry weight per day (MS  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ).

It was also calculated the difference between  $\text{O}_2$  consumption and  $\text{CO}_2$  emission, for estimation of the  $\text{O}_2$  consumed and not involved in aerobic respiration (here named non-respiratory  $\text{O}_2$  - NRO<sub>2</sub>).

### **Extraction and analysis of the metabolic profile**

Seed samples of each stage (20 mg six replications of 10 seeds) were extracted in 500  $\mu\text{L}$  solution of methanol: chloroform: water (12 : 5:1 v/v) and 50  $\mu\text{L}$  adonitol (0.2mg ml<sup>-1</sup>) added as internal standard for quantification. The mixture was stirred and incubated in a dry bath (60 °C, 30 min), centrifuged (13,000 g, 2 min) and 350  $\mu\text{L}$  of the supernatant transferred to another flask, which was also added the same volume of water. Centrifugation was repeated after incubating at room temperature for 5 min, and 300  $\mu\text{L}$  of the separated upper phase was dried completely. The dry residue was re-dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of pyridine and derivatized with 50  $\mu\text{L}$  of BSTFA (N, O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) in a dry bath (75 °C, 60 min), according to Suguiyama et al. (2014). Finally, samples were injected into a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (Agilent GC 6890, 5973N MSD). Chromatography was performed using a MS HP-5ms column (30m x 0.25m x 0,23 $\mu\text{m}$  - Supelco, USA). The injection temperature was set to 230 °C, the interface at 250 °C and the ion source set at 150 °C. Helium was used as carrier gas with flow rate of 1  $\text{mL min}^{-1}$ . The analyzes were performed according to the following schedule: 5 minutes of heating isothermal at 70 °C, followed by an oven temperature elevation rate of 5 °C min<sup>-1</sup> to 310 °C, and 1 min final heating 310 °C. Mass spectra were recorded at 2s<sup>-1</sup> scans with a mass range of 50-600  $m/z$ . The chromatograms and mass spectrometry data were analyzed using Chemstation

software (Agilent Technologies, USA). The peaks were identified and compared with authentic standards with the NIST 08 Mass Spectral Library (National Institute of Standards and Technology) and the database Golm metabolome Database- GMD (Hummel et al. 2010). Metabolic data were reported here as metabolite relative content, commonly used in metabolic profile studies to facilitate the interpretation of large data sets.

### **Extraction and analyses of soluble carbohydrates**

Analyses were performed from seeds collected and frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C, in six replicates of 10 seeds, with subsequent homogenization of plant material in liquid nitrogen with the aid of mortar and pestle. Soluble carbohydrates were extracted with boiling 80% ethanol (v/v) for 15 min. The supernatants were recovered after centrifugation (1000 g, 15 min) and the residues were manually homogenized and re-extracted twice in boiling 80% ethanol for 15 min. The resulting ethanolic supernatants were combined and considered as the soluble sugar extracts. The amounts of total carbohydrates were determined colorimetrically by the phenol-sulfuric acid method (Dubois et al. 1956), using glucose as standard and results were expressed as mg per g of dry mass (mg g<sup>-1</sup> DM). The soluble sugars extracts were deionized through anion exchange columns and analyzed by high-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD). The HPAEC/PAD system (Dionex ICS-3000, USA) was composed of a CarboPac PA-1 column (2 x 250 mm-Dionex, USA) and a gradient of 150 mM sodium hydroxide (eluent B) and water (eluent A) with the following programme: 0-25 min, 66.7% eluent B; 25-30 min, 100% eluent B; 30-35 min, 66.7% eluent B, with flow rate of 0.25 mL min<sup>-1</sup>. Sugars were identified by co-chromatography with authentic standards (Sigma-Aldrich Co., USA).

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed separately with the control data, with and without drying, in a completely randomized design in a factorial 2x2 (stage x drying). Storage data only with dry seeds was carried out in factorial 2 x 2 x 4 (temperature x light condition x storage) within

each stage, with three replicates for all evaluations. The results were submitted to analysis of variance and the means compared by Tukey test at 5% probability (Santana & Ranal 2004).

In the representations of control data (without drying) uppercase letters compare the drying within each stage and lowercase letters compare drying within each stage. In storage treatments, the lowercase letters compare the averages of temperatures within the age and lowercase letters compare mean stages in temperature. When significant, greek letters compare average of light and dark.

The principal component analysis (PCA) was performed for sugars, sugar alcohols, amino acids using the PAST software (Hammer et al. 2001), included in the analysis only compounds present in all treatments.

## RESULTS

The maturation process of *Libidibia ferrea* seeds is relatively long (*ca.* 6 months). Immature seeds, without dormancy coat, had average 59% water content and  $0.096 \text{ g.seed}^{-1}$  of dry mass. Germination percentage was 68%, with 46% of normal seedling development (Figure 2). Drying to 13% did not affect neither germination nor normal seedling development. Mature seeds dispersed with 15% water content and  $0.104 \text{ g.seed}^{-1}$  dry weight presented 82% of germination. Dried seeds up to 12% had 89% of germination. The percentage of normal seedlings was significantly higher in mature seeds (72%) than immature ones (46%), independent of the drying.

During storage, the immature seed water content was significantly different; fluctuations in water content were followed by changes in water potential, more negative values for seeds stored at 25 °C (Figure 2). Immature seeds began to show reduction in viability from the first month of storage with 43% of germination (Figure 3). After a year of storage at 25 °C in the light, immature seeds lost much of its viability (Figure 3).

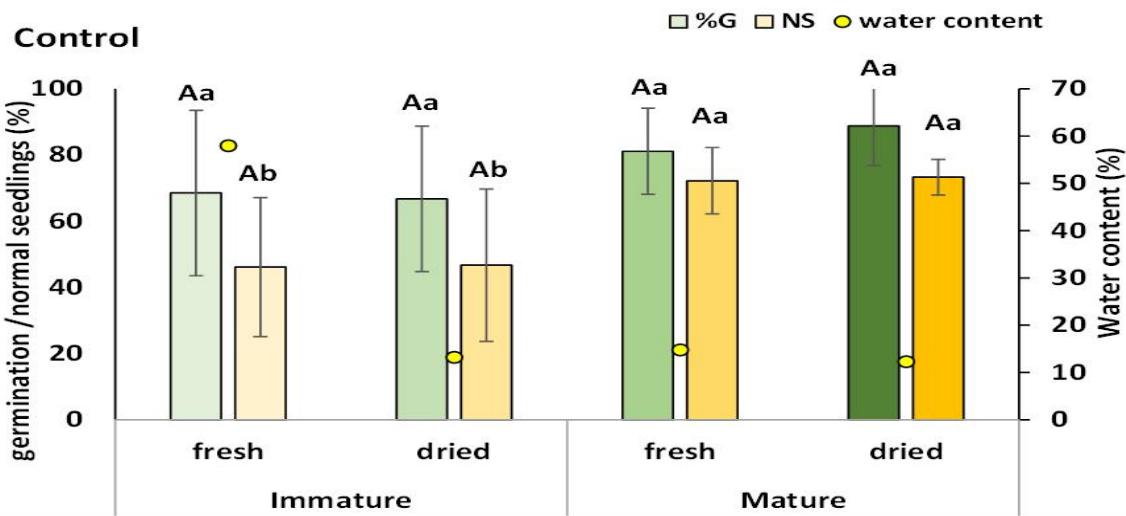


Figure 2. Water content, percentage of germination and normal seedlings of immature and mature *Libidibia ferrea* seeds fresh and dried until 13% without storage treatments. Yellow circle represent the water content (●). Green columns represent the percentage of germination of: immature fresh seeds (■), immature dried seeds (■), mature fresh seeds (■) and mature dried seeds (■). Orange columns represent the percentage of normal seedling of: immature fresh seeds (□), immature dried seeds (□), mature fresh seeds (□) and mature dried seeds (□). Capital letters compare the average of drying within each stage of maturation and lowercase letters compare average of each stage of maturation between drying.

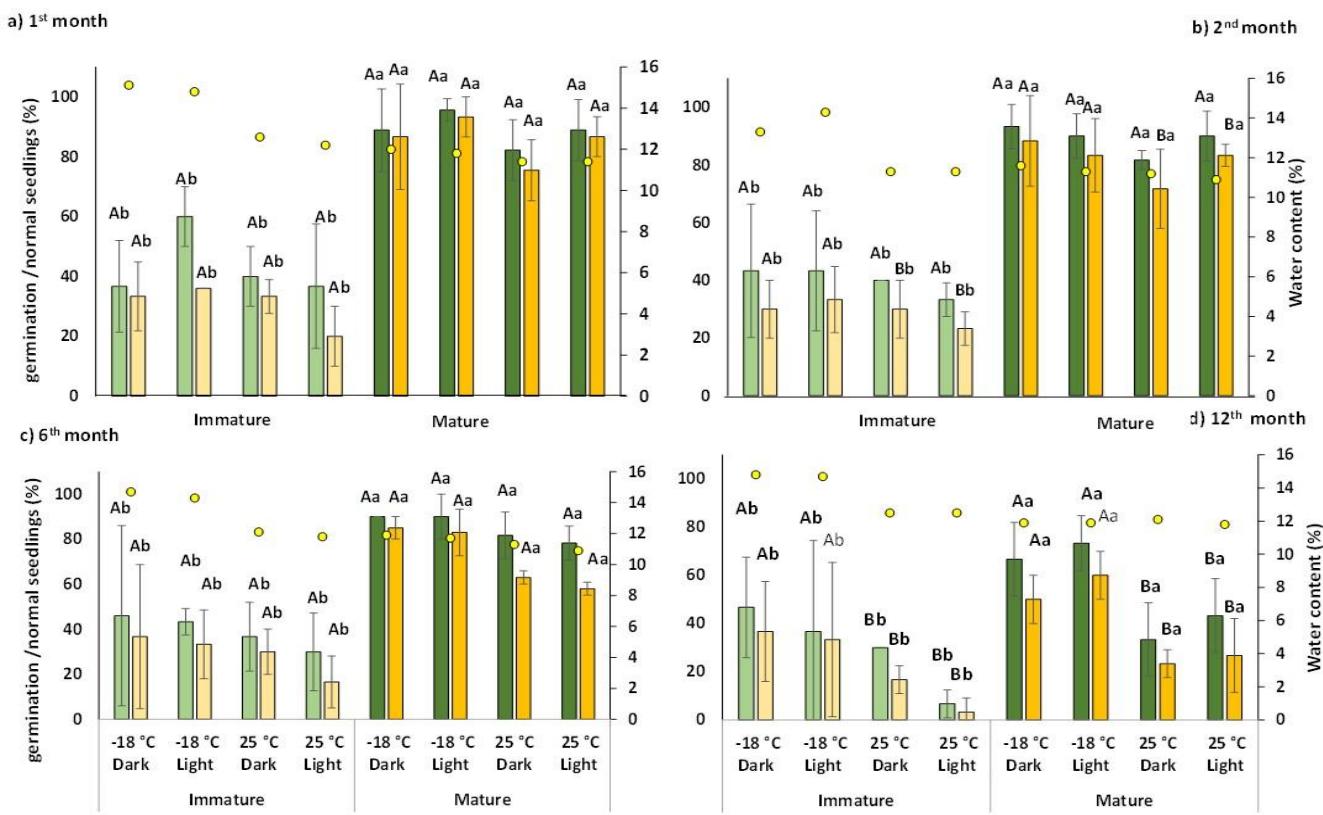


Figure 3. Water content, percentage of germination and normal seedlings from immature and mature *Libidibia ferrea* seeds dried and stored for 1, 2, 6 and 12 months at -18 °C and 25 °C in the light and dark (means and standard deviations). Yellow circles represent the water content (●). Green columns represent the percentage of germination of: immature seeds (■) and mature seeds (■). Orange columns represent the percentage of normal seedlings of: immature seeds (□) and mature (□). Capital letters compare the average of temperatures within each stage of maturation, lowercase compare averages of each stage of maturation within temperature.

The mature seed water content remained around 12% during storage and seed germination was about 87% by the sixth month of storage. From this period, mature seeds also started to show a decrease in germination and normal seedlings rates, mainly at 25 °C. However, for mature seeds, the reductions were significant only after 12 months storage, with averages for germination of 69% at - 18 °C and 38% at 25 °C (Figure 3d). In fact, the reduction in viability during storage of immature and mature seeds were proportionally similar regarding the initial quality of each group, although it was expected that mature seeds did not lose their viability during the study period.

Immature seeds of *L. ferrea* consumed 166  $\mu\text{mol O}_2\text{.gDW}^{-1}\text{d}^{-1}$  and the emission of  $\text{CO}_2$  was 69  $\mu\text{mol CO}_2\text{.gDW}^{-1}\text{d}^{-1}$  prior to drying (Figure 3a). After drying, the consumption of  $\text{O}_2$  was reduced to 29  $\mu\text{mol}$  and emission of  $\text{CO}_2$  to 4,95  $\mu\text{mol}$ . In mature seeds, no significant changes were observed in the consumption of  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  released before and after drying (Figure 4).

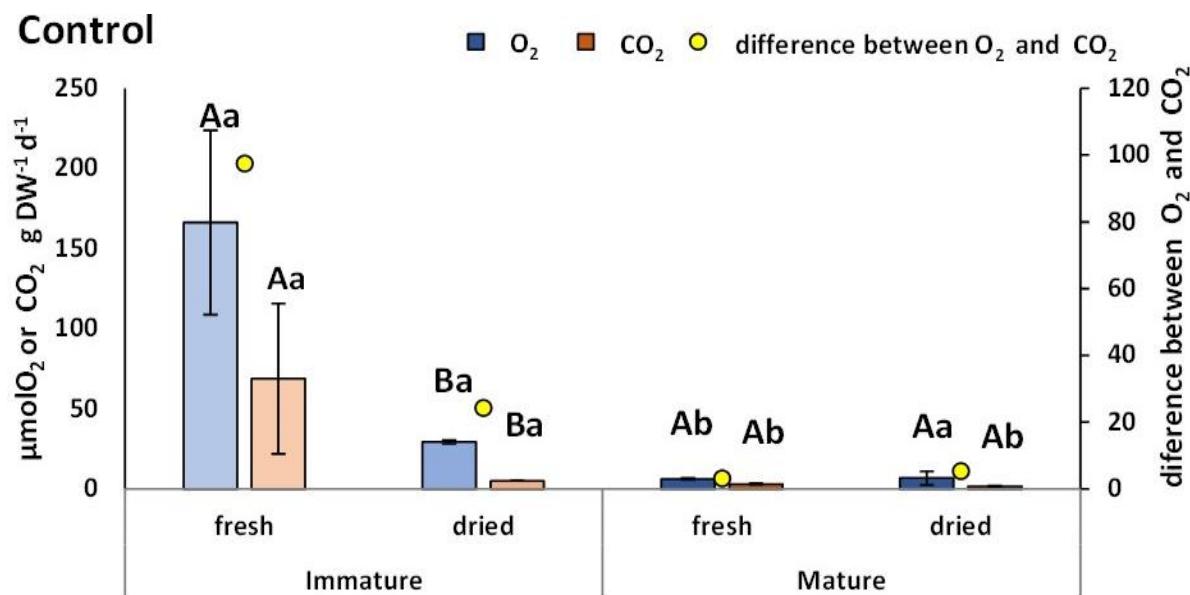


Figure 4. Values of  $\text{O}_2$  consumption ( $\mu\text{mol.gDW}^{-1}\text{d}^{-1}$ ),  $\text{CO}_2$  emission ( $\mu\text{mol.gDW}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) and difference between  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  in immature and mature *Libidibia ferrea* seeds fresh and dried without storage treatments. Yellow circles represent difference between  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  (●). Blue columns represent  $\text{O}_2$  consumption of: immature fresh seeds (□), immature dried seeds (□), mature fresh seeds (■) and mature dried seeds (■). Red columns represent  $\text{CO}_2$  emission of: immature fresh seeds (□), immature dried seeds (□), mature fresh seeds (■) and mature dried seeds (■). Capital letters compare the dry average in each stage and lowercase compare averages stadium in each dry. Values (means and standard deviations).

After 2 and 12 months of storage at 25 °C, both O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> increased in immature seeds (Figure 5). However, these rates were lower than those obtained before drying and storage in the control treatment.

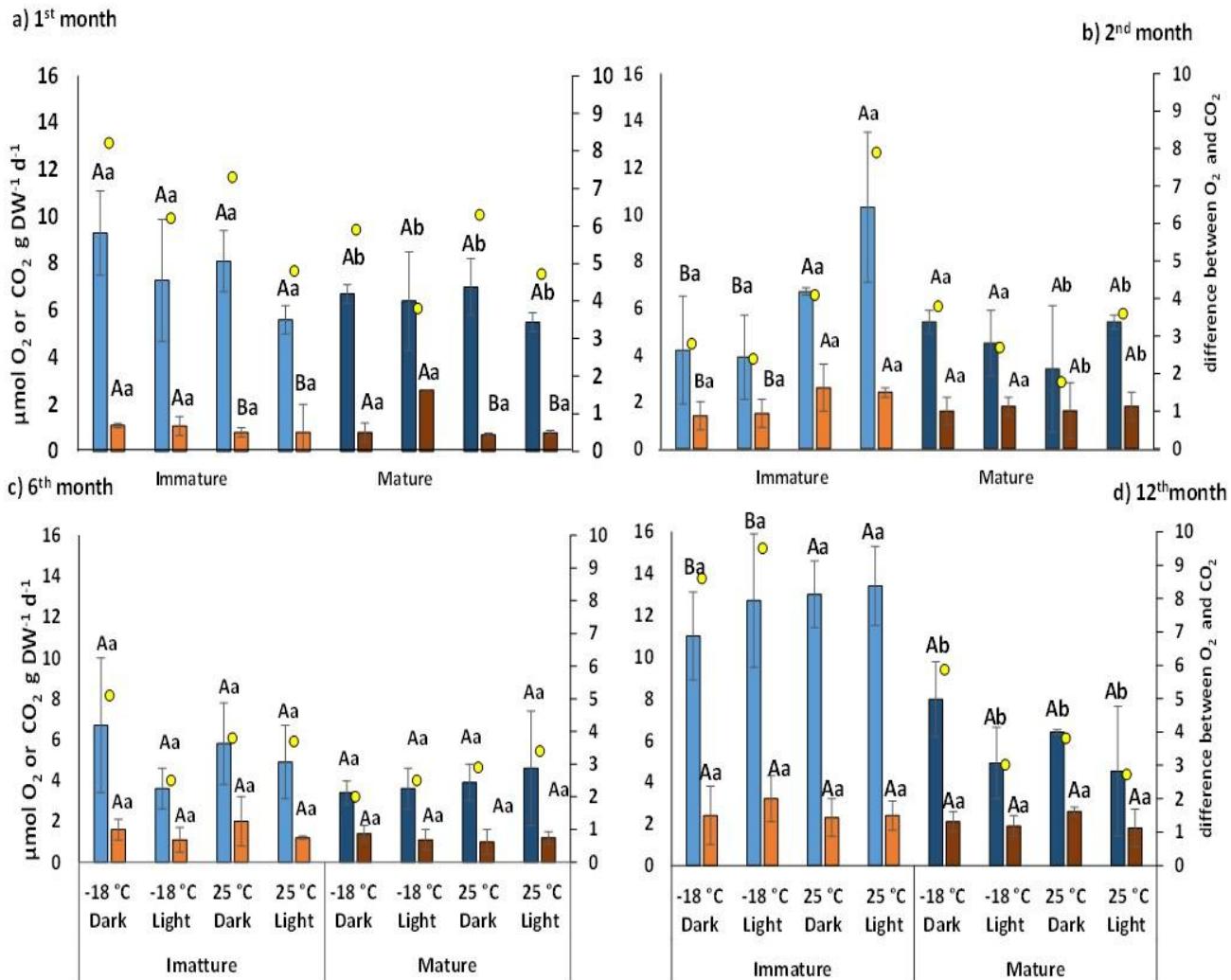


Figure 5. O<sub>2</sub> consumption values ( $\mu\text{mol.gDW}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), release of CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol.gDW}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) and the difference between O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> immature and mature dried seeds of *Libidibia ferrea* stored at -18 °C and 25 °C in the dark and the light for a) 1 month b) 2 months c) and d) 6 months 12 months. yellow circle represents the values of the difference between O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> (●). Blue columns represent the O<sub>2</sub> values of: immature seeds (□) and mature seeds (■). Orange columns represent the CO<sub>2</sub> values of immature seeds (□) and mature seeds (■). Capital letters compare the average temperatures in each stage, lowercase compare averages stadium in temperature. Values (means and standard deviations).

The results of metabolomic analysis of *L. ferrea* seeds revealed that the main changes in the proportion of metabolites correspond to components associated with the primary metabolism, such as organic acids, sugars (including sugar alcohols) and amino acids (Figure 6).

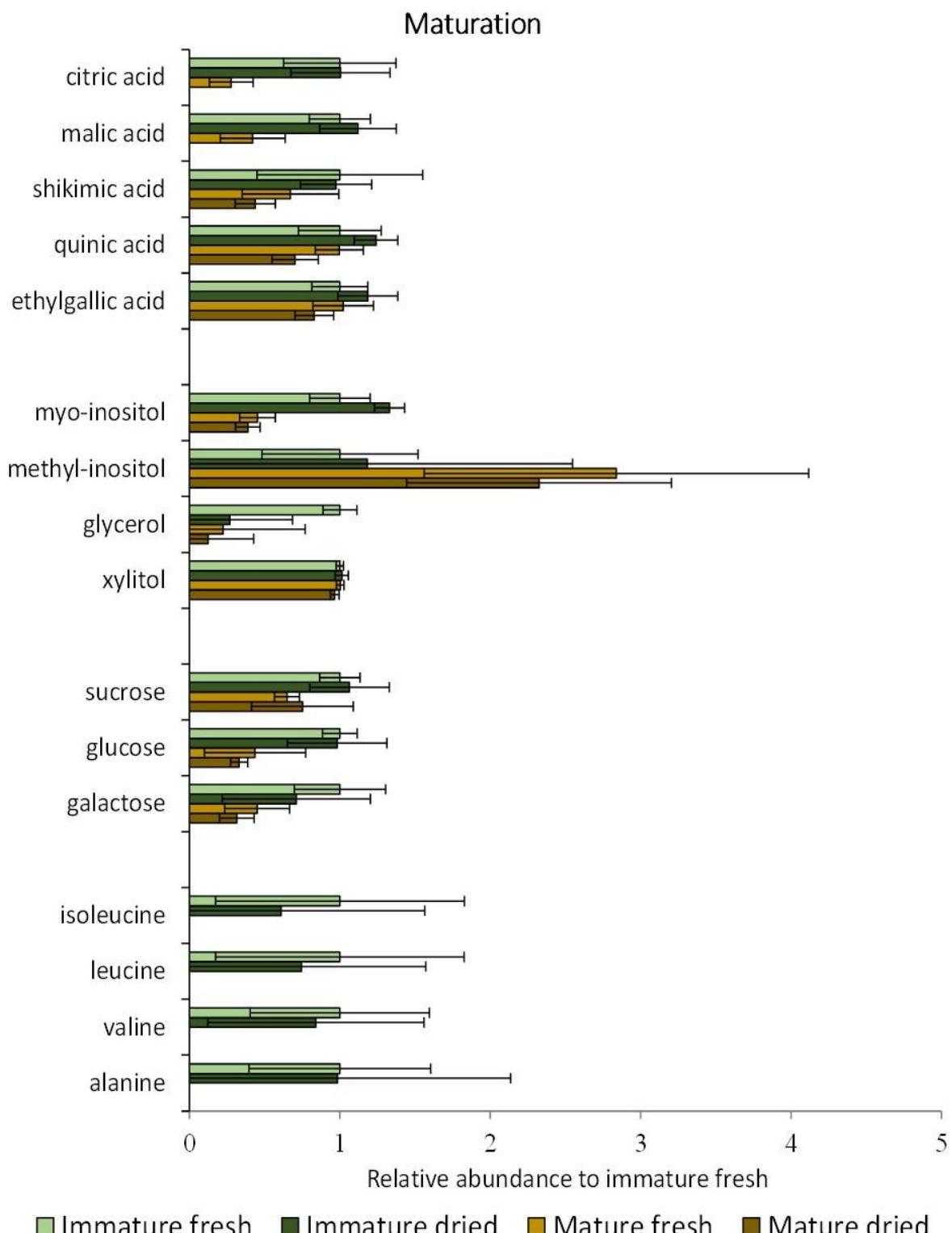


Figure 6. Metabolic profile of *Libidibia ferrea* seeds during maturation. Seeds immature fresh (■), immature dried until 8% of water content (■), mature fresh (■) and mature dried until 8% of water content (■). Compounds were detected by GC/MS. All values were normalized from those found in immature seeds before drying.

In general, the proportion of these compounds decreased in natural drying during seed maturation and increased with artificial drying. Equal proportions of malic and citric acids, high levels of reducing sugars and amino acids were observed in immature seeds after artificial drying. But immature dried seeds had increased proportions of sugar alcohols such as *myo*-inositol and methyl-inositol. Some compounds of the tricarboxylic acid cycle (TCA), as malic and citric acids, involved in respiratory metabolism were observed in lesser proportion.

Shikimic acid, that is a precursor of pathways from secondary metabolism such as quinic acid, ethylgallic acid and several amino acids, had proportions decreased during maturation. But the proportions of amino acids, malic and citric acids were greatly reduced in the mature seeds, preferably after drying. Reducing sugars and sugar alcohols also decreased during maturation. However, some compounds like methyl-inositol increased after natural and artificial drying in mature seeds (Figure 6).

During storage of immature seeds citric acid, TCA intermediate, and ethylgallic acid, intermediates of the secondary metabolism, decreased their proportions at 25 °C, showing a tendency to reduce the metabolism (Figure 7). At storage of mature seeds, TCA intermediaries still do not appear. In the first month of storage all compounds appear in a lesser extent compared to the control. However, when stored at -18 °C for 6 months there was an increase in this ratio compared to other treatments (Figure 8).

The principal component analysis (PCA) of the metabolic profile showed that metabolic changes occurred between each storage period of immature seeds (Figure 7a). Except for the 1<sup>st</sup> month, when seeds stored at -18 °C and 25 °C appeared together, a great metabolic change occurred within 6 months of storage where the samples appear more dispersed at -18 °C and 25 °C. The components 1 and 2 together explained 53% of the variation from immature seeds (Figure 7).

In mature seeds, the PCA also showed metabolic changes between storage steps, not as clear as in immature seeds, but indicating some changes (Figure 7b).

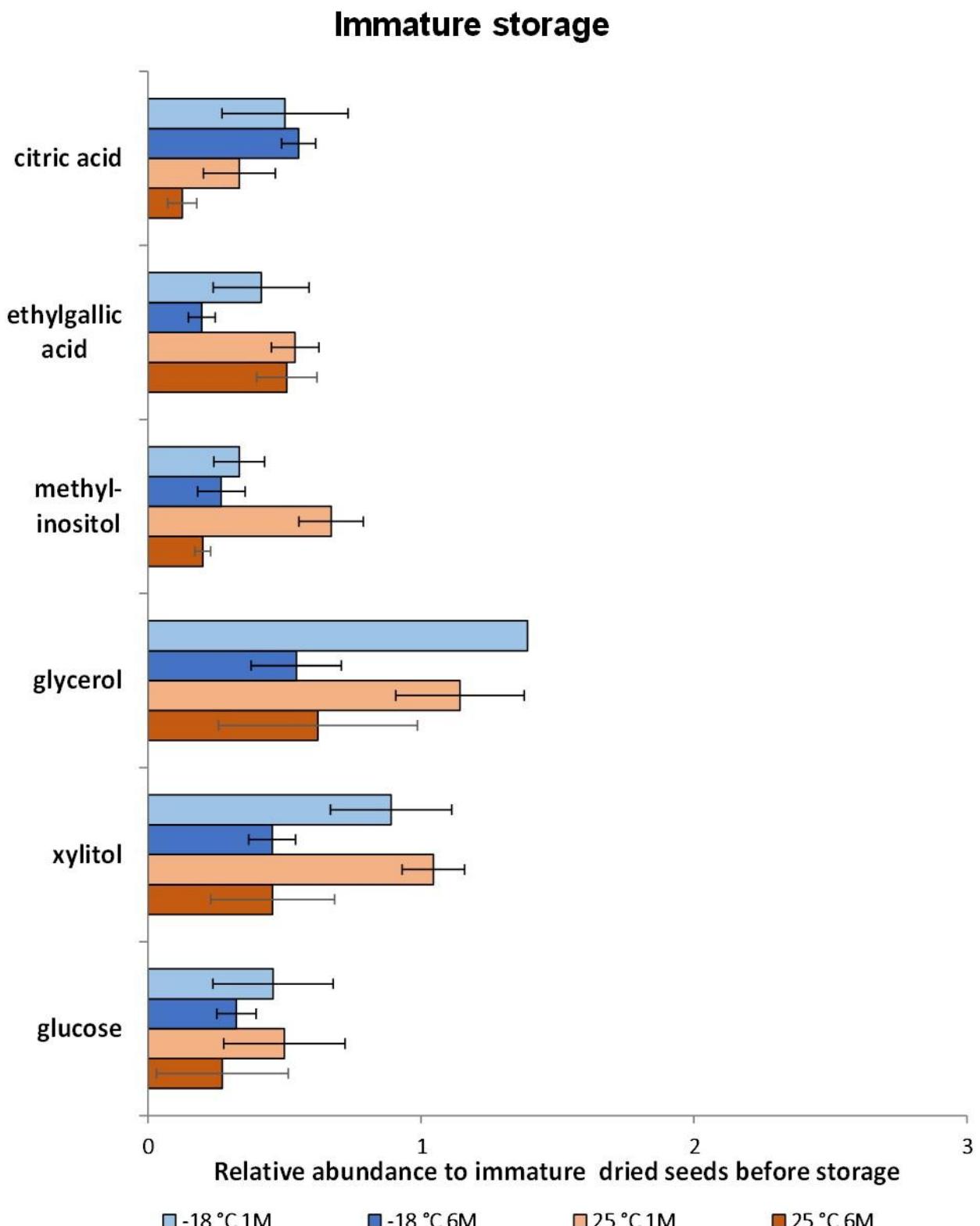


Figure 7. Metabolic profile of immature seeds of *Libidibia ferrea* dried until 8% of water content, stored at -18 °C by 1 (■) and 6 months (■) and 25°C by 1 (■) and 6 months (■). Compounds were detected by GC/MS. All values were normalized from those found in control immature seeds before storage.

Samples of the first month at -18 °C and at 25 °C remained together. Next are control samples, almost mixed with samples stored at 25 °C for 6 months. Samples of -18 °C stored by

6<sup>th</sup> months appear more dispersed than the others. The components 1 and 2 together explain less than 54% of the variation.

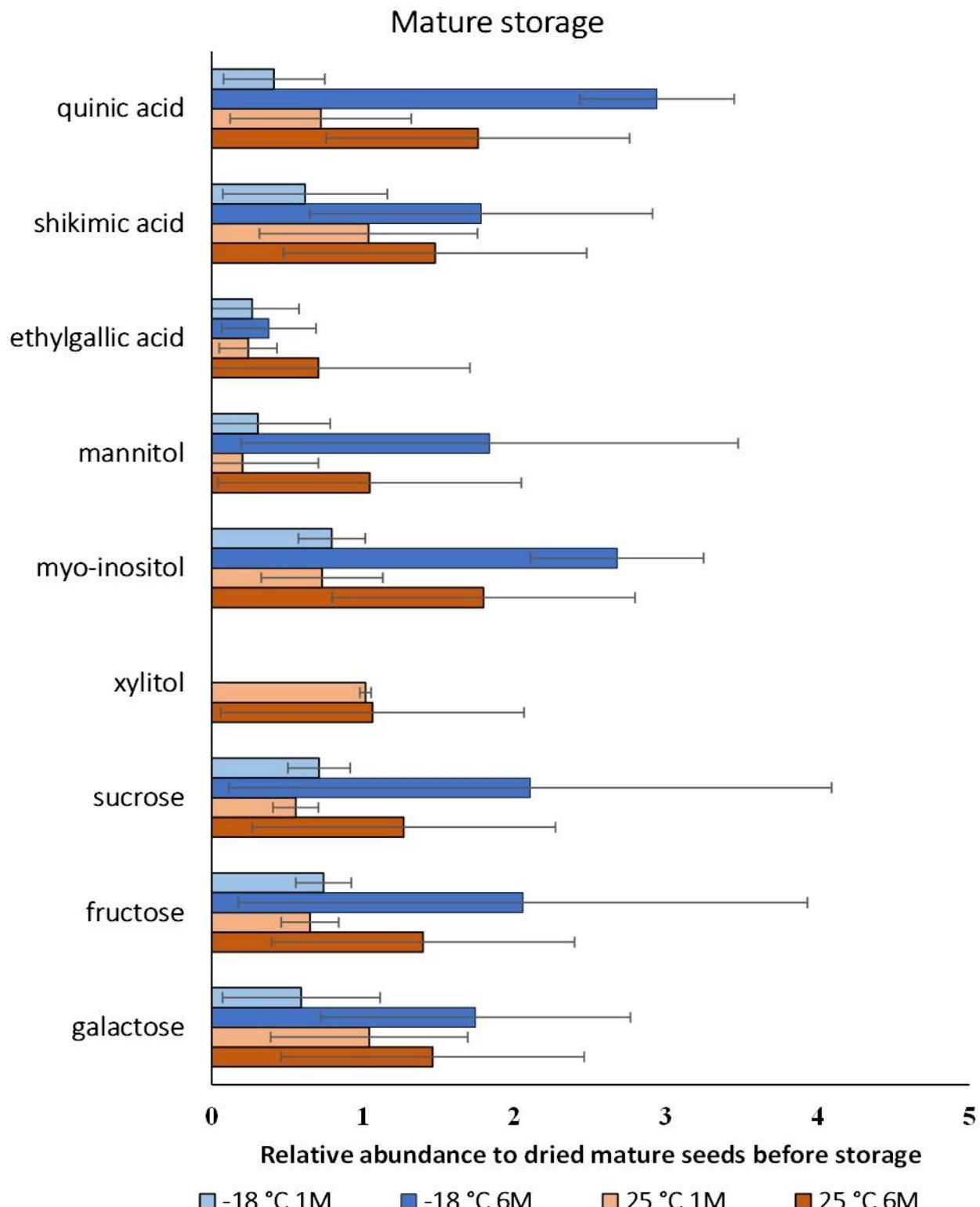


Figure 8. Metabolic profile of mature seeds of *Libidibia ferrea* dried until 8% of water content, stored at -18 °C by 1 (□) and 6 months (■) and 25°C by 1 (□) and 6 months (■). Compounds were detected by GC/MS. All values were normalized from those found in control immature seeds before storage.

The principal component analysis (PCA) of the metabolic profile showed that metabolic changes occurred between each storage period of immature seeds (Figure 9a).

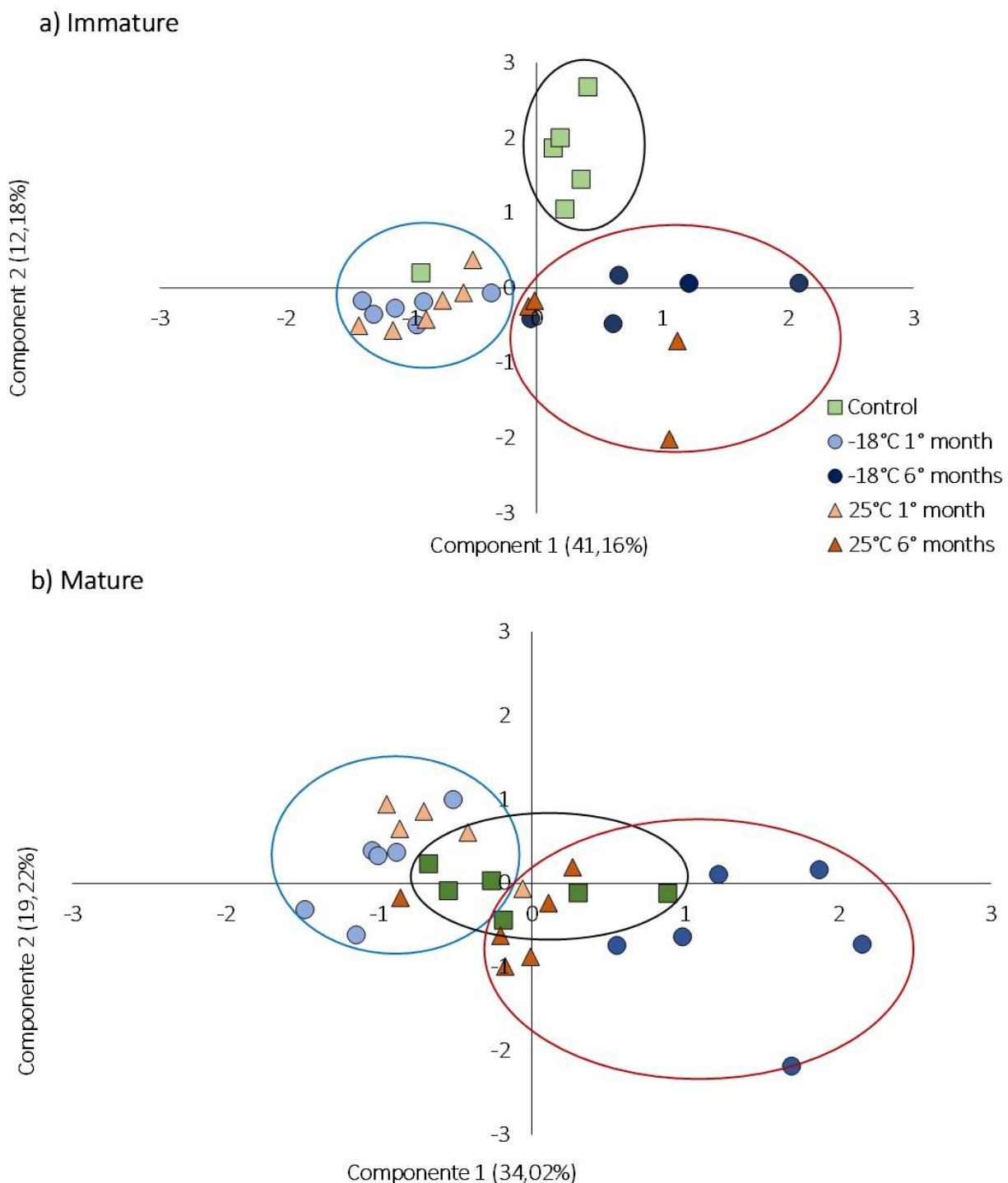


Figure 9. Principal component analysis (PCA) covering the analysis of the metabolic profile of *Libidibia ferrea* seeds a. immature and b. mature. Immature seeds dried control before storage (■), mature seeds dried control before storage (■), and stored at -18 °C for 1 (Δ) and 6 months (▲), and 25°C for 1 (●) and 6 months (●). PCA is shown as the combination of the first two dimensions. Each point represents a separate biological sample.

Except for the 1<sup>st</sup> month, when seeds stored at -18 °C and 25 °C appeared together, a great metabolic change occurred within 6 months of storage where the samples appear more dispersed at -18 °C and 25 °C. The components 1 and 2 together explained 53% of the variation from immature seeds (Figure 9).

In mature seeds, the PCA also showed metabolic changes between storage steps, not as clear as in immature seeds, but indicating some changes (Figure 9b). Samples of the first month at -18 °C and at 25 °C remained together. Next are control samples, almost mixed with samples stored at 25 °C for 6 months. Samples of -18 °C stored by 6<sup>th</sup> months appear more dispersed than the others. The components 1 and 2 together explain less than 54% of the variation.

Soluble carbohydrates of the immature and mature seeds fresh and dried are composed mainly of sucrose and glucose. Fructose is present, but in lower proportions. Cyclitols, raffinose and stachyose were also present, and increased during maturation and drying (Figure 10).

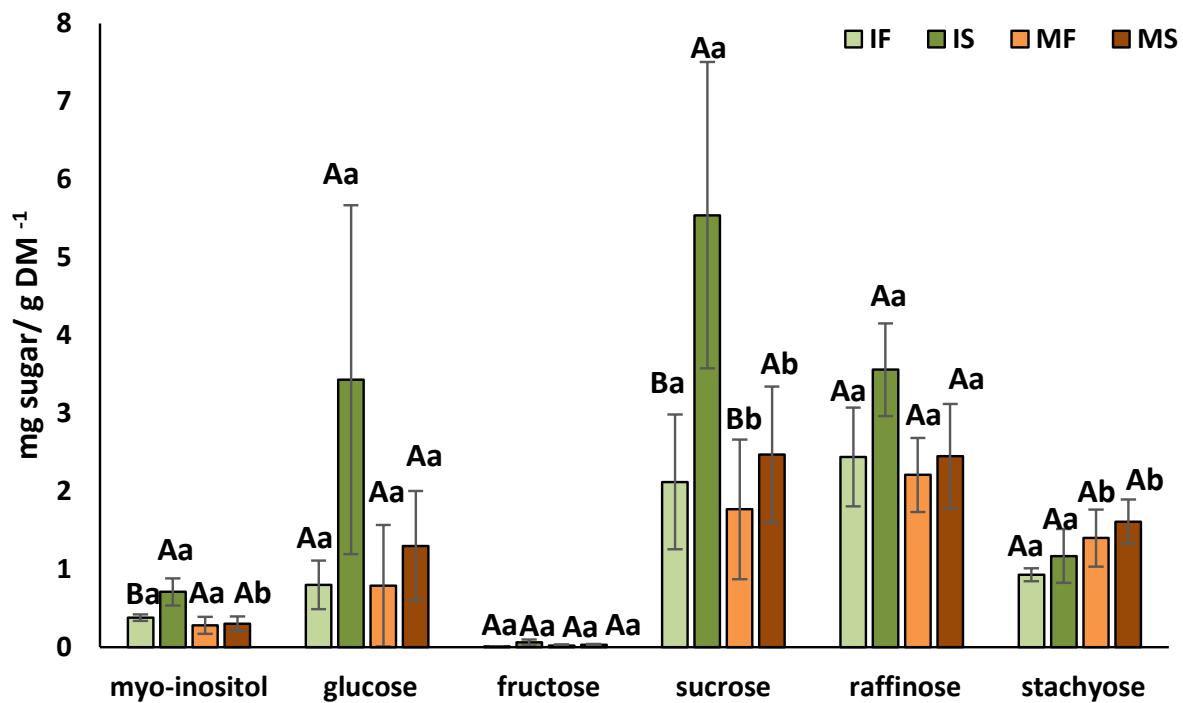


Figure 10. HPAEC/PAD profile of soluble carbohydrates from immature and mature seeds of *Libidibia ferrea* fresh and dried. IF-immature fresh, ID-immature dried, MF-mature fresh, MD-mature dried. Capital letters compare the averages of the stages within each compound, lowercase compare averages within each stage.

## DISCUSSION

The physiological results found with respect the maturation cycle of *L. ferrea* seeds are consistent with the classical pattern described for orthodox seeds. The natural reduction in water content of the seeds during development, particularly close to dispersion, favored the arrest of metabolism to what these seeds are shedding in the dormant or quiescent state. This process is crucial for long-term survival of orthodox seeds after dispersal (Roberts 1973, Kermode 1990, Ooms et al. 1993, Walters 2000, Toldi et al. 2009, Barbedo et al. 2013, Waterworth et al. 2015).

The dry weight of the seeds showed slight increase with advancing maturity. Changes of water content and water potential were related to those observed in water activity within the seeds. Different types of water in the seeds represent different water potentials due to the forces of attraction by water (Vertucci & Ross 1990, Marcos Filho 2015). Despite the dry matter of immature and mature *L. ferrea* seeds did not alter significantly, the water potential of the seeds during maturation changed drastically, including possibly changes in the type of water. For most orthodox seeds, the state of water plays a regulatory role in seed development, especially during critical stages of growth. These seeds are typically dispersed with low water content (10%) which is equivalent to water potential in the range of -150 MPa (Westgate 1994, Walters 2000). After drying to 12%, mature seeds did not change because they had low metabolic activity, resulting in reduced water content. This is an orthodox feature that leads to decreased metabolic activity, which allows maintaining germination ability for large periods (Rajjou & Debeaujon 2008, Barbedo et al. 2013).

Immature seeds have reduced germination percentage after drying. The heterogeneity of the immature lot with seeds at different stages of maturation could explain this result. Large amounts of seeds will never be comprised exclusively of high or low quality seeds but is composed of seeds in different physiological states (Borba et al. 2014, Marcos Filho 2015). During the drying process, it may have been a selection of the more mature seeds and more vigorous group. This selection can provide stabilization in germination thus maintaining the viability of such immature to

mature of up to one year of storage. This result was not expected due to the water activity at 58% water content that would not stand drying (Vertucci & Farrant 1995, Villela & Marcos Filho 1998). The average seed quality decreases, but more vigorous seeds have the capability of maintaining relatively high viability even after prolonged drying and storage. Deteriorating seeds usually occurs in batches with early maturation or inappropriate storage (Borba et al. 2014, Marcos Filho 2015).

It has to be considered the sharp increase in respiratory rates of orthodox seeds, especially from 14 to 15% water, depending on the temperature (Vertucci & Leopold 1984, Vertucci 1990, 1993, Villela & Marcos Filho 1998). In seeds of lettuce and soybean respiration just becomes possible at about -14MPa. Then the rate of respiration increases, more or less linearly with increase in water content, until a potential close to that of the fully hydrated seeds, probably about -1.5MPa (Ibrahim et al. 1981, Vertucci & Leopold 1984). The presence of water is essential for enzyme activity in the seed resulting in increased metabolism and generating energy that enables the axis growth (Carvalho & Nakagawa 2012, Bewley et al. 2013). Then, it is possible to establish a direct relationship between water content, water potential, respiratory and metabolic activity.

Maturation of orthodox seeds is characterized by a switch of metabolic regulation, generally terminated by some degree of drying, which results in a gradual reduction in metabolism, as water is lost from the seed tissues. In contrast, most recalcitrant seeds are dispersed with a high water content being metabolically active and sensitive to drying (Kermode 1990, 1995, Bewley & Black 1994, Barbedo & Marcos Filho 1998, De Castro & Hilhorst 2000). However, according to Barbedo et al. (2013) recalcitrant seeds can be actually immature seeds dispersed. In this way, more active metabolism is expected in early maturation due to the phase of reserve deposition, as well as higher levels of sucrose as a major energy source for this phase with high respiratory activity (Borisjuk & Rolletschek 2009).

The results of carbohydrate analysis showed that the sucrose content was significantly higher after drying immature and mature seeds of *L. ferrea* seeds (Figure 10). These variations during seed maturation were expected because it is tolerant to desiccation. Sugars such as sucrose,

RFOs and cyclitols seem to buffer the water loss and stabilize the polymers during desiccation explaining the tolerance to drying (Hoekstra et al. 2001, Peterbauer & Richter 2001, Kaushik & Rajiv 2003, Vidigal et al. 2016). Although the proportion of stachyose has apparently increased during maturation of *L. ferrea* seeds, any significant differences were detected among treatments.

As mentioned before, developing seeds are very active metabolically presenting high respiratory activity. This increased metabolism correlates with the need of the embryo to obtain energy for the growth and synthesis of reserve compounds (Vigeolas et al. 2003, Borisjuk et al. 2004). The results of immature seeds of *L. ferrea* corroborate this information because they had intense metabolic activity observed by the consumption of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> emissions due to the high water content before drying. Mature seeds, on the other hand, showed low respiratory activity before drying due to the low amount of water available for metabolic reactions.

The higher O<sub>2</sub> consumption ratios in relation to CO<sub>2</sub> release in immature seeds before drying could indicate oxidative processes other than respiration. This O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> different rates were also observed in mature seeds of *Caesalpinia echinata*, which, at room temperature, lost viability within 3 months (Barbedo et al. 2002, Lamarca & Barbedo 2012).

After the artificial drying up to 12% water, the levels of O<sub>2</sub> consumption and CO<sub>2</sub> release in immature and mature seeds of *L. ferrea* were reduced when compared to their respective controls. These results indicate a decrease in metabolic activity, as expected, at this water content (Figure 2b). The rate of cellular activity during storage of seeds varies according to the water content because the water free energy describes the tendency for a chemical reaction at a given temperature (Vertucci & Roos 1993). Analysis of the metabolic profile corroborates these data indicating a less active metabolism at the end of maturation as expected for orthodox seeds (Kermode 1990, Fait et al. 2006, Hell *et al.* personal communication 2016).

Reduction in levels of intermediates of the TCA cycle (citric acid and malic acid) and in intermediates of the phenol metabolism (shikimic and quinic acid) and some organic acids were observed during maturation in the present study. The same was reported in *Arabidopsis* seeds

during maturation with a significant reduction of most of sugars, organic acids and amino acids. The transition from the large accumulation of reserves phase for the drying stage was associated with a metabolic switch, also resulting in the accumulation of different sugars, amino acids, organic acids and derivatives of the shikimate metabolism (Fait et al. 2006). These metabolites, which can play a critical role in water stress, showed greater variation in species tolerant to desiccation as *Selaginellaceae*, *Arabidopsis* and *Erythrina* (Yobi et al. 2012).

Free cyclitols and galactosyl cyclitols also appear to contribute to desiccation tolerance in a similar manner to RFOs (Obendorf 1997, Peterbauer & Richter, 2001), when these are not present (Steadman et al. 1996, Horbowicz et al. 1998, Borges et al. 2006). In seeds, the presence of these molecules results in protection against abiotic stress during germination, drying and storage of seeds (Mello et al. 2011). Our work shows that *L. ferrea* seeds acquire desiccation tolerance throughout maturation.

Although the results indicate a metabolic reduction during maturation, from six months of storage on, there were variations in the proportions of primary metabolism of the compounds even in mature seeds. Dried immature seeds showed a decrease in viability in both storage conditions of 25 °C and -18 °C, with a reduction in the percentage of germination and normal seedlings from the first month of storage. These results were expected to immature seeds since it is believed that these are comparable to the recalcitrant seeds, which also have more active metabolism. Increased metabolic activity of the seeds may have caused major changes in the primary metabolism compounds during storage and thus less viability.

The metabolomic profile, as shown by PCA indicates that after 6 months of storage the viability of immature seeds start to reduce. Although the PCA analysis did not indicate the temperature of 25 °C as a bad condition to store *L. ferrea* seeds, the results of germination and normal seedling in this temperature was significantly worst. Immature seed samples stored for 6 months are shown to be more dispersed than the control and 1 month storage treatments, indicating that the storage time was more important than storage temperature. The most active metabolism of

immature seeds possibly led to a greater variation of the compounds during storage, leaving samples more dispersed at this point of analysis.

Immature seeds of *L. ferrea* do not switch off their metabolism and have difficulties to be stored, especially after 6 months at 25 °C. Thus, it can be compared to recalcitrant seeds, or with *C. echinata* seeds that have viability losses when stored at 25 °C (Barbedo et al. 2002).

The results of mature seeds, after PCA analysis, also show the same trend of increased dispersion of the samples after six months of storage, when the viability was reduced. Due to the low water content at this age, mature seeds presented metabolic switch and greater viability than immature seeds. However, after one year of storage at 25 °C the percentage of germination and normal seedlings in mature seeds were significantly reduced, probably due to the metabolic disorders initiated at six months.

It was expected that an orthodox seed with low metabolic activity, resisted longer in storage. As seen in mature soybean seed germination is maintained 92% after 16 months storage at roomtemperatures (Singh & Gupta, 1982). *Erythrina velutina* seeds can also be stored in a laboratory refrigerator and freezer for 225 days without significant losses of seedling emergence (Silva et al. 2011). These results may indicate that mature seeds of *L. ferrea* were not as mature as expected but only with the process of maturation slightly more advanced than immature seeds.

*L. ferrea* seeds stored for 3 years, inside the fruits, in ambient conditions continue drying until 10% water content, presenting 0.216 g.seed<sup>-1</sup> (data not shown) and 45% of germination and 42% of normal seedlings development. This may indicate that they continue drying inside the pods, after shedding because they are indehiscent (Lorenzi 1992, 2000). Nakagawa et al. (2007) observed increase in dry weight of *Mucuna aterrima* seeds after drying in open and closed fruits. Maximum values were prior achieved for seeds in closed fruit. Immature fruits of *Mucuna* and *Cucurbitaceae* stored in environmental conditions also presented an increase in dry matter content of the seeds after slow drying (Araújo 1982, Alvarenga 1984).

Lima et al. (2006) collected mature seeds of *L. ferrea* with water content of only 7.5%, probably because they were more advanced in the maturity process. Grus et al. (1984) stored seeds within fruits in environmental condition without control for about six months. Medeiros Filho et al. (2005) also stored *L. ferrea* seeds inside the pods for a year, and after scarification, they germinated 89%. Biruel et al. (2007) comparing seeds stored in and out of the pods, noted that the seeds stored inside fruits and in uncontrolled environment showed higher germination percentage and speed than those extracted from fruits and stored in a dry chamber.

These results could explain the reduction in viability after sixth month, irrespective of seed age and storage temperature. This may indicate that the mature seeds of *L. ferrea*, analysed in this work, were not as mature as expected for a classical orthodox seed. *L. ferrea* pods are indehiscent, not open after a dispersion (Queiroz 2010). Probably their seeds remain inside the pods until full degradation of seeds breaking their dormancy and germination. In nature, the coating pods and seeds are also broken, but this process is very slow. They can be degraded by soil microorganisms, in weak acids or ingested by animals and scarified by digestive tract acids or also after exposition of alternation temperatures (Sampaio 1998).

*L. ferrea* belongs to the final stages of secondary succession, being classified as late secondary or climax (Ferretti et al. 1995). Perhaps due to its ecological characteristics, these seeds remain inside the fruit to complete their ripening and drying process. When released from the fruits would behave as classical orthodox seeds.

Therefore, *L. ferrea* seeds should be stored when mature to increase their viability and seedling production. The degree of maturation of the seed is critical for the maintenance of viability during storage as already emphasized by Barbedo et al. (2013).

## CONCLUSIONS

- Immature and mature seeds of *L. ferrea* should be stored at -18 °C for better preservation, but mature seeds are more viable;
- Mature seeds of *L. ferrea* are not as mature as expected for classical orthodox seeds due to reduced viability from 6 months storage.
- The primary metabolism of *L. ferrea* seeds is reduced at maturity, similar to what occurs with orthodox seeds while the immature ones are comparable to recalcitrant seeds concerning storage behavior.

## ACKOWLEDGEMENTS

The authors thank the Administration of the Instituto Federal do Triângulo Mineiro *Campus* Uberaba-MG, for the permission to harvest seeds. This research work is part of R.Betoni-Bragante thesis at Biodiversity and Environmental Post-Graduation Course at Institute of Botany, and was supported by a fellowship from IFTM. C. J. Barbedo is a research fellow of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

## REFERENCES

- Alvarenga EM, Silva RF, Araujo EF, Cardoso AA. (1984) Influência da idade e armazenamento pós-colheita dos frutos na qualidade de sementes de melancia. *Horticultura Brasileira*. 2(2):5-8.
- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Science* 15:211–218. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.01.003
- Araújo EF, Mantovani EC, Silva RF (1982) Influência da idade e armazenamento dos frutos na qualidade de sementes de abóbora. *Revista Brasileira de Sementes*. 4(1): 77- 87.
- Bailly C (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* 14:93-107. DOI: 10.1079/SSR2004159
- Barbedo C J, Marcos-Filho J (1998) Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Bot. Bras* 12: 145-164.
- Barbedo CJ, Bilia DAC, Figueiredo-Ribeiro RCL (2002) Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Braz J Bot* 25: 431-439.
- Barbedo CJ, Centeno DC, Figueiredo-Ribeiro RCL (2013) Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40: 583-593.

- Barbosa JM, Macedo AC (1993) Essências florestais nativas de ocorrência no Estado de São Paulo: informações técnicas sobre sementes, grupo ecológico, fenologia e produção de mudas. São Paulo: Instituto de Botânica e Fundação Florestal, 125p.
- Barroso GM, Morim MP, Peixoto AL, Ichaso CLF (1999) Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. 443 p
- Berjak P, Pammerer NW (2013) Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science*. 4(478):1-9. doi: 10.3389/fpls.2013.00478
- Bewley JD, Black M (1994) Seeds: Histology of development and germination. 2 ed. New York: Plenum. p.245.
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2013) *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. New York: Springer, 392p.
- Biruel RP, Aguiar ID, Paula RD (2007) Germinação de sementes de pau-ferro submetidas a diferentes condições de armazenamento, escarificação química, temperatura e luz. *Revista Brasileira de Sementes*, 29(3), 151-159.
- Bonjovani MR, Barbedo CJ (2008) Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. toleram temperatura sub-zero. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 345-356.
- Borba ICG, Bandeira JM, Marini P, Martins ABN, de Moraes DM (2014) Metabolismo antioxidativo para separação de lotes de sementes de diferentes graus de homogeneidade. *Revista Brasileira de Biociências*, 12(1), 20-26.
- Borges IF, Barbedo CJ, Richter AA, Figueiredo-Ribeiro RCL (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.
- Borisjuk L, Rolletschek H, Radchuk R, Weschke W, Wobus U, Weber H (2004) Seed development and differentiation: a role for metabolic regulation. *Plant Biology*. 6(4): 375-386.
- Borisjuk L, Rolletschek H (2009) The oxygen status of the developing seed. *New Phytologist*. 182(1): 17-30.
- Carvalho NM, Nakagawa J (2012) Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP. 590p.
- Chatelain E, Hundertmark M, Leprince O, Le Gall S, Satour P, Deligny-Penninck S, Rogniaux H., Buitink J (2012) Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. *Plant Cell Environ*. 35:1440–1455.
- Coelho MFB, Maia SSS, Oliveira AK, Diógenes FEP (2010) Superação da dormência tegumentar em sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 5:74-79

Costa DS(2015)Interferência do oxigênio na conservação das sementes de arroz (Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz).

De Castro RD, Hilhorst HWM (2000) Dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 12:105-136.

Delouche JC(1968)Physiology of seed storage.In: Amer Seed Trade Assoc Hybrid Corn Indus Res Conf Proc.

Dias AMA, Rey-Rico A, Oliveira RA, Marceneiro S, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Júnior RNC, Braga MEM, Souza HC (2013) Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *J. Supercrit. Fluids* 74: 34-45.

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

Fait A, Angelovici R, Less H, Ohad I, Urbanczyk- Wochniak E, Ferni AR, Galili G(2006)Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology* 142: 839-854.

FAO (2013) Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome.

Feltre R (1982) Química geral. 2 ed. Moderna, São Paulo.

Ferretti AR, Kageyama PY, Árbocz GF, Santos JD, Barros MIA, Lorza RF, Oliveira C(1995) Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação com nativas no Estado de São Paulo. Florestar Estatístico.3(7):73-77.

Grus VM, Demattê MESP, Graziano TT (1984) Germinação de sementes de pau-ferro e cassia-javanesa submetidas a tratamentos para quebra de dormência. Revista Brasileira de Sementes.6(2):29-35.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 1-9.

Horbowicz M, Brenae P, Obendorf RL (1998) Fagopytrol B1, O-a-D-galactopyranosyl-(1<sup>®</sup>2)-D-*chiro*-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta* 205:1-11.

Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 6, 431-438.

Hummel J, Strehmel N, Selbig J, Walther D, Kopka J (2010) Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles. *Metabolomics* 6: 322-333.

- Ibrahim AE. 1981. The Effect of moisture content, oxygen availability and temperature on survival of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and onion (*Allium cepa* L.) seed. P.hD. thesis. Reading University.
- Ista(2015)International Seed Testing Association. International rules for seed testing. Seed Science and Technology 13:356-513. <https://www.seedtest.org/en/international-rules-content--1--1083.html>
- Kermode AR (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. Critical Reviews in Plant Science 9:155-195. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689009382286>
- Kermode AR (1995)Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. In: Kigel J. Galili G. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker p.273-332.
- Kaushik, J.K. and Rajiv, R(2003) Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? an analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *The Journal of Biological Chemistry*, 278. doi: 10.1074/jbc.M3008152004
- Lamarca EV, Barbedo CJ (2012)Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. *Hoehnea*39: 577-586.
- Lewis GP (1987) Legumes of Bahia. Royal Botanic Gardens Kew, Surrey.
- Lima JD, Almeida CC, Dantas VAV, Silva BM, Moraes WS (2006) Efeito da temperatura e do substrato na germinação de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (*Leguminosae, Caesalpinoideae*). *Revista Árvore*.30:513-518. <http://www.scielo.br/pdf/rarv/v30n4/31671.pdf>
- Lopes N, Faccin-Galhardi LC, Espada SF, Pacheco AC, Ricardo NPMS, Linhares REC, Nozawa C (2013)Sulfated polysaccharides of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex vírus and polivirus. *Int. J. Biol. Macromol.* 60: 93-99.
- Lorenzi, H (1992)*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *leiostachya* Benth. In: Lorenzi, H. (Ed.). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum. p.147.
- Lorenzi H(2000)Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum.
- Mai-Hong T, Hong TD, Hien NT, Hai HH, Tung TD, Le-Tam .T, Ngoc-Tam B, Ellis RH (2006)Seed development, maturation and storage behaviour of *Mimusops elengi* L. *New Forest* 32:9-19.
- Marcos Filho, J(2015)Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Abrates, Londrina 660p.

- Medeiros Filho S, Silva MAP da, Santos Filha MEC dos(2005) Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul var. ferrea em casa de vegetação e Germinador. Revista Ciência Agronômica. 36: 2.
- Mello JIO, Centeno DC, Barbedo CJ, Figueiredo-Ribeiro RCL (2011) Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. *Seed Science & Technology*.39:465-480
- Nakagawa J, Cavariani C, Martins CC, Coimbra RDA (2007) Intensidade de dormência durante a maturação de sementes de mucuna-preta. *Revista Brasileira de Sementes*.29(1):165-170.
- Newton RJ, Hay FR, Ellis RH(2013) Seed development and maturation in early spring-flowering *Galanthus nivalis* and *Narcissus pseudonarcissus* continues postshedding with little evidence of maturation *in planta*. *Annals of Botany*.111: 945- 955.
- Obendorf RL (1997) Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* 7:63-74.
- Ooms JJJ, Leon-Kloosterziel KM, Bartels D, Koornneef M, Karssen CM (1993) Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 102:1185–1191. <http://www.plantphysiol.org/content/102/4/1185.short>
- Pammerer NW, Naidoo S, Berjakm P, Nicolásm G, Bradford KJ, Côme D & Pritchard HW (2003) Desiccation rate, desiccation response and damage accumulation: can desiccation sensitivity be quantified? In *The biology of seeds: recent research advances*. Proceedings of the Seventh International Workshop on Seeds, Salamanca, Spain, 2002. pp. 319-325.
- Peterbauer T, Richter A (2001) Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Sci Res.* 11:185-197.
- Popinigis F (1977) Fisiologia da semente (No. QK661 P6).
- Queiroz LP (2010) New combinations in *Libidibia* (DC.) Schltdl. and *Poincianella* Britto & Rose (Leguminosae, Caesalpinoideae) Neodiversity. 5: 11–12.
- Rajjou L, Debeaujon I (2008) Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies*.331:796–805.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1892649>
- Roberts EH (1973) Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*1:499–514.
- Sampaio ES(1998) Fisiologia vegetal: teoria e experimentos. Ponta Grossa: UEPG.
- Santana DG, Ranal M A (2004) Análise da germinação: um enfoque estatístico. Editora UnB, Brasília.
- Sawada LA, Monteiro VSC, Rabelo GR, Dias GB, Cunha M, Nascimento JLM, Bastos GNT (2014) *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central

pathway: Possible involvement of opioid and cholinergic receptors. *BioMed Res Intern*508725.<http://dx.doi.org/10.1155/2014/508725>

Silva KB, Alves EU, Gonçalves EP, Bruno RDLA, de França PRC (2011) Armazenamento de sementes de *Erythrina velutina* Willd. *Revista Árvore*.35:809-816.

Silva JPN, Centeno DDC, Figueiredo-Ribeiro RDCL, Barbedo CJ (2015) Maturation of seeds of *Poincianella pluviosa* (Caesalpinoideae). *Journal of Seed Science*.37:131-138.

Singh DB, Gupta DD (1982) Seed quality in relation to harvesting at physiological maturity in soybeans (*Glycine max*). *Seed Science Technol.* 10(3):469-474.

Steadman KJ, Pritchard HW, Dey PM (1996) Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany*. 77 667-674.

Suguiyama VF, Silva EA, Meirelles ST, Centeno DC, Braga MR 2014 Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbacea purpúrea* Hook. (Velloziaceae) shows two time-dependent responses during desiccation and recovering 5(96): 1-13.

Toldi O, Tuba Z, Scott P (2009) Vegetative desiccation tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops? *Plant Science*.176:187–199.

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945208002781>

Usberti R, Roberts EH, Ellis RH (2006) Prediction of cottonseed longevity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1435-1441.

Verdier J, Lalanne D, Pelletier S, Torres-Jerez I, Righetti K, Bandyopadhyay K, Leprince O, Chatelain E, Vu BL, Gouzy J, Gamas P, Udvardi MK, Buitink J (2013) A regulatory networkbased approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiol* 163:757–774.

Vertucci CW (1990) Calorimetric studies of the state of water in seed tissues. *Biophysical journal*.58(6):1463.

Vertucci CW(1993) Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. *Journal of Seed Technology*, 41-53.

Vertucci CW, Leopold AC (1984) Bound water in soybean seed and its relation to respiration and imbibitional damage. *Plant Physiology*.75(1): 114-117.

Vertucci CW, Roos EE (1990) Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology*. 94(3): 1019-1023.

Vertucci CW, Roos EE(1993) Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research*.3(03): 201-213.

Vertucci CW, Farrant JM (1995) Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In* J Kigel, G Galili, eds, *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York, pp 237–271.

- Vidigal DS, Willems L, van Arkel J, Dekkers BJ, Hilhorst HW, Bentsink L (2016) Galactinol as marker for seed longevity. *Plant Science*.246: 112-118.
- Vigeolas H, Van Dongen JT, Waldeck P, Hühn D, Geigenberger P (2003) Lipid storage metabolism is limited by the prevailing low oxygen concentrations within developing seeds of oilseed rape. *Plant physiology*.133(4): 2048-2060.
- Villela FA, Marcos Filho J (1998) Estados energéticos e tipos de água na semente. *Revista Brasileira de Sementes*.20(2): 79-83.
- Walters C (2000) Levels of recalcitrance in seeds. In *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* (Vol. 12, No. Edição Especial, pp. 7-21). Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal
- Walters C (2015) Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta* 242:397–406 DOI 10.1007/s00425-015-2312-6
- Waterworth WM, Bray CM, West CE (2015) The importance of safeguarding genome integrity in germination and seed longevity. *Journal of Experimental Botany*. 66:3549–3558 <http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/erv080>
- Westgate ME (1994) Water status and development of the maize endosperm and embryo during drought. *Crop Science*.34(1), 76-83.
- Yobi A, Wone WMB, Xu W, Alexander DC, Guo L, Ryals JA, Oliver MJ, Cushman JC (2012) Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of *Selaginella* reveals insights into the resurrection trait. *The Plant Journal* 72: 983–999.

### Capítulo 3

**Fisiologia e perfil metabólico de sementes de Leguminosas arbóreas com diferentes níveis de sensibilidade a dessecação**

## **Fisiologia e perfil metabólico de sementes de leguminosas arbóreas com diferentes níveis de sensibilidade a dessecação**

ROSELI BETONI BRAGANTE<sup>1</sup>, ALINE FORGATTI HELL<sup>2</sup>, DANILLO DA CRUZ CENTENO<sup>2</sup>, CLAUDIO JOSÉ BARBEDO<sup>3</sup>; RITA DE CÁSSIA LEONE FIGUEIREDO-RIBEIRO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo (SP), Brasil, e-mail: roselibetoni@yahoo.com.br; <sup>2</sup>Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo (SP), Brasil; <sup>3</sup>Instituto de Botânica, São Paulo (SP), Brasil.

### **Introdução**

A designação das sementes em categorias particulares é baseada nas respostas em fase de plena maturidade, antes do início da germinação. Para garantir a qualidade do armazenamento, a coleta de sementes deve ser realizada ao final da maturação quando o máximo de matéria seca é atingido (Popinigis 1977, Bewley *et al.* 2013). A partir dessa fase ocorre queda progressiva e irreversível na qualidade das sementes, em função do processo de deterioração (Abdul-Baki & Anderson 1972, Carvalho & Nakagawa 2000). No entanto, definir o momento no qual a semente se desliga fisiologicamente da planta mãe é uma tarefa difícil em muitas sementes recalcitrantes. Isso se dá pela ausência de um ponto definido entre o metabolismo de desenvolvimento e de germinação, como o acúmulo máximo de massa seca e secagem em sementes ortodoxas (Berjak & Pamminger 1994).

A maior parte dos resultados de pesquisas com sementes recalcitrantes poderia se ajustar a um período específico do desenvolvimento de sementes ortodoxas (Delgado & Barbedo 2012, Pérez *et al.* 2012, Barbedo *et al.* 2013). Por exemplo, a capacidade de sementes de *Acer platanoides* suportarem a secagem depende da fase de maturação em que elas são secas, uma observação que também se aplica a outras espécies (Dickie *et al.* 1991, Bewley *et al.* 2013). Assim, algumas sementes podem parecer recalcitrantes se forem secas antes que tenham adquirido plenamente a tolerância à dessecação (Bewley *et al.* 2013).

Mais recentemente, alguns autores têm considerado a possibilidade de que as sementes não pertençam, de fato, a grupos distintos (ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias), mas que as

diferenças na tolerância a dessecação, na viabilidade e no potencial de armazenamento, a curto e médio prazo, dependam do quanto as sementes se desenvolveram na planta-mãe até o momento da dispersão e/ou coleta (Barbedo *et al.* 2013, Berjak & Pammenter 2013, Bewley *et al.* 2013). Assim, o comportamento recalcitrante das sementes seria o resultado da dispersão prematura dessas pela planta-mãe; nesse contexto, o ciclo de maturação de sementes recalcitrantes se encaixaria num período específico da maturação de sementes consideradas ortodoxas, sendo, portanto, comparáveis a ortodoxas imaturas (Barbedo *et al.* 2013, Newton *et al.* 2013, Verdier *et al.* 2013).

Com base nesse conceito, algumas características dependem do grau de maturação antes da dispersão e o teor de água poderia ser um indicador do quanto essas sementes avançaram nesse processo. Consequentemente, o quanto recalcitrante ou ortodoxa esta semente possa ser, poderia estar relacionado ao grau de maturação. Assim, um gradiente de comportamento deveria ser encontrado entre sementes de diferentes espécies (Barbedo *et al.* 2013). De acordo com esses autores, esforços devem centrar-se em estudos de maturação completa de sementes recalcitrantes ou em fase imatura nas consideradas ortodoxas, utilizando como ferramentas de estudo a metabolômica associada às taxas de consumo de oxigênio e liberação de gás carbônico com vistas a caracterizar o grau de recalcitrância, ou imaturidade, de uma semente, de acordo com seu metabolismo.

Dessa forma o objetivo deste trabalho é realizar uma análise comparada da fisiologia e do perfil metabólico de sementes de quatro espécies de leguminosas arbóreas com diferentes níveis de tolerância a dessecação. Pretende-se com os resultados encontrar marcadores que permitam inferir o grau de recalcitrância em que as sementes se encontram. Essas informações poderão contribuir para o desenvolvimento de tecnologias para a conservação de recursos genéticos vegetais por meio de bancos de sementes. Além disso, permitirá adicionar dados inéditos sobre o conhecimento desse tema controverso.

### **Caracterização das espécies em estudo**

Leguminosae é a terceira maior família de plantas com distribuição cosmopolita. Inclui 727 gêneros e 19.327 espécies, podendo ocorrer desde florestas pluviais até desertos (Queiroz 2009). As

sementes dessa família podem apresentar formatos, composição química e comportamentos distintos também no que diz respeito à tolerância a dessecação, incluindo espécies sensíveis e tolerantes à redução do teor de água (Mello *et al.* 2010, Caccere *et al.* 2013, Hell *et al.* comunicação pessoal 2016). Dessa forma foram selecionadas quatro espécies de leguminosas com diferente sensibilidade a dessecação sendo elas *Inga vera*, *Caesalpinia echinata*, *Libidibia ferrea* e *Erythrina speciosa*. Duas delas foram foco do presente estudo *Caesalpinia echinata* e *Libidibia ferrea* e duas outras, *I. vera* e *E. speciosa*, foram analisadas com base nos dados de literatura e estudos pré-existentes (Mello *et al.* 2010, Bonjovani 2011, Caccere *et al.* 2013, Hell comunicação pessoal 2016). Quando possível os resultados foram comparados em dois estádios de desenvolvimento, menos imaturo e mais maduro. *I. vera* no estádio 3 (66% de teor de água) foi considerada imatura e no estádio 4 (61% de teor de água) foi considerada madura (Caccere *et al.* 2013).

- *Inga vera* (ingá): espécie arbórea tropical com frutos indeiscentes, apresenta sementes classificadas como recalcitrantes com uma das menores capacidades de armazenamento conhecidas. Várias espécies do gênero *Inga* apresentam sementes altamente recalcitrantes, de baixa longevidade e são dispersas com teor de água próximo a 60%. Contudo, apresentam elevada porcentagem de germinação, ocorrendo frequentemente viviparidade em algumas delas (Oliveira & Beltrati 1994, Pritchard 1995, Bilia & Barbedo 1997) (Figura 1a-c).

- *Caesalpinia echinata* (pau-brasil): espécie arbórea tropical com frutos deiscentes e sementes tolerantes à dessecação até 7% de água. Contudo, estas sementes não têm dormência, perdem viabilidade no prazo de três meses quando armazenadas sob condição ambiente, mas mantêm alta capacidade germinativa quando armazenadas por até 5 anos sob temperaturas negativas (Barbedo *et al.* 2002, Mello *et al.* 2013) (Figura 1d-f).

- *Libidibia ferrea* (pau-ferro): crescenaturalmente em muitasregiões do Brasil e contém frutos indeiscentes e sementes também tolerantes à dessecação, apresentando altalongevidadenatural edormência física quando dispersas (Lewis 1987, Barroso *et al.* 1999, Matos *et al.* 2015) (Figura 1g-i).

- *Erythrina speciosa* (mulungu): Frutos descentes com sementes notavelmente tolerantes à dessecção, dormentes na dispersão devido à impermeabilidade do tegumento a absorção de água (Koszó *et al.* 2007) e pode ser armazenada por vários anos em uma gama de condições ambientais no estado seco (Mello *et al.* 2011) (Figura 1j-l).

Sementes de *I. vera*, foram denominadas maduras apenas por estarem no segundo estádio de maturação, uma vez que não são dispersas secas nem consideradas maduras, sendo por isso recalcitrantes. *E. speciosa* no estádio 3 (68% de teor de água) foi denominada como imatura e estádio 6 (8% de teor de água) denominada como madura (Hell *et al.* comunicação pessoal 2016). Os dados de germinação, perfil metabólico e respiração de sementes de *Caesalpinia echinata* e *Libidibia ferrea* foram extraídos dos Capítulos 1 e 2, enquanto os dados de carboidratos e lipídeos dessas espécies foram obtidos da literatura (Mello *et al.* 2010, Sawada *et al.* 2014).

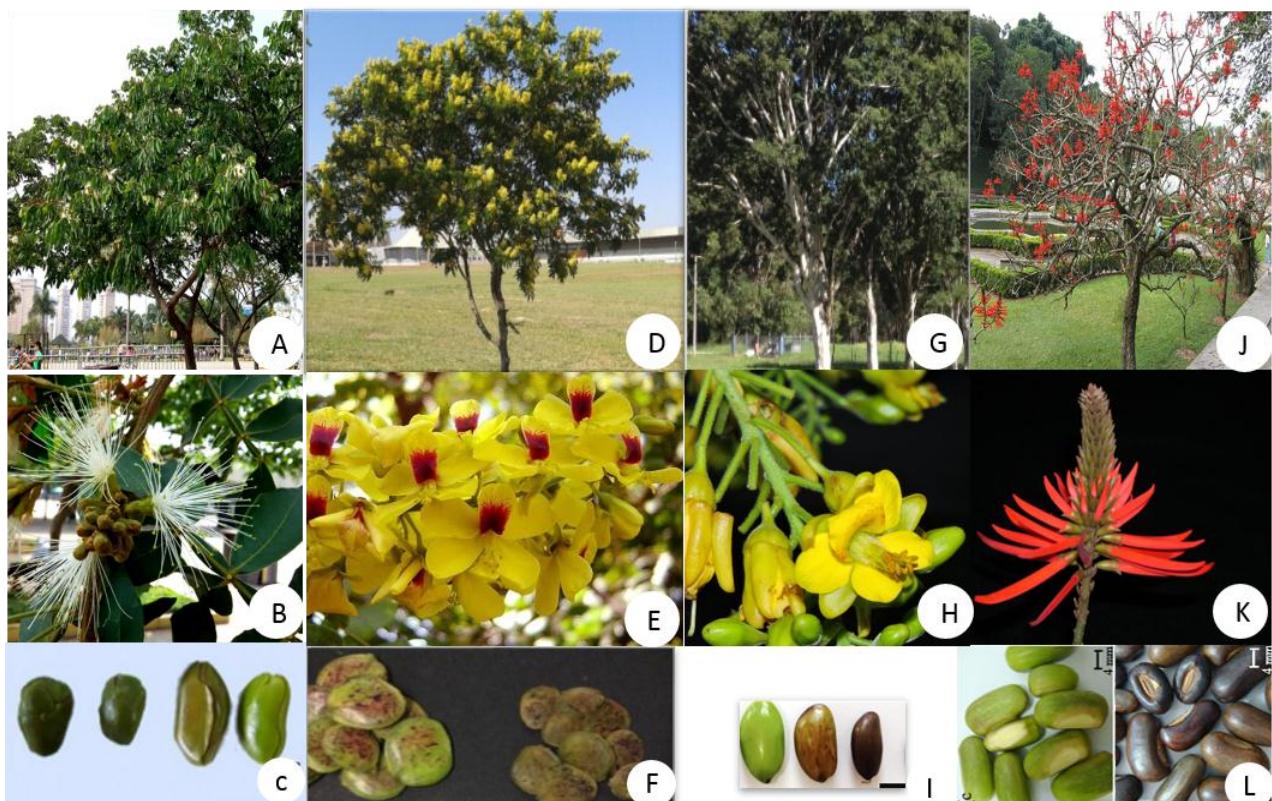


Figura 1. Caracterização morfológica geral de quatro espécies de Leguminosae: *Inga vera* (A-C), *Caesalpinia echinata* (D-F), *Libidibia ferrea* (G-I) e *Erythrina speciosa* (J-L). Figuras A, D, G e J: exemplar adulto indicando em detalhe nas figuras B, E, H e K as inflorescências e nas figuras C, F, I e L as sementes de cada espécie em dois estádios de maturação. (Fotos *E. speciosa*: Hell *et al.* Comunicação pessoal 2016 )

Sementes de *C. echinata* com teor de água de 48% foram classificadas como imaturas e com 34%, como maduras. Sementes de *L. ferrea* com teor de água de 58% foram classificadas como imaturas e com 15% como maduras. Vale lembrar que os grupos de ambas espécies eram heterogêneos e que isso pode ter ocasionado algumas alterações na viabilidade das sementes conforme mencionado nos capítulos anteriores.

### **Tolerância a dessecação e armazenamento**

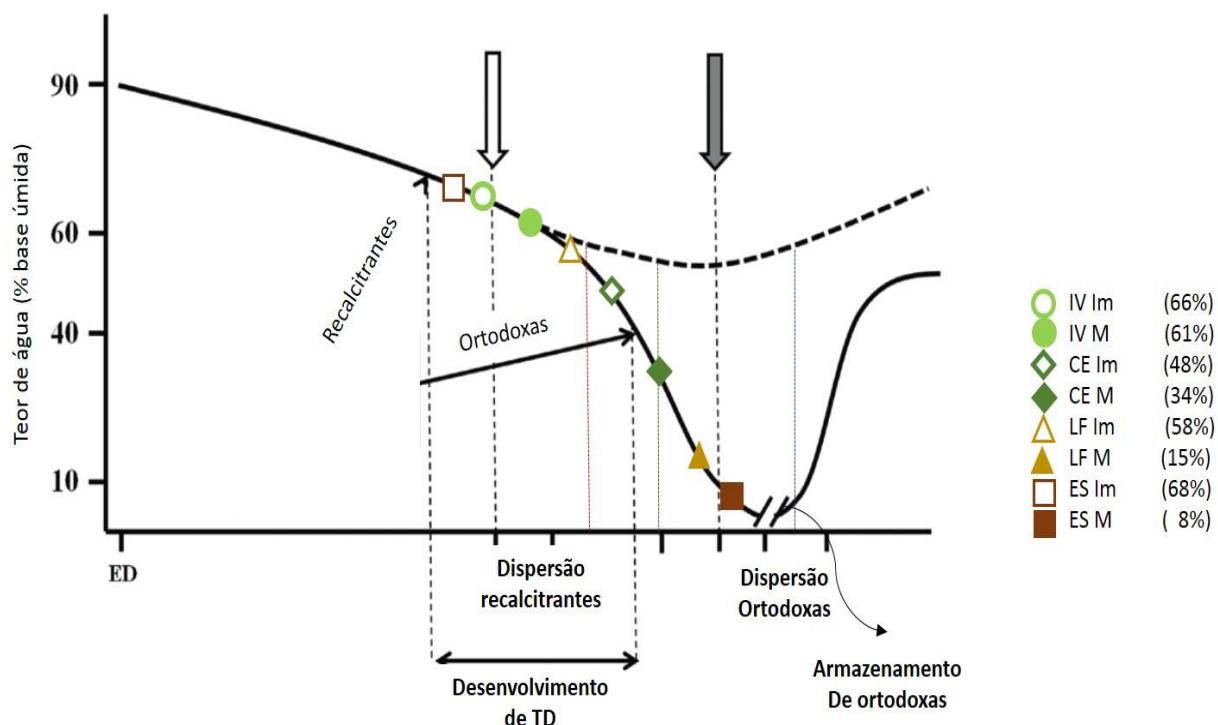
Sementes de *I. vera* são sensíveis a dessecação e ao armazenamento. Com efeito, em condições naturais, essas sementes não ultrapassam 15 dias de armazenamento após a dispersão (Carvalho 1994, Bilia & Barbedo 1997, Barbedo & Bilia 1998, Barbedo & Cícero 2000). Armazenamento de embriões de *I. vera* hidratados em solução de polietileno glicol (PEG) foi capaz de manter alta capacidade de germinação até 30 dias de armazenamento a -1,7 MPa e 5 °C (Faria *et al.* 2006). Alta taxa de germinação também foi observada até 40 dias quando armazenadas em uma solução de ABA a  $10^{-4}$  M, a 9 °C (Barbedo & Cicero 2000), até 45 dias a 8 °C, após secagem suave (Bonjovani & Barbedo 2008) e até 90 dias a -2,4 MPa a 10 °C (Andréo *et al.* 2006).

Sementes de *C. echinata* toleram redução do teor de água até 7% (Barbedo *et al.* 2002) e, em baixas temperaturas (positivas a 7 °C e de congelamento de -5 a -18°C) podem ser armazenadas por até 5 anos (Hellmann *et al.* 2006, Mello *et al.* 2013). Contudo, quando mantidas sob temperatura ambiente (*ca.* 25 °C), mesmo secas, não ultrapassam três meses de armazenamento, perdendo rapidamente a viabilidade (Barbedo *et al.* 2002, Hellmann *et al.* 2006). Acredita-se que estas sementes estão expostas a processos oxidativos, bem como a deterioração (Lamarca & Barbedo 2012).

Sementes de *L. ferrea* e *E. speciosa* podem ser armazenadas por períodos maiores por serem consideradas ortodoxas devido ao baixo teor de água na dispersão, embora não tenham sido encontrados trabalhos sobre armazenamento nas mesmas condições que as demais espécies estudadas neste trabalho.

## Desenvolvimento e aspectos fisiológicos das sementes

Colocando os dados de teor de água das sementes imaturas e maduras das espécies em estudo dentro do gráfico proposto por Barbedo *et al.* (2013) é possível que as espécies se ajustam num gradiente (Figura 2). Se os resultados de outros trabalhos com sementes das mesmas espécies e com teores de água diferentes forem colocados no gradiente mencionado as posições podem ser alteradas, contudo variam dentro do mesmo gradiente de acordo com o estádio de maturação (Caccere *et al.* 2013, Mello 2013, Hellet *et al.* comunicação pessoal 2016).



Adaptado de Barbedo *et al.*, 2013

Figura 2. Representação esquemática do teor de água de sementes ortodoxas e recalcitrantes durante a maturação (identificado pelos símbolos abertos-imaturas e fechados-maduras. *Inga vera*: (IV)círculo, *Caesalpinia echinata*(CE): losango, *Libidibia ferrea*(LF): triângulo e *Erythrina speciosa*(ES): quadrado) até dispersão. Legenda: ED: início do desenvolvimento embrionário. TD: tolerância à dessecação, SM: secagem da maturação, GR: germinação de sementes recalcitrantes, GO: germinação de sementes ortodoxas. A linha pontilhada representa o comportamento de sementes recalcitrantes a partir da extremidade da sua maturação para o início da germinação (Adaptado Barbedo *et al.* 2013).

## Composição de carboidratos e ácidos graxos

Entre outros mecanismos que podem estar envolvidos no processo de tolerância à dessecação, o acúmulo de carboidratos não estruturais no período de maturação foi bastante investigado. Sacarose e oligossacarídeos da série da rafinose (OSR), como rafinose e estaquiose, são geralmente acumulados durante a maturação particularmente na fase de secagem de sementes tolerantes a dessecação (Steadman *et al.* 1996, Obendorf 1997, Hoekstra *et al.* 2001, Buitink *et al.* 2008, Leduc *et al.* 2012). Além disso, a alta concentração de sacarose também é comum em tecidos secos de plantas revivescentes (Berjak & Pammeter, 2007). Outros açúcares como os ciclitóis livres e galactosil ciclitóis também se acumulam em algumas sementes e parecem contribuir para a tolerância à dessecação de maneira semelhante aos OSR (Obendorf 1997, Peterbauer & Richter 2001), quando estes não estão evidenciados (Horbowicz *et al.* 1998, Steadman *et al.* 2000, Borges *et al.* 2006).

Além dos carboidratos solúveis, os ácidos graxos também atuam na defesa das células das sementes em condições de estresse (Liu *et al.* 2006, Mello *et al.* 2010). Esses compostos ajudam na manutenção da conformação e funcionalidade das membranas celulares e proteção contra lesões de embriões durante a desidratação (Hoekstra *et al.* 2001, Liu *et al.* 2006, Mello *et al.* 2010). A composição lipídica das membranas celulares pode influenciar na longevidade de sementes, sendo que sementes de vida mais longa possuem membranas que tendem a ser mais estáveis (Golovina *et al.* 2010). O teor de óleo das sementes pode não afetar diretamente a longevidade ou persistência das sementes, mas a vida útil se correlaciona com o grau de saturação de lipídeos da membrana (Hoekstra 2005, Walters *et al.* 2005a, Probert *et al.* 2009, Gardarin *et al.* 2010, Nagel & Börner 2010).

O envelhecimento da semente provoca alterações na organização das reservas lipídicas e peroxidação de lipídeos, resultante da ação de EROS sobre as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados (Priestly & Leopold 1979, Murthy & Sun 2000, Walters *et al.* 2005b, Devaiah *et al.* 2007).

Menores quantidades de ácidos graxos saturados foram detectadas em sementes tolerantes à dessecação, em comparação com as intolerantes, especialmente os triacilgliceróis e ácidos graxos constituintes da membrana (Liu *et al.* 2006, Mello *et al.* 2010). Estas modificações também podem ter impedido a ação dos radicais oxidantes em ácidos graxos insaturados, que poderiam resultar na morte celular (Halliwell & Gutteridge 1999). Considerando a importância do envolvimento de carboidratos e ácidos graxos para o desenvolvimento do embrião, é necessário compreender o comportamento de cada espécie quanto ao metabolismo e acúmulo de reservas.

Baixas concentrações de ciclotíos (0,3%) e de ácidos graxos insaturados (0%) foram encontradas nas sementes de *I. vera*, mas foram detectados apenas traços de estaquiose. Isso presumivelmente poderia contribuir para o seu comportamento recalcitrante, como sugerido anteriormente (Mello *et al.* 2010). Maiores quantidades de ciclotíos (2-3%) e rafinose (4,6-13%) foram encontradas em *C. echinata* e *E. speciosa*, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Composição de carboidratos solúveis neutros ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) em sementes de quatro espécies arbóreas tropicais com sensibilidade diferente à dessecação. Cil=ciclotíos; Gli=glicose; Fru=frutose; Sac=sacarose; Raf=rafinose; Est=estaquiose. (Adaptado de Mello *et al.* 2010 e resultados de *Libidibia ferrea* - Capítulo 2).

Espécie/ $\text{mg g}^{-1}$ MS	Tecido	Cil	Gli	Fru	Sac	Raf	Est
<i>Inga vera</i>	Embriões	5,9	1,3	1,6	51,7	0,5	-
<i>Caesalpinia echinata</i>	Eixo embrionário	32	2,3	1,2	96	5,4	3,9
	Cotilédone	20	2,0	1,3	121	1,6	1,5
<i>Libidibia ferrea</i>	Semente inteira	0,4	0,8	0,01	2,1	2,4	0,9
	Eixo embrionário	12	2,4	15,4	76	140,6	48
<i>Erythrina speciosa</i>	Cotilédone	39	1,7	15,2	36	60	20

As sementes de *L. ferrea* são as menores, em tamanho, quando comparadas às das demais espécies em estudo (Figura 1). O endosperma é o principal tecido de armazenamento nessas sementes e contém lipídios, grãos de amido e outros carboidratos, particularmente polissacarídeos de reserva de parede celular do tipo galactomanano (Dias *et al.* 2013, Lopes *et al.* 2013). Sementes de *L. ferrea* apresentam apenas 7% de açúcares solúveis totais, no entanto apresentam ciclotíos, rafinose e estaquiose. Resultados semelhantes foram encontrados por Mello *et al.* (2010) em *E.*

*speciosa*, outra espécie ortodoxa. Essas sementes apresentam quantidades apreciáveis de oligossacarídeos da série darafinose, associados à tolerância à dessecação.

Em relação a composição de ácidos graxos o embrião de *I. vera* apresentou 100% do total de lipídeos como ácidos graxos saturados. Sementes de *C. echinata* apresentaram 45% de ácidos graxos saturados e 55% de insaturados. Em *L. ferrea* e *E. speciosa* a quantidade de ácidos graxos insaturados foi muito maior, figurando mais de 67 e 70% dos lipídeos encontrados respectivamente (Figura 3).

Um aumento em ácidos graxos insaturados foi observado também em plantas de *Vigna unguiculata* submetidas a estresse hídrico (Paula *et al.* 1990). A presença de ácidos graxos insaturados nas membranas celulares aumenta sua fluidez e por consequência, sua proteção à seca. Por outro lado, os ácidos graxos com muitas insaturações são mais instáveis e susceptíveis à degradação e os produtos resultantes de sua peroxidação inativam proteínas ligadas à membrana, alterando sua permeabilidade (Smith & Berjak 1995).

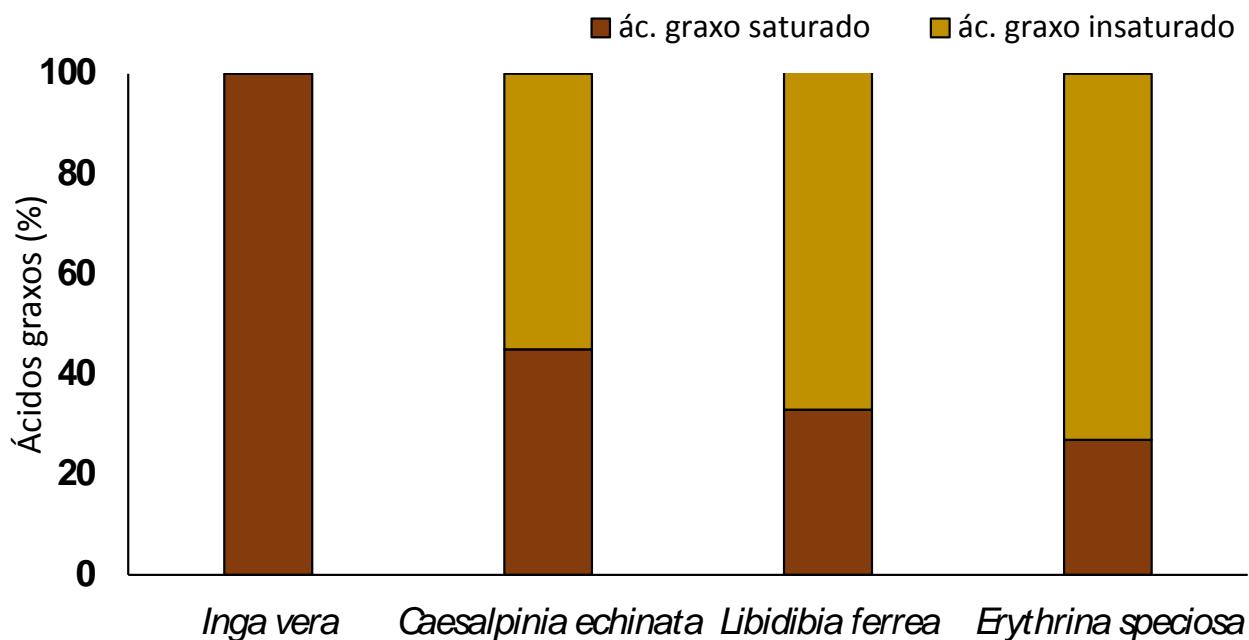


Figura 3. Porcentagem de ácidos graxos saturados (cor marrom) e insaturados (cor laranja) em lipídeos armazenados em sementes de quatro espécies leguminosas com diferentes níveis de sensibilidade a dessecação (adaptado de Mello *et al.* 2010, Sawada *et al.* 2014).

Embora um aumento do grau de instauração de ácidos graxos poderia diminuir a probabilidade de transição de fase cristalina para gel em teores de água muito baixos, melhorando a tolerância à dessecação de sementes (Liu *et al.* 2006), um baixo nível de insaturação poderia diminuir a fluidez da membrana, tornando a bicamada rígida, e reduzindo perda de solutos (Quartacci *et al.* 2002). Em *Ramonda serbica*, a redução de insaturação dos ácidos graxos, em conjunto com mudanças nos componentes de membranas, tais como fosfolipídeos, fosfatidiletanolamina, cerebrosídeos e esteróis livres limitam a tendência da membrana em formar uma configuração não-lamelar durante a secagem, dessa forma mantendo a integridade da membrana (Quartacci *et al.* 2002). Também foi proposto que a peroxidação de lipídeos não enzimática de lipídeos protege as células contra o estresse oxidativo pela eliminação de espécies reativas (Mene-Saffrané *et al.* 2010).

Assim, o teor de carboidratos solúveis nas sementes ortodoxas foi superior ao das sementes recalcitrantes. Isso poderia estar relacionado com a proteção à dessecação, assim como o aumento da proporção de ácidos graxos insaturados. Estas características poderiam ter papel importante relevante na proteção de membranas contra possíveis lesões durante a dessecação (Mello *et al.* 2010). Segundo Pritchard *et al.* (1995), a intolerância à dessecação das sementes recalcitrantes poderia estar relacionada com os baixos níveis de açúcares solúveis presentes nas sementes dessas espécies.

Grandes quantidades de ácidolinoleico, um ácidograxo poli-insaturado, foram encontradas em cotilédones de *C. echinata* (Mello *et al.* 2010). Este lipídeo é particularmente suscetível à oxidação pelo oxigênio singlete e pelo radical hidroxila (Møller *et al.* 2007). Silva (2014) observou que cotilédones de sementes maduras de *C. echinata* apresentam altos níveis de peroxidação lipídica, além de alta capacidade antioxidante em fase hidrofílica e altas quantidades de glutationa. As sementes possuem alguns mecanismos de defesa para prevenir a oxidação como compostos fenólicos e enzimas antioxidantes, dentre outros (Bailly *et al.* 2004, Walters *et al.* 2015). No entanto, estes resultados indicam que essas sementes apresentam mecanismos antioxidantes, mas

nãoo suficiente paracontrolara oxidaçõesob temperaturas elevadas (Silva 2014), fato que poderia explicar problemas de conservação e armazenamento de sementes de *C.echinata*em condições ambientais, sem controle de temperatura (Barbedo *et al.* 2002, Hellmann *et al.* 2006).

### **Taxa respiratória-consumo de oxigênio e liberação de gás carbônico (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>)**

Quanto mais hidratado um tecido, maior sua atividade metabólica e respiratória (Taiz & Zeiger 2009, Caccere *et al.* 2013). Nesse processo, ocorre a oxidação de substâncias orgânicas num sistema celular com a liberação gradativa de energia, por meio de uma série de reações, tendo oxigênio molecular como acceptor final de elétrons. Os substratos respiratórios podem ser carboidratos como amido, sacarose, frutose, glicose e outros açúcares ou mesmo os lipídios, principalmente os triglicerídeos, ácidos orgânicos e proteínas (Marenco & Lopes 2009, Taiz & Zeiger, 2009).

Dentre os vários procedimentos utilizados na determinação do vigor das sementes, uma das alternativas seria submetê-las a medição da atividade respiratória em condições laboratoriais (Aumonde *et al.* 2012, Lamarca *et al.* 2013). O aumento da atividade respiratória da semente pode ser estimado pela quantidade de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) liberado, pela quantidade de oxigênio (O<sub>2</sub>) absorvida ou pelo quociente respiratório (QR). O QR é calculado dividindo-se o valor obtido para produção de CO<sub>2</sub> pelo obtido para consumo de O<sub>2</sub> (QR=CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>), ambos em  $\mu\text{mol gMS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , segundo descrito por Kader & Saltveit (2002).

A respiração é de fato um dos principais contribuintes para a troca líquida de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> entre os tecidos vegetais e a atmosfera. No entanto, a análise do fluxo metabólico, modelo utilizado para estimar liberação de CO<sub>2</sub>, revela que a respiração nem sempre é a fonte dominante de CO<sub>2</sub>, e que processos metabólicos como a via das pentoses fosfato oxidativa e a síntese de lipídeos podem ser quantitativamente importantes. Além disso, existe uma variação considerável na origem metabólica de evolução de CO<sub>2</sub> entre tecidos, espécies e condições (Sweetlove *et al.* 2013).

Para a manutenção da viabilidade das sementes ortodoxas, as quais tem nível metabólico reduzido, por exemplo, são necessárias poucas moléculas de oxigênio, dessa forma o restante do O<sub>2</sub>

atmosférico tem potencial de causar danos oxidativos (Groot *et al.* 2012, Costa 2015). Esse restante de O<sub>2</sub> poderia ser calculado pela diferença entre o O<sub>2</sub> consumido ( $\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) e o CO<sub>2</sub> liberado ( $\mu\text{mol gMS}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), supondo que esse oxigênio obtido da diferença não estaria envolvido na respiração aeróbica e portanto envolvido em outros processos oxidativos. No entanto, isso é apenas uma estimativa devido as diversas possíveis rotas metabólicas envolvidas nesse processo. Dessa forma, não há como afirmar quais são as rotas, mas supor quais seriam, a fim de estimar quão ativo metabolicamente o tecido se encontra.

Comparando as taxas de consumo de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub> das quatro espécies em cada estádio de desenvolvimento, observa-se que reduziram gradativamente ao longo da maturação e entre as espécies estudadas (Figura 4).

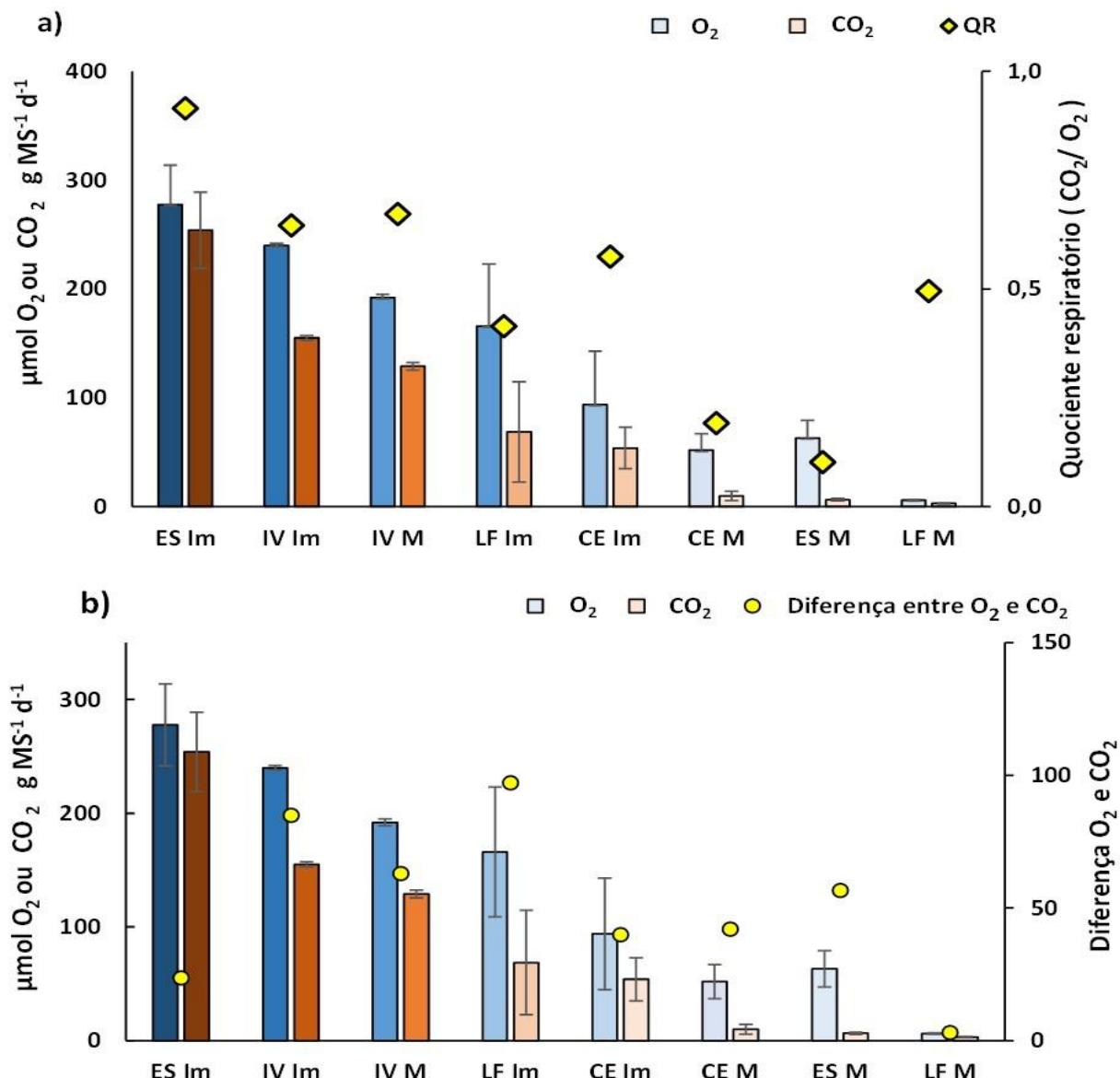


Figura 4. Consumo de  $\text{O}_2$  ( $\mu\text{mol gMS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), liberação de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol gMS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) e a) quociente respiratório (QR) e b) diferença entre  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  ( $\Delta \text{O}_2 - \Delta \text{CO}_2$ ) de *Inga vera*, *Caesalpinia echinata*, *Libidibia ferrea* e *Erythrina speciosa* quatro espécies de Leguminosas imaturas e maduras. Colunas azuis representam os valores de  $\text{O}_2$  de *Inga vera* imatura (IV Im) e madura (IV M), *Caesalpinia echinata* imatura (CE Im) e madura (CE M), *Libidibia ferrea* imatura (LF Im) e madura (LF M) e *Erythrina speciosa* imatura (ES Im) e madura (ES M). Colunas laranjas representam os valores de  $\text{CO}_2$  de *Inga vera* imatura (IV Im) e madura (IV M), *Caesalpinia echinata* imatura (CE Im) e madura (CE M), *Libidibia ferrea* imatura (LF Im) e madura (LF M) e *Erythrina speciosa* imatura (ES Im) e madura (ES M).

É possível visualizar que a velocidade respiratória da semente é influenciada pelo seu teor de umidade, pela temperatura, permeabilidade das membranas e pela tensão de oxigênio e luz (Popinigis 1977, Groot *et al.* 2012). Quando um tecido atinge a maturidade sua taxa respiratória deve permanecer mais ou menos constante ou diminuir vagarosamente (Taiz & Zeiger 2009).

Sementes ortodoxas imaturas de *E. speciosa* apresentaram taxas de consumo de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub> um pouco maiores do que as das sementes recalcitrantes imaturas de *I. vera*. Sementes maduras de *I. vera* apresentaram taxas muito parecidas com sementes ortodoxas imaturas de *L. ferrea* e *C. echinata*. Sementes ortodoxas maduras de *C. echinata*, *L. ferrea* e *E. speciosa* diminuiram progressivamente o consumo de O<sub>2</sub> e a liberação de CO<sub>2</sub>.

Sementes de *E. speciosa*, mesmo apresentando metabolismo ativo quando imaturas e o maior consumo de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub> em relação as demais espécies, apresentaram QR igual a 0,99 (Figura 4a). Um quociente respiratório próximo de 1,0 indica uso de carboidratos como substrato da respiração (altamente oxigenado) uma vez que oxidação desses compostos envolve quantidades iguais de dióxido de carbono e oxigênio (Gnaiger & Kemp 1990, Tcherkez *et al.* 2003). Por outro lado, a oxidação de ácidos graxos (substratos pouco oxigenados) produz menos CO<sub>2</sub> por mols de oxigênio e QR geralmente perto de 0,6-0,7 (Gnaiger & Kemp 1990, Tcherkez *et al.* 2003).

Sementes imaturas e maduras de *I. vera* e imatura de *L. ferrea* apresentaram QR próximo de 0,6 indicando oxidação de ácidos graxos. Contudo, os baixos níveis de liberação de CO<sub>2</sub> em comparação com o consumo de O<sub>2</sub>, em sementes imaturas e maduras de *L. ferrea*, maduras de *C. echinata* e *E. speciosa*, resultaram em QR muito menor do que 0,5 e, em alguns casos, até mesmo inferior a 0,1, o que indica reações não respiratórias. Além disso, o consumo elevado de O<sub>2</sub> poderia estar relacionado a peroxidação lipídica e formação de espécies reativas de oxigênio, que também reduzem a O<sub>2</sub> (Vertucci 1989, Sacandé *et al.* 2000, Walters *et al.* 2002).

São crescentes na literatura as evidências de que a deterioração de sementes é predominantemente causada por processos oxidativos (Groot *et al.* 2012, 2015). Altos valores de temperatura e de teor de água e aumento dos níveis de O<sub>2</sub> durante armazenamento promovem a formação de espécies reativas de oxigênio causando danos oxidativos em macromoléculas vitais como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (Bailly 2004, Groot *et al.* 2012, Kocsy *et al.* 2015). Groot *et al.* (2012) mostrou que a oxidação é a principal causa da deterioração de sementes de alface, cevada, soja e repolho.

Observando os resultados da diferença entre O<sub>2</sub> consumido e CO<sub>2</sub> liberado como mostrado na figura 5b, de maneira geral as sementes das quatro espécies consumiram mais O<sub>2</sub> do que liberaram CO<sub>2</sub>. Dessa forma, essa diferença poderia ser um indicativo de que outros processos oxidativos estariam consumindo esse oxigênio, indicando reações não respiratórias. Os resultados de consumo de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub> observados nas sementes em estudo corroboram os dados obtidos por Lamarca & Barbedo (2012), indicando que processos oxidativos possivelmente aumentam com o grau de hidratação e, portanto, com a imaturidade da semente. Em estudo com sementes de *I. vera*, Bonjovani (2011) evidenciou a participação de reações oxidativas, incluindo-se a respiração, na perda da capacidade germinativa e, consequentemente da própria conservação dessa espécie.

Em sementes de *C. echinata*, processos oxidativos, incluindo respiração e a ação de radicais livres, provavelmente estão relacionados à rápida deterioração. Para esta espécie, quanto mais elevada for a temperatura, maior a deterioração, de modo semelhante ao que ocorre com sementes de *Jatropha curcas* (Lamarca & Barbedo 2012, Pinto Junior *et al.* 2012, Pereira *et al.* 2013) e de *Tabebuia caraíba* (Guedes *et al.* 2012).

Esses processos oxidativos poderiam explicar a baixa viabilidade das sementes de *C. echinata* quando armazenadas a temperaturas mais altas do que as de congelamento, mesmo quando secas, tal como descrito por Barbedo *et al.* (2002) e Hellmann *et al.* (2006). À medida que as sementes deterioram, a respiração se torna gradativamente menos intensa e tem como consequência final o colapso metabólico da semente (Marcos Filho 2015).

Como visto anteriormente, a manutenção do balanço entre sistemas antioxidantes e oxidantes pode diminuir o envelhecimento das sementes e preservar a longevidade destas (Bewley *et al.* 2013). No entanto, o aumento da pressão de O<sub>2</sub> reduz a qualidade das sementes de algumas espécies bem como o teor de tocoferol, composto com função antioxidante nas células vegetais, sendo possível estabelecer relação entre a concentração de O<sub>2</sub> e a qualidade das sementes (Groot *et al.* 2012).

## Perfil metabólico

De acordo com Caccere *et al.* (2013), alguns compostos envolvidos no metabolismo primário, tais como ácidos orgânicos e aminoácidos, não foram detectados nos cotilédones de *I. vera* sugerindo metabolismo mais baixo quando comparado ao eixo embrionário. Estudos com sementes mutantes de *Arabidopsis thaliana*, que afetam desenvolvimento de sementes, indicam diferenças comportamentais entre eixos e cotilédones (Wolkers *et al.* 1998).

As diferenças entre eixos e cotilédones em sementes podem ainda ser atribuídas à presença de compostos de reserva em quantidades diferentes em cada tecido. Sendo assim, é esperado que a atividade metabólica dos eixos seja maior que nos cotilédones, pois esses são responsáveis pelo suprimento de reservas para crescimento e nutrição do novo indivíduo a ser formado pelo eixo.

Dessa forma, devido à falta de informações sobre o eixo de sementes maduras de *C. echinata* (problemas experimentais - Capítulo 1), a análise comparativa dos compostos do metabolismo primário foi realizada entre cotilédones de *I. vera*, *C. echinata* e *E. speciosa*. No caso de *L. ferrea*, mediante a dificuldade de separar eixos e cotilédones e a dureza do tegumento, tais análises foram realizadas com a semente inteira.

Sementes de *I. vera* apresentaram alterações no perfil metabólico durante o seu desenvolvimento. No entanto, estas alterações aparentemente não estão relacionadas ao desligamento do metabolismo, mas sim a ativação da respiração celular, de um modo mais eficiente. Esse fato perdura até que as sementes são separadas da planta-mãe, o que torna difícil sua conservação (Caccere *et al.* 2013). Entre os dois estádios de desenvolvimento de *I. vera* foi possível verificar uma tendência de aumento nos compostos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, ácido málico e ácido cítrico. Além disso, aminoácidos detectados apenas no eixo embrionário, indicaram a falta de uma fase de desligamento metabólico ao final do processo de desenvolvimento da semente, como ocorre em sementes ortodoxas (Caccere *et al.* 2013).

Em cotilédones de *C. echinata*, os compostos do metabolismo primário diminuíram ao longo da maturação de maneira geral, tanto os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, ácido málico e cítrico, quanto polióis, precursores de aminoácidos, como ácido piroglutâmico e glutâmico, e aminoácidos. Essa redução indica uma diminuição da atividade metabólica mas não representa um desligamento completo do metabolismo, como esperado para sementes ortodoxas (Pammerer & Berjak 1999, Yobi *et al.* 2011).

Sementes inteiras de *L. ferrea* apresentaram diminuição dos metabólitos ao longo da maturação. Alguns deles, como ácido cítrico, ácido málico e vários aminoácidos, atingiram níveis muito baixos quando as sementes maduras dessa espécie foram secas (Capítulo 2), evidenciando um comportamento esperado para sementes ortodoxas.

Fait *et al.* (2006) observaram que sementes ortodoxas de *Arabidopsis thaliana* apresentam um interruptor dometabolismo celular durante a fase de dessecação, como uma preparação para um longo período de armazenamento. Isso se dá, principalmente, pela redução dos componentes do ciclo do ácido tricarboxílico, o que diminuiria as taxas respiratórias e evitaria processos oxidativos na mitocôndria, levando ao aumento da tolerância à dessecação (Pammerer & Berjak 1999).

Em cotilédones de sementes de *E. speciosa* a diminuição do metabolismo ocorreu antes mesmo das maiores perdas no teor de água. Essa redução foi observada através da mudança no perfil metabólico com diminuição na proporção de ácido málico e *myo*-inositol ao longo da maturação e a ausência de precursores de aminoácidos (ácido piroglutâmico e glutâmico) em sementes maduras (Hell *et al.* Comunicação pessoal 2016).

Para observar melhor e comparar o perfil metabólico das espécies em estudo, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) com os metabólitos que ocorrem em sementes de *I. vera*, *C. echinata* e *L. ferrea* (Figura 5). Dados de sementes de *E. speciosa* não foram incluídos na análise pois o método utilizado para realização da análise metabolômica foi diferente das outras espécies não sendo, portanto, comparável num mesmo gráfico.

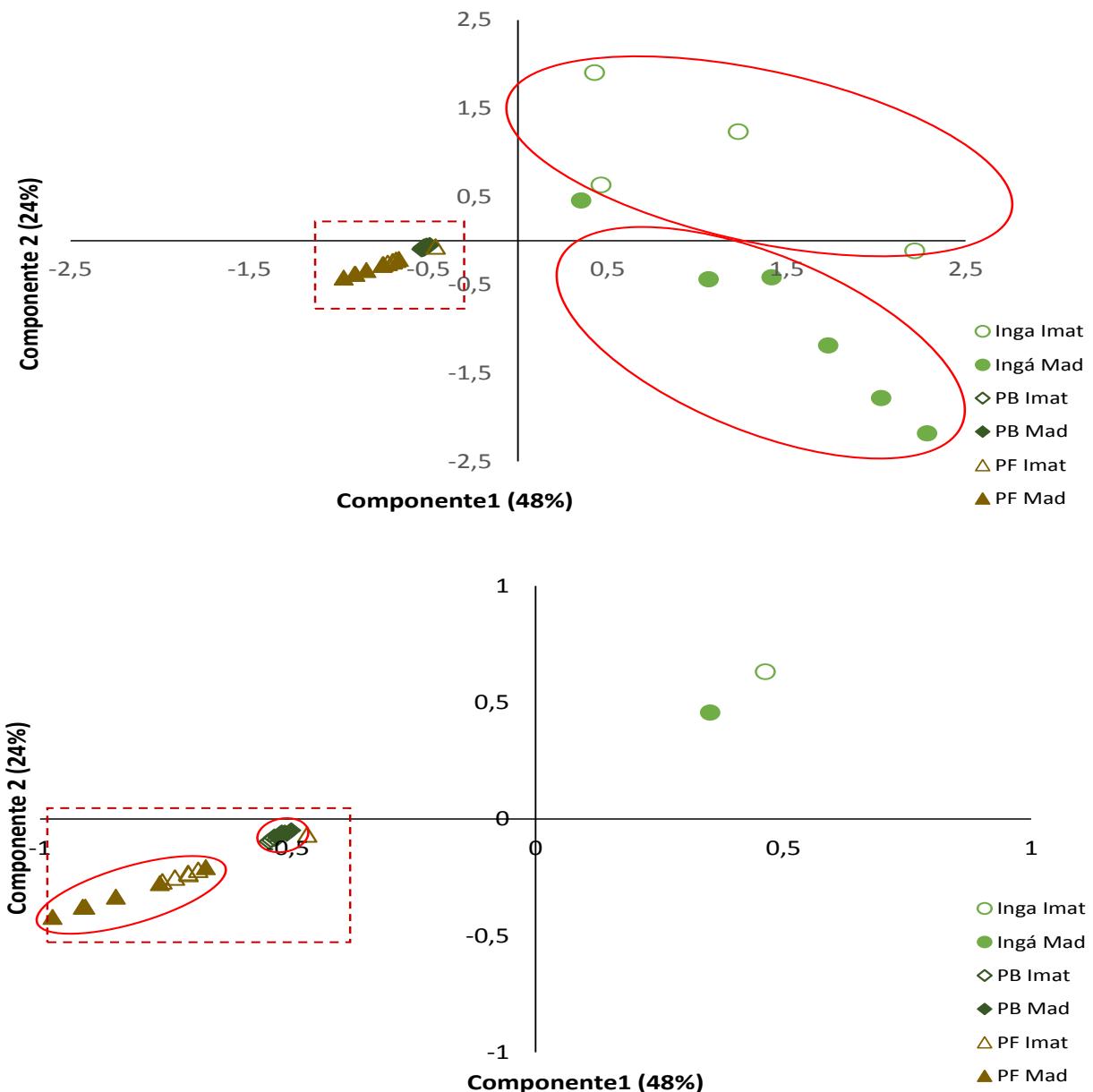


Figura 5. Análise de Componentes Principais (PCA) abrangendo a análise do perfil metabólico de cotilédones de sementes de *Inga vera* (Inga Im-imatura, Ingá M-madura), *Caesalpinia echinata* (PB IM-imatura, PB M-madura) e sementes inteiras de *Libidibia ferrea* (PF Im-imatura, PF M-madura) sem secagem e armazenamento. a. Escala maior eb. Escala menor para melhor visualização do gradiente entre as espécies. A PCA é mostrada como a combinação das duas primeiras dimensões. Cada ponto representa uma amostra biológica em separado.

De acordo com os resultados observados na figura 6, sementes de *I. vera* não desligam o metabolismo, aparecendo bem dispersas das demais espécies. Sementes imaturas e maduras de *C. echinata* e *L. ferrea* aparecem em dois pequenos agrupamentos, pouco dispersos entre si formando um gradiente de ortodoxia. Sementes imaturas e maduras de *C. echinata* encontram-se localizadas entre as mais recalcitrantes de *I. vera* e a mais ortodoxa de *L. ferrea*.

Os resultados se confirmaram ilustrando que sementes imaturas e maduras de *C. echinata* ficam bem mais agrupadas que as de *L. ferrea*. Provavelmente não houve maior separação entre os estádios de *C. echinata* pois as mesmas apresentavam teor de água muito próximo (48 e 34%, na imatura e madura, respectivamente). Os resultados indicam que não houve desligamento metabólico durante a maturação de *C. echinata* por estar ainda muito hidratada, ou por ela não ser tão ortodoxa quanto esperado.

Sementes imaturas e maduras de *L. ferrea* com 58 e 15% de teor de água respectivamente, apareceram mais dispersas entre si do que as de *C. echinata* (Figura 5). Isso pode indicar uma redução metabólica como esperado para sementes ortodoxas (Fait *et al.* 2006, Hell *et al.* comunicação pessoal 2016). Dessa forma os resultados obtidos nessas análises indicam que a hipótese da existência de um gradiente entre sementes ortodoxas e recalcitrantes deve ser verdadeira e que o perfil metabólico pode ser utilizado como ferramenta para inferir o comportamento dessas sementes.

### **Considerações Finais**

Durante a maturação das sementes, o teor de água diminui lentamente e continuamente até atingir valores próximos a 50%. A partir deste ponto é possível observar resultados diferentes, e as maiores diferenças podem ocorrer nesse processo de acordo com a espécie e com as condições ambientais (Barbedo *et al.* 2013). De acordo com esses autores é crucial enfatizar que, qualquer que seja a categoria das sementes (ortodoxa, recalcitrante ou intermediária), a variação do teor de água até 50% é muito parecida (Figura 6).

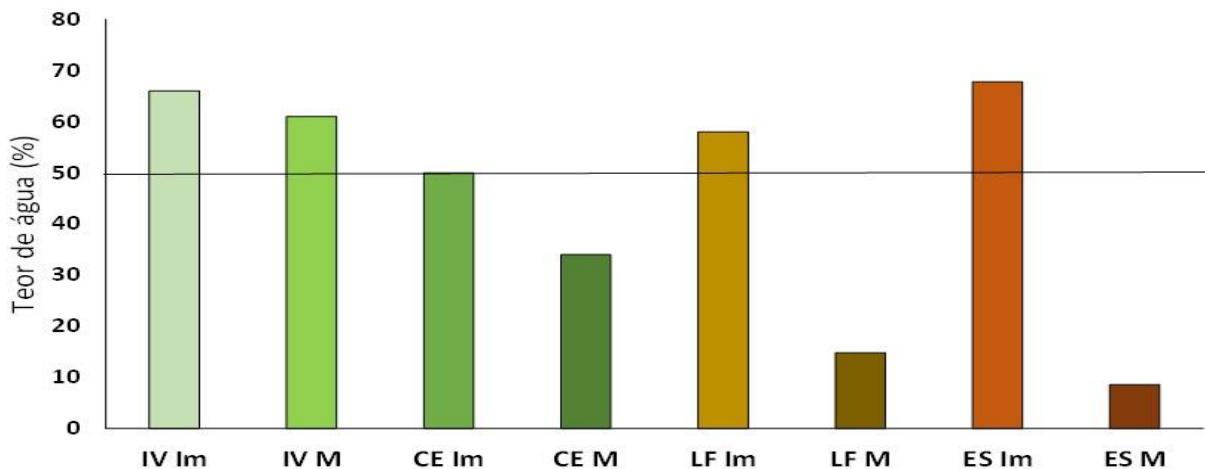


Figura 6. Teor de água de sementes imaturas e maduras de quatro espécies de Leguminosas em dois estádios de maturação: *Inga vera* imatura (IV Im ■) e madura (IV M ■), *Caesalpinia echinata* imatura (CE Im ■) e madura (CE M ■), *Libidibia ferrea* imatura (LF Im ■) e madura (LF M ■) e *Erythrina speciosa* imatura (ES Im ■) e madura (ES M ■).

Portanto, o teor de água seria um indicador de quanto o processo de maturação se estendeu até a dispersão e, consequentemente, quão recalcitrante esta semente pode ser. Dessa forma, em relação à redução do teor de água (Figura 7) é possível observar um gradiente na maturação de *Inga vera* até *Erythrina speciosa*. As perdas no teor de água aumentam com o grau de ortodoxia. Quanto maior for a perda de água ao longo da maturação, mais ortodoxa a semente é e maiores serão o desligamento metabólico e a tolerância a dessecção.

Sementes de *I. vera* apresentam menores variações no teor de água ao longo da maturação. São dispersas ainda com 60% de água, com intensa atividade respiratória sem desligamento metabólico, e não produzem grandes quantidades de moléculas protetoras como ciclitóis, rafinose e estaquiose, pois são dispersas muito imaturas.

Sementes de *C. echinata*, nos estádios utilizados nessa comparação, não apresentam grande variação no teor de água ao longo da maturação, apresentam peroxidação lipídica e tem poucos açúcares da série da rafinose, não havendo indicação de desligamento metabólico e apresentam baixa viabilidade quanto ao armazenamento em condições ambientais (Mello 2010, Silva 2014).

Sementes de *L. ferrea* apresentam grandes perdas de água no decorrer da maturação, redução na atividade respiratória e nítido desligamento metabólico ao final da maturação, possuem

como reserva principal o galactomanano, além da presença de açúcares como rafinose, estaquiose e ciclitóis, sendo dispersas mais maduras e preparadas para o armazenamento.

Sementes de *E. speciosa* apresentam o maior índice de perda de água ao longo da maturação, com baixas taxas respiratórias e desligamento metabólico antes mesmo de completar a maturação. Possuem altos valores de açúcares protetores e são tolerantes à dessecação, possibilitando o armazenamento.

Observando os resultados de teor de água da Figura 2, mesmo a semente mais ortodoxa (*E. speciosa*) apresenta um comportamento recalcitrante quando imatura. Estas apresentam teor de água mais elevado do que sementes de *I. vera* que são dispersas com 61% de água, antes mesmo de chegar a níveis esperados de 50%. Em seguida estão as sementes imaturas de *L. ferrea*, depois imaturas e maduras de *C. echinata*. Até este estádio de desenvolvimento todas essas sementes indicam metabolismo mais ativo sem evidências de desligamento metabólico.

Com menores porcentagens de água, taxas respiratórias e atividade metabólica, aparecem as sementes de *L. ferrea* e *E. speciosa* maduras (15 e 8% de água na dispersão, respectivamente), indicando serem as mais ortodoxas e tolerantes a dessecação. Esses dados indicam que a tolerância à dessecação é adquirida progressivamente durante a maturação de uma mesma semente. Assim, mesmo uma semente ortodoxa clássica possui comportamento recalcitrante durante algum estádio de seu desenvolvimento e maturação confirmado resultados anteriores (Delgado & Barbedo 2012, Barbedo *et al.* 2013).

## Conclusões

- O ciclo de maturação das “recalcitrantes” encaixa-se no início do ciclo de maturação das ditas “ortodoxas”;
- Mesmo uma semente ortodoxa já exibiu comportamento recalcitrante em algum estádio do seu desenvolvimento;
- Existe um gradiente de ortodoxia e este está relacionado ao quanto a semente avançou no processo de maturação no momento da dispersão.

## Literatura Citada

- Abdul-Baki, A.A. & Anderson, J.D.** 1972. Physiological and biochemical deterioration of seeds. *Seed biology*2: 283-316.
- Andréo, Y., Nakagawa, J., Barbedo, C.J.** 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington). *Revista Brasileira de Botânica* 29: 309-318.
- Aumonde, T. Z., Martinazzo, E. G., Borella, J., Pedo, T., do Amarante, L., Villela, F. A., & de Moraes, D. M.** 2012. Physiological changes in seeds and antioxidant metabolism of lettuce seedling exposed to the action of *Zantedeschia aethiopica* Spreng. Leaf extract. *Interciencia*, 37(11), 845-851.
- Bailly, C.** 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14, 93-107. doi:10.1079/SSR2004159
- Barbedo, C. J., & Bilia, D. A. C.** 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Scientia Agricola*, 55(SPE), 121-125.
- Barbedo, C.J. & Cicero, S.M.** 2000. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. *Seed Science and Technology* 28: 793-808.
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Brazilian Journal of Botany*25: 431–439.
- Barbedo, C.J., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea*40: 583-593.
- Barroso, G.M., Morim, M.P., Peixoto, A.L., Ichaso, C.L.F.** 1999. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. 443 p
- Berjak, P. & Pammeter, N.W.** 1994. Recalcitrance is not an all-or-nothing situation. *Seed Science Research* 4: 263-264.
- Berjak, P. & Pammeter, N.W.** 2007. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Annals of Botany* 101, 213-228.
- Berjak, P. & Pammeter, N.W.** 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science* 4, 478 1-9. doi: 10.3389/fpls.2013.00478
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., Nonogaki, H.** 2013. Seeds: Physiology of development, germination and dormancy 3rd ed. Springer, New York.
- Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Científica* 25: 379-391.

- Bonjovani, M.R.** 2011. Taxa respiratória em sementes recalcitrantes de *Inga vera* Wild. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington. Tese de Doutorado-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 130p.
- Bonjovani, M.R. & Barbedo, C.J.** 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D.Penn. toleram temperatura sub-zero. *Brazilian Journal of Botany* 32, 345-356.
- 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.
- Buitink, J. & Leprince, O.** 2008. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C R Biol* 331:788-795
- Caccere, R., Teixeira, S.P., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Braga, M.R.** 2013. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. *Journal of Plant Physiology* 170, 791-800.
- Carvalho, P.E.R.** 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa/CNPB, Brasília.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p.
- Costa, D. S.** 2015. Interferência do oxigênio na conservação das sementes de arroz (Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”).
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2012. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55, 583-590.
- Devaiyah, S.P., Pan, X., Hong, Y., Roth, M., Welti, R. & Wang, X.** 2007. Enhancing seed quality and viability by suppressing phospholipase D in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 50, 950–957.
- Dias, A.M.A., Rey-Rico, A., Oliveira, R.A., Marceneiro, S., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Júnior, R.N.C., Braga, M.E.M., Souza, H.C.** 2013. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *The Journal of Supercritical Fluids* 74: 34-45.
- Dickie, J.B., May, K., Morris, S.V.A., Titley, S.E.** 1991. Recalcitrance and orthodoxy in two *Acer* species. *Seed Science Research* 1:149–162.
- Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A.R., Galili, G.** 2006. *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology* 142, 839-854. doi:10.1104/pp.106.086694

- Faria, J. M., Davide, L. C., da Silva, E. A., Davide, A. C., Pereira, R. C., van Lammeren, A. A., & Hilhorst, H. W.** 2006. Physiological and cytological aspects of *Inga vera* subsp. *affinis* embryos during storage. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(4), 503-513.
- Gardarin, A., D'urr, C., Mannino, M.R., Busset, H. & Colbach, N.** 2010. Seed mortality in the soil is related to seed coat thickness. *Seed Science Research* 20, 243–256.
- Gnaiger, E. & Kemp, R.B.** 1990. Anaerobic metabolism in aerobic mammalian cells: information from the ratio of calorimetric heat flux and respirometric oxygen flux. *Biochimica et Biophysica Acta* 1016: 328-332.
- Golovina, E. A., Van As, H., & Hoekstra, F. A.** 2010. Membrane chemical stability and seed longevity. *European Biophysics Journal*, 39(4), 657-668.
- Groot, S.P.C., Surki, A.A., Vos de, R.C.H., Kodde, J.** 2012. Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analyzing seed ageing under dry conditions. *Annals of Botany* 110: 1149–1159.
- Groot, S.P., de Groot, L., Kodde, J. & van Treuren, R.** 2015. Prolonging the longevity of ex situ conserved seeds by storage under anoxia. *Plant Genetic Resources*, 13(01), 18-26.
- Guedes, R.S., Alves, E.U., Melo, P.A.R.F, Moura, S.S.S., Silva, R.S.** 2012. Storage of *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bureau seeds in different packaging and temperatures. *Revista Brasileira de Sementes* 34:433-440. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v34n3/10.pdf>
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C.** 1999. Free radicals in biology and medicine(3rd edition). New York, Oxford University Press.
- Hell, A.F., Centeno, D.C., & Braga, M.R.** 2016. Comunicação pessoal:Caracterização do metabolismo primário durante o desenvolvimento de sementes de *Erythrina speciosa*. Projeto de iniciação científica IBt.
- Hellmann, M.E., Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Barbedo, C.J.** 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. *Brazilian Journal of Botany* 29, 93-101. [Freezing tolerance in seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) as influenced by the initial water content]
- Hoekstra, F.A.** 2005. Differential longevities in desiccated anhydrobiotic plant systems. *Integrative and Comparative Biology* 45, 725–733.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J.** 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6, 431-438.
- Horbowicz, M., Brenae, P., Obendorf, R.L.** 1998. Fagopytrol B1, O-a-D-galactopyranosyl-(1@2)-D-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with dessication tolerance. *Planta* 205:1-11.

- Kader, A.A. & Saltveit, M.E.** 2002. Respiration and gas exchange. In: J.A. Bartz, J.K. Brecht & J, Weichmann (eds.). Postharvest physiology and pathology of vegetables. Marcel Deckker, New York, pp. 7-29.
- Kocsy, G.** 2015. Die or survive? Redox changes as seed viability markers. *Plant, cell & Environment* 38:1008–1010. DOI: 10.1111/pce.12515
- Lamarca, E.V. & Barbedo, C.J.** 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. *Hoehnea* 39: 577-586.
- Lamarca, E.V., Prataviera, J.S., Borges, I.F., Delgado, L.F., Teixeira, C.C., De Camargo, M.B.P., Faria, J.M.R. & Barbedo, C.J.** 2013. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85(1), 223-233.
- Leduc, S. N. M., Silva, J. P. N., Gaspar, M., Barbedo, C. J., & Figueiredo-Ribeiro, R. D. C. L.** 2012. Non-structural carbohydrates of immature seeds of *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) are involved in the induction of desiccation tolerance. *Australian Journal of Botany*, 60(1), 42-48.
- Lewis, G.P.** 1987. Legumes of Bahia. Royal Botanic Gardens Kew, Surrey.
- Liu, M.S., Chang, C.Y., Lin, T.P.** 2006. Comparison of phospholipids and their fatty acids in recalcitrant and orthodox seeds. *Seed Science and Technology* 34, 443-452.
- Lopes, N., Faccin-Galhardi, L.C., Espada, S.F., Pacheco, A.C., Ricardo, N.P.M.S., Linhares, R.E.C., Nozawa, C.** 2013. Sulfated polysaccharides of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex vírus and polivirus. *International Journal of Biological Macromolecules* 60: 93-99.
- Marcos Filho, J.** 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Abrates, Londrina 660p.
- Marencó, R. A., & Lopes, N. F.** 2009. *Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*. Editora UFV.
- Matos, A.C.B., Ataíde, G.M., Lima, & Borges, E.E.** 2015. Physiological, physical, and morpho-anatomical changes in *Libidibia ferrea* ((Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) seeds after overcoming dormancy. *Journal of Seed Science* 37:026-032. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v37n1140433>
- Mello, J.I.O.** 2013. Alterações bioquímicas durante o armazenamento e a germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*, leguminosas nativas da Floresta Atlântica. Tese de Doutorado- Instituto de Botânica de São Paulo.
- Mello, J.I.O., Barbedo, C.J., Salatino, A., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2010. Reserve carbohydrates and lipids from seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53, 889-899.

- Mello, J.I.O., Centeno, D.C., Barbedo, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2011. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. *Seed Science & Technology* 39: 465-480.
- Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Barbedo, C.J.** 2013. Sub-zero temperature enables storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. *Journal of Seed Science* 35:519-523.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A.** 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 459-481.
- Mène-Saffrané, L., Jones, A. D., & DellaPenna, D.** 2010. Plastoehromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41), 17815-17820.
- Murthy, U.M.N. & Sun, W.Q.** 2000. Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 51, 1221–1228.
- Nagel, M., & Börner, A.** 2010. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Science Research*, 20(1), 1.
- Newton, R.J., Hay, F.R., Ellis, R.H.** 2013. Seed development and maturation in early spring-flowering *Galanthus nivalis* and *Narcissus pseudonarcissus* continues post-shedding with little evidence of maturation in planta. *Annals of Botany* 111, 945-55.
- Obendorf, R.L.** 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research*. 7:63-74.
- Oliveira, D.M.T. & Beltrati, C.M.** 1994. Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de *Inga fagifolia* Willd. (Leguminosae:Mimosoideae). *Revista Brasileira de Biologia* 54(1):91-100.
- Pammerter, N.W. & Berjak, P.** 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9, 13-37.
- Paula, F.M., Thi, A.T.P., Silva, J.V., Justin, A.M., Demandre, C.** 1990. Effects of water stress in the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. *Plant Science* 66, 185-193.
- Pereira, M.D., Dias, D.C.F.S., Borges, E.E.L., Martins Filho, S., Dias, L.A.S., Soriano, P.E.** 2013. Physiological quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds during storage. *Journal of Seed Science* 35, p.21-27. <http://www.scielo.br/pdf/jss/v35n1/03.pdf>
- Pérez, H.E., Hill, L.M., Walters, C.** 2012. An analysis of embryo development in palm: interactions between dry matter accumulation and water relations in *Pritchardia remota* (Arecaceae). *Seed Science Research* 22, 97-111.
- Peterbauer, T. & Richter, A.** 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11:185-197.

- Pinto Junior, A.S., Guimarães, V.F., Dranski, J.A.L., Steiner, F., Malavasi, M.M., Malavasi, U.C.** 2012. Armazenamento de sementes de pinhão manso em diferentes embalagens e ambientes. *Revista Brasileira de Sementes.* 34:636-643 <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v34n4/15.pdf>
- Popinigs, F.** 1977. Fisiologia da semente. Brasília: AGIPLAN, 289 p.
- Pritchard, H.W., Haye, A.J., Wright, W.J., Steadman, K.J.** 1995. A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. *Seed Science Technology* 23, 85-100.
- Priestly, D.A. & Leopold, A.C.** 1979. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiology* 63, 726-729.
- Probert, R.J., Daws, M.I. & Hay, F.R.** 2009. Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of Botany* 104, 57-69.
- Quartacci, M.F., Glisic, O., Stevanovic, B., Navari-Izzo, F.** 2002. Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration. *Journal of Experimental Botany* 53, 2159-2166. doi:10.1093/jxb/erf076
- Queiroz, L.P.** 2009. Leguminosaes da Caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana, Associação Plantas do Nordeste, Feira de Santana.
- Sacandé, M., Buitink, J. & Hoekstra, F.A.** 2000. A study of water relations in neem (*Azadirachta indica*) seed that is characterized by complex storage behaviour. *Journal of Experimental Botany* 51(344), 635-643.
- Sawada, L.A., Monteiro, V.S.C., Rabelo, G.R., Dias, G.B., Cunha, M., Nascimento, J.L.M., Bastos, G.N.T.** 2014. *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central pathway: Possible involvement of opioid and cholinergic receptors. *BMC Medical Research Methodology* 508725. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/508725>
- Silva, J.P.N.** 2014. A comparative study of *Poincianella pluviosa* and *Caesalpinia echinata* (Caesalpinoideae) seeds indicate that a reduced metabolism after shedding is controlled by low temperatures. *Teses de Doutorado Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.* 120p
- Smith, M.T. & Berjak, P.** 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: G. Galili & J. Kigel (eds.). *Seed development and germination.* Marcel Dekker Inc., New York, pp. 237-271.
- Steadman, K. J., Pritchard, H. W., & Dey, P. M.** 1996. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany*, 77(6), 667-674.
- Sweetlove, L.J., Thomas C. R., Williams, C.Y. Maurice C. & Ratcliffe, R.G.** 2013. Modelling metabolic CO<sub>2</sub> evolution – a fresh perspective on Respiration. *Plant, Cell and Environment*. 36, 1631-1640

- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2009. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- Tcherkez, G., Nogués, S., Bleton, J., Cornic, G., Badeck, F. & Ghashghaie, J.** 2003. Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO<sub>2</sub> in french bean. *Plant Physiology* 131: 237-244.
- Verdier, J., Lalanne, D., Pelletier, S., Torres-Jerez, I., Righetti, K., Bandyopadhyay, K., Leprince, O., Chatelain, E., Vu, B.L., Gouzy, J., Gamas, P., Udvardi, M.K., Buitink, J.** 2013. A regulatory networkbased approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiology* 163:757–774.
- Vertucci, C.W., Leopold, A.C., Stanwood, P.C. & McDonald, M.B.** 1989. Moisture as a regulator of physiological reaction in seeds. *Seed moisture*. 51-67.
- Walters, C., Farrant, J.M., Pammenter, N.W., Berjak, P.** 2002. Desiccation stress and damage. In: Black M, Pritchard HW, editors. *Desiccation and survival in plants: drying without dying*. Wallingford/ New York: CAB International. p.263-291.
- Walters, C., Wheeler, L.M. & Grotenhuis, J.M.** 2005a. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research* 15, 1–20.
- Walters, C., Landre, P., Hill, L., Corbineau, F. & Bailly, C.** 2005b. Organization of lipid reserves in cotyledons of primed and aged sunflower seeds. *Planta* 222, 397–407.
- Walters, C.** 2015. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta* 242:397–406 DOI 10.1007/s00425-015-2312-6
- Wolkers, W.F., Alberda, M., Koornneef, M., Léon-Kloosterziel, K.M. & Hoekstra, F.A.** 1998. Properties of proteins and the glassy matrix in maturation-defective mutant seeds of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(2): 133-143.
- Yobi, A., Wone, W.M.B., Xu, W., Alexander, D.C., Guo, L., Ryals, J.A., Oliver, M.J., Cushman, J.C.** 2012. Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of *Selaginella* reveals insights into the resurrection trait. *The Plant Journal* 72: 983–999.

## Considerações Finais

A classificação das sementes em ortodoxas e recalcitrantes pode dificultar o entendimento pois muitas vezes os resultados obtidos com sementes de diferentes espécies não se encaixam dentro desse conceito. Os resultados do presente estudo sugerem que sementes imaturas de *Caesalpinia echinata* apresentam metabolismo ativo, como observado em sementes de *Inga vera*. Sementes maduras de *C. echinata* por sua vez apresentam uma diminuição dometabolismo no entanto sem indicativos de desligamento metabólico conforme observado em sementes ortodoxas clássicas. Isso pode ser devido ao fato de que as sementes que constituíram esse grupo não estavam tão maduras no momento da coleta, sendo constituído por sementes com diferentes teores de água. Sementes de *Libidibia ferrea* apresentaram redução na atividade respiratória e no metabolismo durante a maturação mas não como em sementes de *Erythrina speciosa*, que desligam seu metabolismo mesmo antes de atingir os níveis mais baixos de teor de água.

Estas variações não afetaram, em geral, as características fisiológicas de sementes, entretanto observaram-se diferenças no grau de tolerância à dessecação de acordo com o estádio de desenvolvimento das sementes, evidenciado pelas diferenças no perfil metabólico. Os resultados obtidos com grupos heterogêneos de sementes maduras de *Caesalpinia echinata* e imaturas de *Libidibia ferrea* indicam que quando sementes mais maduras predominam no grupo sua qualidade é elevada e há maior manutenção da viabilidade no armazenamento. No entanto, quanto mais sementes imaturas predominam, menor a qualidade do grupo de sementes como um todo e menor a tolerância à secagem e armazenamento.

Recentemente, foi sugerido que os diferentes comportamentos observados ao final da maturação das sementes seriam resultado do quanto este processo se estendeu, influenciado pelas condições ambientais em que a planta-mãe foi submetida e pelas características de cada espécie acumuladas ao longo de seu processo evolutivo. Os dados obtidos nesse trabalho corroboram a hipótese de que existe um gradiente de ortodoxia e recalcitrância e que este está relacionado ao avanço na maturação no momento da dispersão das sementes. Quanto mais a semente persistir ligada a planta mãe acumulando massa seca e desenvolvendo sistemas de defesa, mais tolerante ela será à secagem e ao armazenamento.