

DEBORA MANZANO MOLIZANE

**Indução da impermeabilidade do tegumento
em relação à água durante a maturação em
sementes de *Erythrina speciosa* Andrews**

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

2017

DEBORA MANZANO MOLIZANE

**Indução da impermeabilidade do tegumento
em relação à água durante a maturação em
sementes de *Erythrina speciosa* Andrews**

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.

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

COORIENTADORA: SANDRA MARIA CARMELLO-GUERREIRO

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

Molizane, Debora Manzano
M721i Indução da impermeabilidade do tegumento em relação à água durante a maturação em sementes de *Erythrina speciosa* Andrews / Debora Manzano Molizane. – São Paulo, 2017.
99p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2017.
Bibliografia.

1. Fisiologia. 2. Dormência. 3. Sementes florestais. I. Título.

CDU: 631.53.01

“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez”

Bernard Shaw

Dedico

À minha mãe (*in memoriam*).

À nova vida que carrego comigo, que é fruto de muito amor.

Ofereço

Ao meu marido, Marcos Angelo Molizane,
por escolher caminhar ao meu lado, independente dos momentos bons ou ruins.

Ao Claudio José Barbedo por todo ensinamento e encorajamento.

Agradeço

A Deus, por toda a força que me proporcionou nos momentos mais difíceis, e por todo conhecimento que aprendi nessa jornada do doutorado.

Agradeço ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida através do programa de Pós-Graduação do Instituto de Botânica.

A Unicamp e ao Instituto de Biologia por permitir o uso do laboratório de anatomia vegetal para a realização de parte dessa tese. À Sandra Maria Carmello-Guerreiro pelo apoio e pela orientação.

A Prefeitura de São Paulo pela autorização da coleta do material no Pq. Cultural Catavento.

Ao Dr. Danilo da Cruz Centeno pelas conversas e esclarecimento iniciais, a Dra. Adriana H. Hayashi pelas conversas sobre anatomia e também por ter aberto as portas do laboratório de anatomia do Ibt. Ao Dr. Márcio Roberto Bonjovani pelas conversas e parceria.

Aos meu dois filhotes caninos Borax Bohr e Theodora Tess.

Aos meus amigos do Instituto de Botânica e da Unicamp, que além das mãos solidárias nos momentos de trabalho árduo foram ótimas companhias nos momentos de descontração.

Aos funcionários da Pós-graduação do Instituto de Botânica e Unicamp por todo auxílio dedicado a nós alunos.

A minha tia (e segunda mãe) Dalva por toda conversa, carinho e apoio. A minha prima Gláucia com todas as suas mensagens de apoio e carinho.

A meus pais não biológicos Márcia e Edgard e minha irmã não biológica Patrícia (Cris), que mesmo de longe me apoiaram para a realização deste trabalho.

A todos aqueles, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Indução da impermeabilidade do tegumento em relação à água durante a maturação em sementes de *Erythrina speciosa* Andrews

A qualidade fisiológica da semente está diretamente relacionada com o sucesso no desenvolvimento da planta dela originada. Conhecer o processo de maturação e o ponto de maturidade fisiológica torna-se fundamental na obtenção de coletas de sementes com elevado potencial de produzir novas plantas. As condições ambientais em que a planta-mãe está submetida interferem no processo de maturação das sementes, ocasionam variações na qualidade fisiológica das sementes e também na instalação da dormência física. A dormência é um processo fisiológico que permite a sobrevivência das sementes em ambientes adversos, ao prevenir a germinação, o que resulta na dispersão temporal das sementes. Ao final do processo de maturação é comum as sementes apresentarem a impermeabilidade do tegumento à água, sendo considerada a dessecação, como uma sinalização para a instalação de dormência. *Erythrina speciosa* Andrews (Leguminosae, Faboideae) é uma espécie que ocorre na Mata Atlântica e no Cerrado, e suas sementes são extremamente tolerantes à dessecação, o que possibilita serem armazenadas por vários anos e, além disso, apresentam tegumento impermeável à água quando maduras. Neste trabalho realizou-se um estudo ontogênico da testa das sementes de *E. speciosa* a fim de identificar os tecidos do tegumento da semente e quais suas relações com a dormência física. Buscou-se, também, analisar o processo de maturação visando a identificar diferentes estádios através de alterações físicas, fisiológicas, morfológicas e anatômicas que auxiliem no momento correto de coleta do material e, ainda, avaliar a influência das condições ambientais sobre a maturação das sementes. Também analisar as modificações no grau de dormência dessas sementes, bem como na sua sensibilidade à quebra dessa dormência, conforme as condições ambientais nas quais as sementes foram formadas. E ainda verificar se a impermeabilidade da testa apresentada em sementes maduras de *E. speciosa* pode ser observada em sementes imaturas que passaram pelo processo de secagem *ex situ*. Os resultados obtidos mostram que as sementes de *E. speciosa* possuem 4 estádios ontogênicos, que não correspondem exatamente aos 6 estádios da maturação. Não foi possível identificar quais alterações anatômicas são responsáveis pela alteração no grau da dormência apresentada nas 6 coletas de anos consecutivos. Estudos para superação da dormência mostraram que a escarificação mecânica é uma metodologia eficiente, apesar de que as condições climáticas em que a planta-mãe está submetida influenciam no grau de dormência apresentado pelas sementes. Já a secagem, mesmo que *ex situ* foi capaz de promover a instalação da impermeabilidade da testa. Nas duas coletas analisadas foi possível observar diferenças significativas nos estádios de maturação que ocorreu a instalação da dormência, na primeira coleta, o estágio 3 apresentou dormência nas secagens mais severas, enquanto na coleta 2 foi somente no estágio 5.

Palavras-Chave: Fisiologia, dormência física, sementes florestais

The integument impermeability induction related to water during *Erythrina speciosa* Andrews seeds maturation.

The physiological seed quality is directly related with the plants development success that the seed was originated. It is fundamental to know the physiological maturation point in order to obtain seeds collected with high potential to produce new plants. The environmental conditions that the mother plant is submitted, has influence of the maturation seeds process that cause seeds physiological quality variations and also the physical dormancy installation. The dormancy is a physiological process that allows the seeds to survive in adverse environments in order to prevent seeds germination dispersion. At the end of the maturation process it is common these seeds presented integument impermeability desiccation like a sign for dormancy installation. *Erythrina speciosa* Andrews (Leguminosae, Faboidease) is a specie that occur on the Atlantic Forest and Cerrado and their seeds are extremely tolerant about desiccation that give the possibility to the seeds to be in storage for many years and additionally present integument water impermeable when they are mature. In this work it has been realized that an ontogenetic study on *E. speciosa* seeds forehead in order to identify seed integument tissues and which their relations with physical dormancy. Also it has been analyzed that the mature process in order to identify different stages through physical alterations, physiologic, morphologic, and anatomical that can help to collect the material at the correct time and also evaluate environmental influence over the seeds maturation. Also analyze dormancy degree modifications of these seeds and the seeds sensibility when they break dormancy according to environmental conditions where the seeds have been shaped. More than that to verify forehead impermeability presented at mature seeds *E. speciosa* can be observed on immature seeds that have been through a dry process *ex situ* the obtained results show that the *E. speciosa* seeds have 4 ontogenetic stages that they do not exactly match the 6 maturation stages. It was not possible to identify which anatomical alterations that are responsible for dormancy degree alteration presented by 6 seeds collected over years in a row. A dormancy overcome study has been showed that mechanical scarifications are an efficient methodology in spite of environmental conditions where the mother plant is submitted has influence dormancy degree presented by the seeds. About the dry process even though the capacity of "Ex situ" it was able to promote forehead impermeability installation. In the two analyzed collected seeds was possible to observe significant differences on the maturation stages that occurred dormancy installation in the first stage. The third stage presented dormancy in the more severe dry process whereas in the second stage it only happened only on the fifth stage.

Keywords: Physiology, physical dormancy, forest seeds.

Índice

INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1 ESPÉCIE ESTUDADA	13
2 MATURAÇÃO	16
3 TOLERÂNCIA A DESSECAÇÃO.....	18
4 DORMÊNCIA	19
5 TECIDOS PRESENTES NA TESTA DE SEMENTES DE FABACEAE.....	22
5.1 <i>Testa</i>	24
5.1.1 <i>Cutícula cerosa</i>	24
5.1.2 <i>Células em paliçadas</i>	24
5.1.2.1 <i>Linha lúcida</i>	25
5.1.3 <i>Células em formato de ampulheta</i>	25
5.1.4 <i>Parênquima</i>	26
5.2 <i>Micrópila e hilo</i>	27
5.3 <i>Barra de traqueídes</i>	27
5.4 <i>A Lente (estrofíolo)</i>	28
6 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS SOB A MATURAÇÃO DE SEMENTES.....	28
7 OBJETIVOS DESSA TESE	30
CAPÍTULOS 1 - FORMAÇÃO E MATURAÇÃO DE SEMENTES DE <i>ERYTHRINA SPECIOSA</i>	
ANDREWS.....	31
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3 RESULTADOS.....	37
4 CONCLUSÕES	49
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

CAPÍTULOS 2 - GRAU DE DORMÊNCIA EM SEMENTES DE *ERYTHRINA SPECIOSA*

ANDREWS FORMADAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS	53
1 INTRODUÇÃO.....	55
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4 CONCLUSÕES	66
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

CAPÍTULOS 3 - INDUÇÃO DA IMPERMEABILIDADE DO TEGUMENTO EM RELAÇÃO A ÁGUA DURANTE A MATURAÇÃO EM SEMENTES DE *ERYTHRINA SPECIOSA* ANDREWS.....

1 INTRODUÇÃO.....	72
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4 CONCLUSÕES	86
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

Introdução Geral

A história de muitas civilizações está ligada a prática da agricultura. O aumento da disponibilidade de alimentos proporcionou o aumento populacional e também a expansão das cidades, que por sua vez promoverem o desmatamento nos seus entornos. Conforme estas cidades crescem, a área agrícola para abastecimento da cidade também cresce e portanto ocorre um aumento na área desmatada, contribuindo para que espécies de árvores nativas diminuam suas quantidades e até mesmo entrem para a lista de ameaçadas de extinção, assim as sementes passam a ter um papel fundamental para a continuidade e nova propagação destas espécies de árvores (Carvalho e Nakagawa, 2012).

Para que a preservação das espécies nativas é necessário conhecer o ponto de maturidade fisiológica das sementes. Permitindo assim adquirir lotes com ótima qualidade e vigor, e com isso, também, garantir a sobrevivência da espécie na forma *in situ*, através de parques e reservas naturais e também na forma *ex situ*, através de banco de germoplasma (Santos, 2000).

Algumas sementes quando maduras apresentam uma estratégia que permite serem dispersas, não ocorrendo germinação de forma imediata mas somente nos momentos de menor risco de morte da jovem planta, a este processo é dado o nome de dormência (Carvalho e Nakagawa, 2012).

As sementes podem ser dispersas com diferentes níveis de dormência física e geralmente esses níveis e podem também estar relacionado com 3 fatores diferentes: a primeira relacionada com a cor, tamanho e espessura do tegumento, a segunda relacionada com os fatores ambientais para a superação da dormência e a terceira relacionada com a dependência da dispersão por animais, vento ou água (Smýkal *et al.*, 2014).

A perda da dormência em sementes e o início da germinação são eventos distintos, mas que estão de certo modo interligados. Esta intermitência na germinação foi observada em

algumas espécies, incluindo ervas daninhas, que são capazes de sobreviver sob condições ambientais imprevistas (Gutterman, 2000).

Pouco ainda se sabe sobre o processo de instalação da dormência física por impermeabilidade do tegumento, e quais são os fatores que influenciam o grau apresentado pelas sementes. Essa tese tenta elucidar esses mecanismos.

1 Espécie estudada

A família leguminosa é dividida em 3 subfamílias. Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, juntas possuem 800 gêneros e aproximadamente 20.000 espécies, que estão em partes temperadas e tropicais do mundo, sendo que algumas espécies são de interesse agrônomo (Tucker, 2003; Smýkal *et al.*, 2014).

O gênero *Erythrina* L. pertence a subfamília Papilionoideae e é compreendida por 112 espécies nas regiões tropicais do mundo e áreas temperadas da África, Himalaia, sul da China, Rio da Prata (na Argentina) e sul dos Estados Unidos. Este gênero apresenta uma grande diversidade em estrutura floral, orientação da inflorescência, morfologia do fruto, coloração da testa das sementes e ornamentação da epiderme das folhas e cálices (Neill, 1988).

Erythrina speciosa Andrews (figura 1) é uma espécie característica e bastante comum da Mata Atlântica e muito utilizada na arborização de vias e locais públicos como avenidas, praças e jardins, apesar de apresentar o caule coberto por espinhos. A árvore apresenta de 3 a 5 metros de altura e o tronco pode medir até 25 cm de diâmetro (Figura 1a). A madeira dessa espécie é de baixa durabilidade, pois é leve, porosa e macia. As folhas são compostas, trifoliadas e as inflorescências são em racemos terminais. Entre os meses de junho a setembro ocorre a floração e durante esse período não há presença de folhas (Palermo e Agostini, 2010).

As inflorescências de *E. speciosa* são compostas por aproximadamente 200 flores (Figura 1b), onde poucas estão em antese simultaneamente. As flores são hermafroditas,



Figura 1. Aspectos visuais de *E. speciosa*. (a) Planta adulta no período pós frutificação. (b) Inflorescência, região basal flores em antese, região apical flores em desenvolvimento. (c, d) Frutos imaturos com sementes entre os estádios 1, 2 e 3 da maturação (descritos no capítulo 1). (e) Frutos imaturos com sementes entre os estádios 4 e 5. (f) Fruto maduro com sementes no estádio 6 de maturação. (g) aspecto visual das sementes maduras.

diurnas, com tamanho médio de 5,9 cm, com cinco pétalas vermelhas e de tamanhos desiguais onde uma pétala maior recobre toda a flor. O ovário apresenta aproximadamente 15 óvulos,

mas somente 46% desses óvulos são fecundados e formarão frutos. As flores de *E. speciosa* apresentam nectários que são formados nos primeiros estádios da formação do ovário, e só se tornam funcionais após da abscisão da corola e se tornam senescentes quando o pericarpo seca. Esses nectários são responsáveis por atrair possíveis polinizadores diurnos, como beija-flores, pardais, abelhas e besouros. A quantidade de néctar produzido é pequena para saciar as necessidades energéticas de um beija-flor, portanto, é necessária a visita em muitas flores (Vitali-Veiga e Machado, 2000; Paiva, 2009; Palermo e Agostini, 2010).

O desenvolvimento dos frutos ocorrem entre os meses de julho, agosto e setembro, já os frutos totalmente abertos foram observados nos meses de setembro e outubro. Os frutos de *E. speciosa* são oblongo-elípticos (Figura 1c, d, e, f), deiscentes, internamente não são septados e cada fruto maduro apresenta em média 9 sementes. As sementes são oblongas-subquadrangulares (Figura 1g) com ápice e base arredado-truncado. O lóbulo radicular é levemente proeminente e sem pleurograma. O hilo é oblongo, levemente afundado, obscurecido por uma camada de tecido cortical e no centro possui uma estreita fenda hilar. Ao redor do hilo é possível observar restos esbranquiçados do funículo. A micrópila é punctiforme e circundada por uma região mais clara. A testa da semente madura é castanho avermelhado, glabra e levemente brilhante e com impermeabilidade à absorção de água. O embrião é axial curvado (Vitali-Veiga e Machado, 2000; Groth *et al.*, 2003).

As sementes dessa espécie são muito tolerantes à dessecação e podem ser armazenadas por vários anos e em diversas condições ambientais no estado seco. Uma análise quanto aos compostos presentes nas sementes de eritrina mostraram a presença de carboidratos, amido e lipídeos (Bruneau, 1996; Groth *et al.*, 2003; Mello *et al.*, 2010). A testa das sementes de *E. speciosa* também apresentam outros 6 compostos, dentre eles podemos citar: erisotrina, eritratina e nororientalina que estão sendo pesquisados por sua atividade tripanossomicida (Faria *et al.*, 2007).

O eixo hipocótilo-radícula é grosso e curto, já os cotilédones ocupam todo o comprimento da semente e o endosperma é ausente (Vitali-Veiga e Machado, 2000). A morfologia da plântula de *E. speciosa* é epígeo-carnosa. Com aproximadamente 2 dias após a semeadura é possível observar a protrusão da raiz primária e, aos 16 dias, a plântula com o primeiro par de eófilos opostos cruzados, sistema radicular axial, raízes secundárias e terciárias desenvolvidas (Oliveira, 2001).

2 Maturação

Os primeiros estudos de maturação de sementes foram realizados pelo Dr. James C. Delouche entre 1960 e 1970, onde foi possível identificar os estádios de maturação. A forma mais eficaz de identificar a maturidade fisiológica é acompanhar o desenvolvimento da semente quanto a parâmetros de massa fresca ou seca, quantidade de água e germinação (Hay e Smith, 2002; Marcos Filho, 2015).

A partir da fecundação do óvulo uma série de alterações anatômicas, morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas ocorrem até o momento da dispersão da semente madura. Nesse período a água é de grande importância, pois atua na expansão e divisão celular, além de ser um veículo para que os produtos da fotossíntese sejam armazenados e utilizados nas fases iniciais da germinação (Barbedo e Marcos Filho, 1998; Marcos Filho, 2015).

A maturação pode ser dividida em 3 fases, na primeira, inicialmente a semente apresenta elevada porcentagem de água e baixa porcentagem de matéria seca. Então a semente, como um órgão dreno, passa a receber mais nutrientes da planta-mãe acumulando matéria seca, substituindo gradativamente a água presente nas células. Na segunda fase, a transferência de nutrientes e a redução no teor de água se intensificam, e após atingir um desenvolvimento mínimo algumas sementes apresentam capacidade germinativa. Na fase 3, as sementes estão no ponto de maturidade e, portanto, se desligam da planta-mãe. Estas sementes apresentam baixos teores de água, elevadas porcentagens de matéria seca e elevadas

porcentagens de germinação com redução do tempo médio deste processo (Popiginis, 1985; Carvalho e Nakagawa, 2012; Marcos Filho, 2015).

Cada espécie apresenta uma necessidade diferente de tempo para a formação da semente, desde a fecundação durante a antese até a semente madura. Como por exemplo *Pterogyne nitens* Tul. que precisou de 99 dias após a antese (DPA) para que a semente estivesse madura. Para *Erythrina variegata* L., foram necessários 91 DPA, enquanto para sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr.All.ex Benth. podem levar aproximadamente 335 DPA para obtenção da semente madura semente madura (Carvalho *et al.*, 1980, Martins e Silva, 1997; Matheus *et al.*, 2011).

Os órgãos drenos, como as sementes, recebem os metabolitos fotossintetizados produzidos nas folhas e são transportados pelo floema para o acúmulo de matéria seca. O transporte destes metabólitos entre a planta-mãe e o embrião em formação é feito pela via apoplástica, uma vez que não há conexão vascular direta (Castro *et al.*, 2004; Marcos Filho, 2015).

Nem todas as sementes de espécies diferentes são dispersas com o mesmo conteúdo de água. A água presente na semente madura é um importante indicador da capacidade de sobrevivência *ex situ*, portanto, foi desenvolvida classificação para as sementes quanto a capacidade de tolerar a dessecação e capacidade de armazenamento. Sementes que não toleram a perda de água e não são capazes de serem armazenadas por longos períodos foram denominadas de recalcitrantes. Já aquelas capazes de perderem água e serem armazenadas por longos períodos sem culminar em morte, foram consideradas ortodoxas (Roberts, 1973). Ao longo do tempo, muitas sementes passaram a não se encaixar nessas duas classificações, então foi criada uma terceira classe, onde as sementes toleram a secagem, mas não são capazes de serem armazenadas por longos períodos sem perder a viabilidade, denominadas de intermediárias (Hong e Ellis, 1996).

3 Tolerância a dessecação

As sementes conhecidas como ortodoxas, apresentam baixos teores de água no momento da dispersão e podem ser armazenadas por longos períodos em baixas temperaturas, fator que reduz o processo de deterioração (Berjak e Pammenter, 2000). Durante a secagem natural, essas sementes passam pelo processo de reorganização do metabolismo de acúmulo de reserva, para que essa reserva seja utilizada no momento em que a semente hidratar e dar início ao processo de germinação. Além disso, essa reversão do metabolismo também prepara as sementes para o período quiescente e/ou para a dormência física (Angelovici *et al.*, 2010).

A capacidade de tolerar a dessecação foi desenvolvida por algumas espécies para que não ocorressem danos que levariam a morte da semente no momento em que houvesse redução no teor de água. A presença da proteína LEA (Late Embryonic abundant) é vista como fundamental para a capacidade de tolerar a dessecação. Além das proteínas LEA, açúcares solúveis também impedem danos durante a dessecação através das pontes de hidrogênio, levando ao estágio vítreo. Durante a hidratação esses açúcares preservam a orientação das estruturas, mantendo a membrana celular íntegra. Durante a secagem a água presente nas membranas celulares passa de líquida para gel e retorna a fase líquida durante a hidratação (Barbedo e Bilia, 1998; Black e Pritchard, 2002; Berjak, 2006).

Não são apenas as sementes ortodoxas que apresentam dormência, algumas sementes recalcitrantes também apresentam no momento da dispersão, como por exemplo sementes de *Aesculus hippocastanum* L., que necessitam passar por estratificação para poder dar início ao processo de germinação. Após a superação da dormência, essas sementes não podem ter o teor de água reduzido abaixo de 58% e também não podem ser armazenadas por longos períodos (Obroucheva *et al.*, 2012).

4 Dormência

Com o intuito de aprofundar os estudos sobre dormência, uma classificação foi desenvolvida com base no momento de aquisição. A dormência primária ocorre antes da dispersão das sementes, como observado em sementes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.; a secundária ocorre após a dispersão, influenciada por falta de condições adequadas para a germinação, como foi observado em *Rumex crispus* L. (Carmona, 1993; Cardoso, 2004; Hilhorst, 2007).

Dentro desses dois grandes grupos ainda podemos classificar a dormência como exógena e endógena apesar de outros autores considerarem como de cobertura (tegumentar) ou dormência embrionária, respectivamente. A dormência endógena está relacionada a algum bloqueio no embrião e pode ser subdividida em fisiológica, física, morfológica e morfofisiológica. A dormência exógena não atinge o embrião, mas sim as outras partes da semente e pode ser subdividida em fisiológica, física e mecânica (Bewley e Black, 1994; Cardoso, 2004; Hilhorst, 2007; Baskin e Baskin, 2014).

Um estudo sobre a evolução da dormência em sementes mostrou que provavelmente a dormência dos embriões subdesenvolvidos (morfofisiológica) é o ancestral mais primitivo, sugerindo que as condições climáticas que a regulam é tão primitiva quanto as sementes. Posteriormente ocorreu a dissociação da dormência morfofisiológica em dormência fisiológica e morfológica através da dispersão de sementes com embriões maduros. A dormência fisiológica é também um ponto chave evolutivo, pois outras classes de dormência evoluíram repetidamente a partir dela. A dormência física parece estar ligada à alta taxa de extinção de alguns regimes ambientais específicos, pois é restrita a alguns grupos de plantas. As sementes sem dormência é um estado derivado e evolutivamente efêmero, porém extremamente comum (Willis *et al.*, 2014).

A presença de tegumento impermeável à água é conhecida como dormência exógena-física; esta característica está presente em 17 famílias das angiospermas. As sementes que

apresentam esse tipo de dormência podem ser armazenadas e conservadas por longos períodos. Em sementes de *E. speciosa*, por exemplo, foi observado que mesmo após serem submetidas ao envelhecimento acelerado com o tegumento intacto, não ocorreu redução da viabilidade, portanto o tegumento se torna uma proteção da semente contra intempéries (Ramsay, 1997; Baskin e Baskin, 2000; Hilhorst, 2007; Brancalion *et al.*, 2010).

A dormência exógena física apresenta níveis de variações entre as populações, entre anos diferentes a partir da mesma população, a idade da planta e o nível de nutrição durante a maturação, além da posição do fruto na planta-mãe, da semente no fruto e da genética (Smýkal *et al.*, 2014).

Na família das Leguminosas, tem-se indicado alguns fatores como causa da dormência física (figura 2): (1) camada cerosa sobre a camada de células paliçadas; (2) presença de uma camada subcuticular de mucilagem composta por substâncias pécticas insolúveis que retraem após a dessecação e tem alterações químicas que a tornam menos permeáveis; (3) quitina ou suberina no exterior da camada periclinal; (4) zona da linha lúcida; (5) suberina na lamela média, que pode estar presente no entorno das paredes celulares e espaços intercelulares, ou na parte interna da parede periclinal; (6) alterações na estrutura da celulose durante a desidratação, que é uma mudança irreversível através do potencial do inchaço dos géis; (7) contração das células na camada paliçada; (8) presença de substâncias resistentes a água na camada paliçada, como por exemplo, lignina, tanino e quinonas; (9) enchimento de suberina na fenda estrofiolar (Werker, 1981).

Várias técnicas são utilizadas para a superação da dormência física. As mais difundidas são: escarificação mecânica e ácida. Para sementes de *Bauhinia monandra* Britt. foi utilizado imersão em ácido sulfúrico por 20 minutos, elevando a taxa germinativa de 30% da testemunha (sem tratamento) para 91%. Já as sementes que passaram pela escarificação mecânica apresentou 59% de germinação. Nesse caso a escarificação ácida foi mais eficiente para a superação da dormência física (Alves *et al.*, 2000). Em sementes de *Erythrina speciosa*

Andrews, a escarificação ácida também foi eficiente, passando de 8% de germinação na testemunha para 92% na imersão em ácido sulfúrico por 40 minutos (Brancaion *et al.*, 2010).

O ácido sulfúrico penetra através das lamelas médias do tegumento que não estavam fortemente ligadas, iniciando assim um processo de digestão, desfazendo a estrutura cristalina da celulose (Lodi, 2008) e transformando-a em açúcares (Ogeda e Petri, 2010); ao atingir a camada abaixo da paliçada, retirando a impermeabilidade do tegumento através das rachaduras e perfurações onde a água consegue penetrar e iniciar assim, o processo de germinação (Algan e Büyükkartal, 2000). Em estudos com sementes de *Stylosanthes seabrana* B. L. Maass and Manneetje, que possuem impermeabilidade do tegumento a água, foi possível observar que a amostra sem nenhum tipo de tratamento apresenta rugosidades e bolhas, mas após o tratamento com ácido sulfúrico concentrado por 5 minutos as rugosidades não estavam mais presentes (Anand *et al.*, 2011). O mesmo aconteceu com *Rhus glabra* Ait., com a corrosão de braquiesclereides após a imersão em ácido sulfúrico concentrado por 1 hora (Li *et al.*, 1999), mostrando que o ácido sulfúrico é capaz de corroer as camadas mais externas das sementes.

Em estudos bioquímicos com *Erythrina speciosa*, foi possível observar o aumento na porcentagem de germinação nos períodos de imersão mais longos e agressivos, atingindo apenas a testa e não danificando o embrião, comprovando que a escarificação ácida é uma metodologia eficiente para a superação da dormência física, assim como a escarificação mecânica (Koszo *et al.*, 2007).

Diferenças anatômicas foram observadas em sementes de *Glycine max* e *Vicia sativa* dormentes e não dormentes. As sementes dormentes apresentavam a linha lúcida densa, cutícula mais espessa e células em paliçadas maiores do que nas sementes não dormentes. Já em sementes de *Medicago truncatula*, dormentes (linhagem selvagem) e não dormentes (mutantes), foi observado que o gene recessivo KNOX4 foi responsável pela dormência

física, promovendo alterações anatômicas (Harris, 1987; Büyükkartal *et al.*, 2013; Chai *et al.*, 2016).

O tegumento interno em Papilionoideae geralmente pode ser observado somente nos primeiros estádios de maturação. Quando a semente está na maturidade fisiológica, o tegumento interno é obliterado e indiferenciado do nucelo presente apenas na região calazal com aspecto de gelatina (Cavazza, 1950).

Vários fatores ambientais podem influenciar o grau de dormência física, dentre eles é possível citar a umidade relativa. Sementes sem dormência física que foram armazenadas em uma condição de umidade relativa alta desenvolveram a impermeabilidade do tegumento. Quando a umidade relativa ao redor da semente diminui, as células da contra-paliçada na região do hilo se encolhem promovendo a sua abertura. No momento em que a umidade relativa aumenta no entorno da fissura, as células da contra paliçada incham causando o fechamento do hilo (Baskin e Baskin, 2014).

5 Tecidos presentes na testa de sementes de Fabaceae

Os tegumentos do óvulo promovem uma proteção para os tecidos internos. E após a fecundação do óvulo, os tegumentos da semente, que inicialmente estão indiferenciados, passam por divisões celulares e rapidamente se desenvolvem, promovendo assim a proteção do embrião. (Boesewinkle e Bouman, 1995; Van Dongen *et al.*, 2003; Borisjuk, 2014; Smýkal *et al.*, 2014)

O tegumento externo de uma semente dormente da família Fabaceae é formado por quatro camadas: a cutícula cerosa, camada em paliçada, células em formato de ampulheta e parênquima condensado (figura 2). A região calazal é importante por fazer conexão vascular entre a testa e o funículo maternal. A cicatriz deixada na semente pelo funículo tem o nome de hilo, muito usado na taxonomia para identificação de espécies. Além dessas estruturas, é possível observar também a lente, que é uma região onde as células em paliçadas apresentam

menor resistência (Reeve, 1946; Cavazza, 1950; Manning e Staden, 1985; Moïse *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2011; Smýkal *et al.*, 2014).

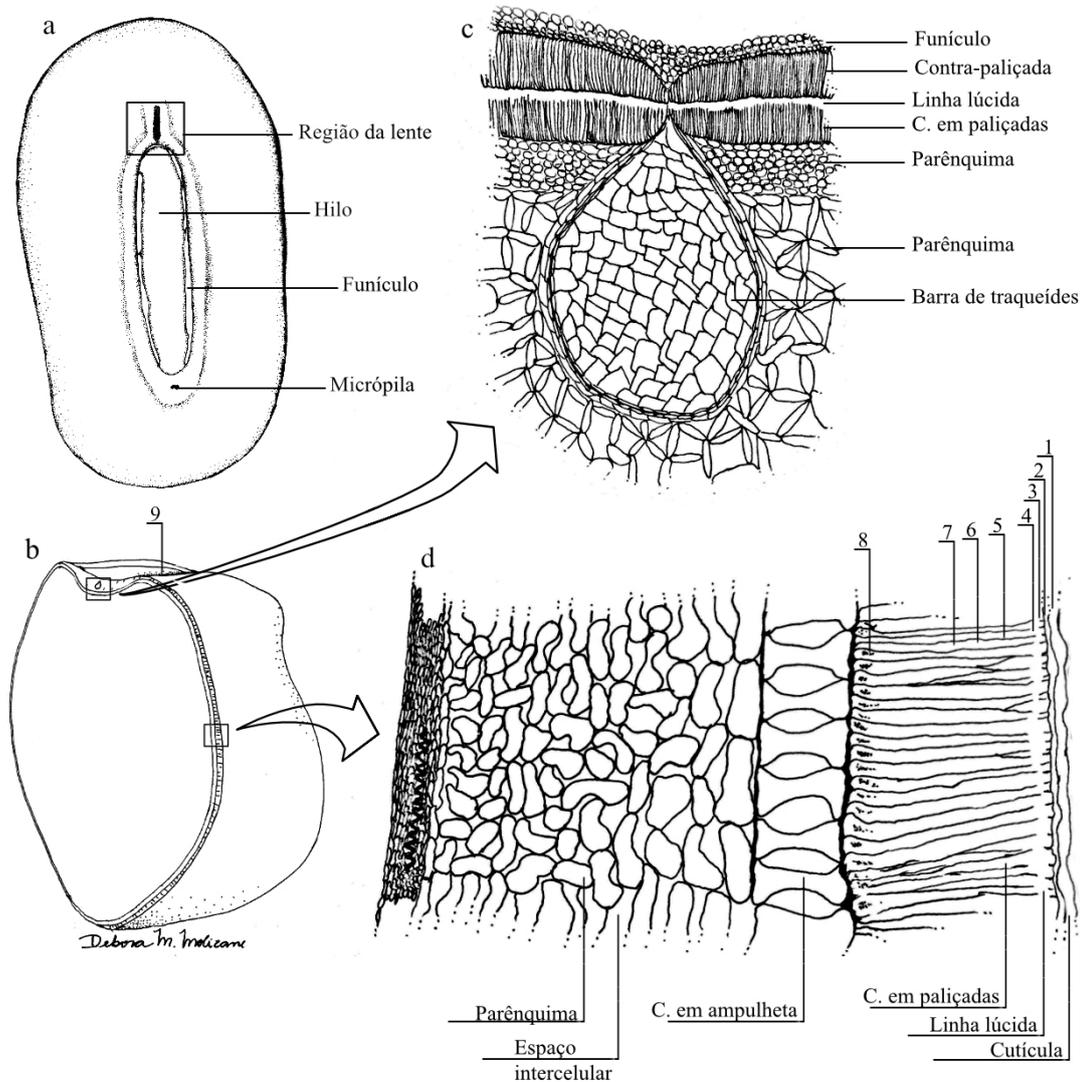


Figura 2. Semente de *E. speciosa*. (a) Aspecto visual da semente, demonstrando a região da lente, hilo, funículo e micrópila. (b) Corte transversal da semente. (c) Esquema anatômico da região do hilo. (d) Esquema anatômico da testa com um esquema hipotético sobre as possíveis causas da dormência física em sementes. (1) camada cerosa sobre a camada de células paliçadas; (2) presença de uma camada subcircular de mucilagem composta por substâncias pécticas insolúveis que retraem após a dessecação e tem alterações químicas que a tornam menos permeáveis; (3) quitina ou suberina no exterior da camada periclinal; (4) zona da linha lúcida; (5) suberina na lamela média, que pode estar presente no entorno das paredes celulares e espaços intercelulares, ou na parte interna da parede periclinal; (6) alterações na estrutura da celulose durante a desidratação, que é uma mudança irreversível através do potencial do inchaço dos géis; (7) contração das células na camada paliçada; (8) presença de substâncias resistentes a água na camada paliçada, como por exemplo, lignina, tanino e quinonas; (9) enchimento de suberina na fenda estrofiolar.

5.1 Testa

5.1.1 Cutícula cerosa

A camada mais externa da semente é a cutícula cerosa com espessura variável de espécie para espécie, que juntamente com as células em paliçadas promovem a textura da testa. A cutícula também é de grande importância pois suas propriedades estão normalmente relacionadas com a impermeabilidade das sementes duras e recobrindo a semente como um todo, com exceção à região do hilo. Em algumas espécies de Fabaceae, como o feijão, a superfície também é modificada por uma atividade secretora do fruto, que deposita proteínas hidrofóbicas na cutícula (Smýkal *et al.*, 2014).

5.1.2 Células em paliçadas

A epiderme é formada por apenas uma camada paliçada, também conhecida como macroesclereídes. O termo esclereide foi proposto por Tschirch por volta de 1890 e recebeu esse nome por conta dos elementos que são mais curtos que uma fibra e possuem paredes espessadas. Essa camada apresenta células alongadas perpendicularmente à superfície externa da semente e duas camadas de células na região do hilo, denominada contra-paliçada originada a partir do funículo (Cavazza, 1950).

A camada de células em paliçadas presente na testa é derivada da protoderme do óvulo jovem, com um padrão de diferenciação da testa, alongando o estrofiolo nas paredes laterais do óvulo. Então ocorre rápidas divisões anticlinais, alongamento e alargamento na direção tangencial das células em paliçadas. Essas células possuem parede secundária extensiva, onde geralmente na maturidade, as células não se apresentam vivas e ainda estão recobertas por calose nos limites externos da testa. É comum os vacúolos dessas células da epiderme estarem preenchidas com tanino, indicando assim o motivo da dureza da testa das sementes. O tanino presente nessas células podem ter uma função fungicida, a fim de proteger as sementes contra

a ação de patógenos presentes no solo durante o processo de germinação e desenvolvimento da plântula jovem (Reeve, 1946; Kantar *et al.*, 1996; Smýkal *et al.*, 2014).

5.1.2.1 *Linha lúcida*

Na camada de células em paliçadas, é possível observar, em algumas espécies, a presença de uma linha brilhante que separa a parte basal do topo. Essa linha recebe o nome de linha lúcida, que é uma região densa e composta por microfibrilas que mudam de longitudinais para transversais, produzindo assim uma alteração na parede celular. A linha lúcida pode ser observada tanto em sementes impermeáveis como nas sem dormência, mas em densidades diferentes. O lume das células em paliçadas, geralmente, é irregular e cônico em direção a superfície da semente. Em feijão, por exemplo, foi possível observar também a presença de poros, rachaduras ou outras irregularidades na superfície da semente, que está relacionada com a permeabilidade a água. Porém existem relatos de que a linha lúcida seja a responsável pela impermeabilidade do tegumento em relação a água por serem regiões mais densas, possuírem menores teores de água e ausência de canais. As sementes que não estão totalmente impermeáveis apresentam, na camada de células em paliçadas, uma separação entre as células, permitindo assim que a água penetre e dê início ao processo de germinação (Pammel, 1899; D'Ippolito, 1905; Gola, 1905; Cavazza, 1950; Corner, 1951; Rolston, 1978; Werker, 1981; Kelly *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1999; Souza e Marcos-Filho, 2001; Ferreira *et al.*, 2011; Smýkal *et al.*, 2014).

5.1.3 *Células em formato de ampulheta*

A hipoderme é formada por uma única camada de células em formato de ampulheta, também descrita como osteosclereídes, separadas por amplos espaços intercelulares, podendo ser também denominadas de células pilares ou lagenosclereídes, dependendo do padrão da parede celular e seu formato (Moïse *et al.*, 2005). A camada de células em formato de

ampulheta está presente em todo tegumento abaixo da camada de células em paliçadas, com exceção do hilo. Essas células apresentam paredes espessas fundidas no parênquima. As características apresentadas pelas células em formato de ampulheta e os espaços intercelulares estão relacionadas com três fatores, o primeiro é a diminuição das divisões celulares após a formação da camada hipodérmica, o segundo é a separação radial das paredes celulares e o alongamento das extremidades e o terceiro é esses espaços intercelulares preenchidos com ar, que auxiliam na flutuabilidade da semente contribuindo no momento da dispersão (Cavazza, 1950; Moïse *et al.*, 2005; Smýkal *et al.*, 2014).

Logo no início da formação da camada de células em formato de ampulheta, ocorrem divisões rápidas anticlinais e periclinais, e o formato dessas células são similares ao parênquima adjacente, mas aos poucos as células vão se diferenciando até obter o formato final, ocorrendo somente o incremento das paredes celulares após este processo (Reeve, 1946; Van Dongen *et al.*, 2003).

5.1.4 Parênquima

A quarta camada é formada por células parenquimáticas. Na semente madura, as células do parênquima perdem o protoplasto e se apresentam parcial ou completamente condensadas com abundantes espaços intercelulares. Frequentemente apresentam de 5 a 12 camadas, mas somente na região abaixo do hilo que a quantidade de camadas aumenta consideravelmente. O parênquima geralmente não está relacionado com a impermeabilidade em relação a água, mas em alguns casos, essa camada apresentou calose, o que a tornaria impermeável (Cavazza, 1950; Corner, 1951; Rolston, 1978; Werker, 1981; Kelly *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1999; Souza e Marcos-Filho, 2001; Moïse *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2011; Smýkal *et al.*, 2014).

O parênquima presente na região subhilar é um dos primeiros filtros de proteção contra os possíveis patógenos que podem atacar a semente e promover sua morte, enquanto a semente está no estado impermeável (Ceballos *et al.*, 1998).

É descrito na literatura que durante o desenvolvimento da semente as células de parênquima contêm numerosas organelas, como amiloplastos, retículo endoplasmático rugoso (RER), ribossomos, plastídios, dictiossomos e mitocôndrias, sugerindo assim que esse tecido é metabolicamente ativo. Por conter RER, sugere-se que essas células produzam nutrientes destinados para o desenvolvimento do embrião. Essas camadas também possuem amplos espaços intercelulares, que durante o desenvolvimento da semente é preenchido por uma solução aquosa, facilitando assim a difusão de nutrientes para serem armazenados nos cotilédones. Após maturidade da semente essas células se degeneram e se tornam uma fonte maior de nutrientes para o embrião (Moïse *et al.*, 2005).

5.2 *Micrópila e hilo*

A micrópila é o ponto de entrada do tubo polínico para a fecundação do óvulo. Já o hilo nas leguminosas é uma cicatriz oval que promove a conexão entre a planta-mãe e a semente através do funículo, que conta também com uma camada de células residuais chamadas contra-paliçadas. (Cavazza 1950, Hyde 1954, Lersten 1982, Oliveira & Paiva 2005).

5.3 *Barra de traqueídes*

Abaixo da região do hilo, existe um tecido chamado de barra de traqueídes, que possui formato oval e que conecta a extremidade superior com a fenda hilar. O tamanho da barra de traqueídes varia de acordo com a espécie. Ao redor é possível várias camadas de células de paredes finas. O parênquima dessa região é formado por 3 camadas diferenciadas de células: (1) parênquima de paredes finas, continuando a camada de nutrição; (2) parênquima com

paredes espessas, com formato de estrela e abundantes espaços intercelulares cujo ar não é facilmente expelido; (3) células alongadas de parênquima com paredes finas que cercam a barra de traqueídes (Cavazza, 1950).

A barra de traqueídes, durante o desenvolvimento da semente, transporta nutrientes para as células em paliçadas e parênquima. Na fase de secagem, a barra de traqueídes é considerada uma bomba higroscópica abaixo da epiderme impermeável da testa, responsável pela desidratação rápida da semente nas fases finais de maturação. A barra de traqueídes é composta por células semelhantes aos traqueídes, com paredes lignificadas e quase sempre orientadas perpendicularmente ao eixo maior do hilo, sendo diferenciada e rodeada por parênquima frouxo com células de composição fenólica na região subhilar (Cavazza, 1950; Hyde, 1954; Lersten, 1982; Oliveira e Paiva, 2005).

5.4 A Lente (*estrofiolo*)

Na região do hilo, no lado oposto da micrópila e próximo a rafe, é possível encontrar a lente ou estrofiolo. Esta estrutura é considerada o primeiro ponto de entrada de água na semente, que pode ser facilmente aberta por variações externas (como por exemplo calor ou ação mecânica), ou por variações internas (Rolston, 1978; Ceballos *et al.*, 1998; Lersten *et al.*, 1992). A camada paliçada da testa na região da lente é modificada para facilitar a abertura para entrada de água e uma vez aberta não pode ser fechada. A flutuação na temperatura é um dos fatores ambientais citados como causa para que ocorra a ruptura na lente, mas o processo ainda não foi totalmente elucidado (Baskin, 2003; Smýkal *et al.*, 2014).

6 Influência das condições ambientais sob a maturação de sementes

Estudos realizados em semente de *Caesalpinia echinata* Lam., oriundas de um mesmo local e coletadas em dois anos consecutivos, mostraram que a quantidade de chuva influenciou o tamanho das sementes e o período de maturação (Borges *et al.*, 2005). Em

Eugenia pyriformis Cambess. também se verificou que um período mais chuvoso ou com baixas temperaturas pode retardar a maturação e influenciar a qualidade fisiológica das sementes (Lamarca *et al.*, 2013).

Da mesma forma, o grau de dormência pode ser regulado por vários fatores ambientais e, ainda, pela origem (população), ano de coleta dentro da mesma população, indivíduos diferentes, idade da planta, nutrição durante a maturação e posição da semente na planta-mãe (Probert, 2000). Estudos realizados por Baskin & Baskin (2014) mostram que o déficit hídrico durante a maturação das sementes promoveu alteração na dormência. Das 13 espécies analisadas, sete tiveram redução na dormência e seis tiveram aumento, dificultando a identificação de um padrão consistente para determinar o gatilho para instalação da dormência física.

Outro fator que pode influenciar o grau de dormência física é a umidade relativa. Sementes sem dormência física que foram armazenadas em uma condição de umidade relativa alta desenvolveram a impermeabilidade do tegumento. Quando a umidade relativa ao redor da semente diminuiu, as células da contra-paliçada na região do hilo se encolheram promovendo a sua abertura. No momento em que a umidade relativa aumentou no entorno da fissura, as células da contra-paliçada incharam causando o fechamento do hilo (Baskin e Baskin, 2014).

Diferenças no grau de dormência também foram observadas em sementes de *E. speciosa* coletadas em dois anos consecutivos em um mesmo local. No primeiro ano de coleta foi observada uma porcentagem de germinação de 40% sem nenhum tratamento para superação da dormência, já no segundo ano de coleta foi observada apenas 2% de germinação. Em estudos de superação com ácido sulfúrico, para as mesmas coletas, foram necessários 15 minutos de imersão para obter 100% de germinação no primeiro ano e 40 minutos de imersão para obter os mesmos 100% de germinação no segundo ano. Essas diferenças podem estar relacionadas com as alterações climáticas sob a planta-mãe durante o processo de formação das sementes. O autor sugere que novos estudos são necessários para

correlacionar as alterações do clima sobre a dormência nas sementes dessa espécie (Molizane, 2012).

7 Objetivos geral

O objetivo foi identificar as alterações morfológicas, físicas e fisiológicas relacionadas com a dormência física por impermeabilidade do tegumento após a redução no teor de água durante a maturação em sementes de *Erythrina speciosa* Andrews.

Objetivos específicos:

- Avaliar a maturação das sementes de *E. speciosa*, a fim de identificar os estádios a serem analisados para a instalação da dormência em sementes imaturas e realizar ontogênese da testa para identificar a origem dos tecidos presentes na semente madura;
- Avaliar metodologias eficientes para superação da dormência, que possam ser utilizadas nas sementes imaturas sem causar danos ao embrião;
- Reduzir o teor de água das sementes nos estádios imaturos para indução da dormência física.

Capítulo 1 - Formação e maturação de sementes de *Erythrina speciosa*

Andrews

RESUMO – A qualidade fisiológica da semente está diretamente relacionada com o sucesso no desenvolvimento da planta dela originada. Conhecer o processo de maturação e o ponto de maturidade fisiológica torna-se fundamental na obtenção de coletas de semente com elevado potencial de produzir novas plantas. *Erythrina speciosa* Andrews (Leguminosae, Faboideae) é uma espécie que ocorre na Mata Atlântica e no Cerrado, e suas sementes são extremamente tolerantes à dessecação e podem ser armazenadas por vários anos e, além disso, apresentam tegumento impermeável à água quando maduras. Neste trabalho buscou-se realizar um estudo ontogênico da testa das sementes de *Erythrina speciosa* a fim de identificar os tecidos do tegumento da semente e quais suas relações com a dormência física. Buscou, também, analisar o processo de maturação visando a identificar diferentes estádios através de alterações físicas, fisiológicas, morfológicas e anatômicas que auxiliem no momento correto de coleta do material e, ainda, avaliar a influencia das condições ambientais sobre a maturação das sementes. Para isso coletas realizadas desde a flor em antese até a semente madura. Para ontogênese o material foi fixado em FAA 70 e infiltrado em resina plástica, cortado em micrótomo e corado com azul de toluidina. Para a maturação as sementes foram separadas conforme aspectos visuais da semente em 6 estádios distintos, corroborados pelos resultados físicos, fisiológicos e também anatômicos.

Palavras-chave: dormência, impermeabilidade do tegumento, Mata Atlântica, sementes florestais.

1 Introdução

A qualidade fisiológica da semente está diretamente relacionada com o sucesso no desenvolvimento da planta dela originada. Essa qualidade depende, entre outros fatores, do estágio de maturação no qual a semente se encontrava quando colhida ou dispersa naturalmente. Portanto, conhecer o processo de maturação e o ponto de maturidade fisiológica, ou seja, o momento no qual a semente se apresenta com a máxima qualidade fisiológica, torna-se fundamental na obtenção de lotes de semente com elevado potencial de produzir novas plantas. Contudo, a importância do conhecimento do processo de maturação das sementes não se limita a esse objetivo. Diversos processos que ocorrem nas sementes dependem do seu grau de maturidade, ou seja, de quanto a semente já se desenvolveu na planta-mãe. Barbedo *et al.* (2013), por exemplo, consideram que a própria distinção entre sementes ortodoxas e recalcitrantes seja consequência do estágio de maturação em que as sementes se encontravam quando foram dispersas.

Há poucos relatados na literatura sobre estudos de maturação, devido à frequente dificuldade na condução desse tipo de pesquisa. Um estudo de maturação clássico envolve a marcação de flores por ocasião de sua antese e o acompanhamento do desenvolvimento das sementes, com colheitas periódicas, como realizado para *Caesalpinia echinata* Lam. (Borges *et al.*, 2005) o que torna essa metodologia de difícil aplicação por vários motivos, como por exemplo, pela dificuldade na marcação das flores, pela baixa produção de sementes das flores marcadas, pela dificuldade na colheita periódica das sementes, entre outros fatores. Uma forma de contornar tal problema é associar o grau de maturação das sementes com suas características visuais externas, com seu teor de água, seu conteúdo de massa seca ou, até, com as características dos frutos, como realizado com sementes de *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz (Silva *et al.*, 2015).

As condições ambientais, as quais a planta-mãe está submetida podem interferir com o processo de maturação das sementes, causando variações na qualidade fisiológica e, também,

no grau de dormência. Esses fatores indicam que as variações na impermeabilidade do tegumento ocorrem naturalmente ao longo de maturação. Portanto, as sementes da mesma espécie podem apresentar diferenças consideráveis quanto à dormência física, se produzidas em locais ou anos diferentes (Hyde, 1954; Standifer *et al.*, 1989; Perez, 2004; Gama-Arachchige *et al.*, 2011; Lamarca *et al.*, 2013).

Erythrina speciosa Andrews (Leguminosae, Faboideae) é uma espécie que ocorre na Mata Atlântica e no Cerrado. É popularmente conhecida como eritrina-candelabro, maçaranduba, mulungu, saranduba ou suinã. É espécie com árvores entre 3-5 metros de altura e amplamente utilizada como planta ornamental. Suas sementes são extremamente tolerantes à dessecação e podem ser armazenadas por vários anos e, além disso, apresentam tegumento impermeável à água quando maduras (Krukoff e Barneby, 1974; Faria *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2010; Lima, 2014).

Neste trabalho buscou-se realizar um estudo ontogênico em sementes de *Erythrina speciosa* a fim de identificar os tecidos do tegumento da semente e quais suas relações com a dormência física. Também analisar o processo de maturação visando a identificar diferentes estádios através de alterações físicas, fisiológicas, morfológicas e anatômicas que auxiliem no momento correto de coleta do material e, ainda, avaliar a influencia das condições ambientais sobre a maturação das sementes.

2 Material e métodos

Material vegetal: Frutos de *Erythrina speciosa* foram coletados de 30 matrizes do Parque Cultural Catavento, em área urbana do município de São Paulo, SP (23°32'44"S e 46°37'40"O). Entre os meses de agosto a outubro de 2010, 2011, 2012, 2013, 2014 e 2015. Três amostras foram coletadas a cada ano, a fim de obter dados sobre todos os níveis de maturação. A extração das sementes foi realizada por fase de frutificação e a remoção por processo manual.

As sementes foram, então, classificadas em seis estádios de maturidade com base em seu tamanho e nas características morfológicas do tegumento. A partir desta separação, foram efetuadas as análises de teor de água, conteúdo de massa seca e germinação. O teor de água e o conteúdo de massa seca das sementes foram avaliados pelo método gravimétrico, em estufa a 103°C por 17 horas. Os resultados foram apresentados em porcentagem (base úmida) e em mg/semente (Brasil, 2009).

Foram realizados testes de germinação para cada estágio acima mencionado, utilizando rolos de papel pré-umedecidos com água de torneira (2,5 vezes o peso do papel) como substrato (Brasil 2009) e colocados em câmara de germinação a 25 °C, com umidade relativa de 70% sob luz constante. As avaliações foram realizadas a cada dois dias durante 30 dias e foram registradas as sementes que apresentaram protrusão de raiz primária igual ou superior a 0,5 cm para o cálculo de germinação. Também foi calculado o tempo médio de germinação de cada estágio de acordo com a fórmula apresentada por Borghetti e Ferreira (2004).

Estudos ontogênicos - A ontogênese da semente foi classificada em 4 estádios. No primeiro estágio, as sementes apresentavam aproximadamente 0,4 cm de comprimento e 0,2 cm de largura, coloração verde leitosa. O segundo estágio tinha aproximadamente 0,8 cm de comprimento e 0,4 cm de largura e coloração verde leitosa. O terceiro tinha 1,5 cm de comprimento e 0,6 cm de largura, coloração verde brilhante. E o quarto estágio tinha 1,27 cm de comprimento e 0,7 cm de largura, coloração amarronzada. Foram coletadas 3 amostras de cada estágio acima citado, que após a coleta foram fixados em FAA70 (Johansen, 1940) e depois armazenados em etanol a 70%, infiltradas em resina plástica seccionada transversal e longitudinalmente utilizando uma navalha descartável em micrótomo rotativo manual RM 2245 a 7µm de espessura e corados com azul de toluidina 0,05% (O'Brien *et al.*, 1964). Análise das lâminas foram realizada usando um microscópio de luz Olympus BX51 e as imagens foram capturadas com uma câmera digital Olympus DP71 acoplado ao Software DP Manager.

Análise anatômica da testa do estádio 6 - as sementes do estádio 6 da coleta do ano de 2012 tiveram seu tegumento no lado oposto do hilo, região hilar e cotilédones analisados anatomicamente. As sementes passaram pelo mesmo processo de inclusão em resina descrito para a ontogênese.

Análises ultraestruturais: As amostras foram fixadas em FAA 70 e armazenadas em álcool 70% e passadas por ponto crítico no equipamento Ponto Crítico Balzers Union. O tegumento das sementes depois foram então aderidas ao porta amostra por meio de uma fita adesiva condutiva, e metalizadas com ouro ionizado, no metalizador Bal-tec SCD 050. Após a metalização, as amostras foram levadas para o microscópio eletrônico de varredura SEM 515 da Philips para observação.

Com base nas imagens obtidas, foram analisadas as diferenças apresentadas pelo tegumento de sementes maduras (estádio 6) de seis coletas com auxílio de ImageJ Software, nas quais foram medidas as seguintes estruturas: altura das células em paliçadas e espessura da cutícula.

Dados climáticos - os dados de temperatura máxima, temperatura mínima e precipitação pluvial dos locais de coleta, nos seis anos de estudo, foram obtidos na estação meteorológica do Parque de Ciência & Tecnologia da USP (23°39'4" S, 46°37'20" W). O balanço hídrico sequencial foi calculado com base nos dados de precipitação utilizando o modelo proposto por Thornthwaite e Mather (1955), em ordem decrescente de escala com capacidade de água disponível (AWC) de 125 mm (Leivas *et al.*, 2006; Rolim *et al.*, 2007).

Análise estatística: O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, abrangendo 6 estádios de maturação analisados entre si durante 6 ciclos de maturação. Cada idade contou com 4 repetições de 20 sementes para as análises fisiológicas e 5 sementes para as análises físicas. Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Gomes, 1982), onde foi utilizado programa estatístico R.

3 Resultados e discussão

Estudos ontogênicos

O ovário de *E. speciosa* é súpero e com placentação marginal (figura 1a). Como foi observado por Palermo & Agostini (2010), cada ovário apresenta em média 15 óvulos, mas somente 46% são fecundados. Os óvulos de *E. speciosa* (figura 1b, c) são bitegumentados, campilótopos com micrópila em zigzag; a calaza e tegumento externo com 4 camadas na anti-rafe, e o interno é composto por 3 camadas. A presença dos tegumentos externos e internos também podem ser observados nos cortes transversais (figura 1d, e). Na região da micrópila o tegumento externo tem um grande aumento no número de camadas e na região da rafe o número de camadas celulares passa de 16.

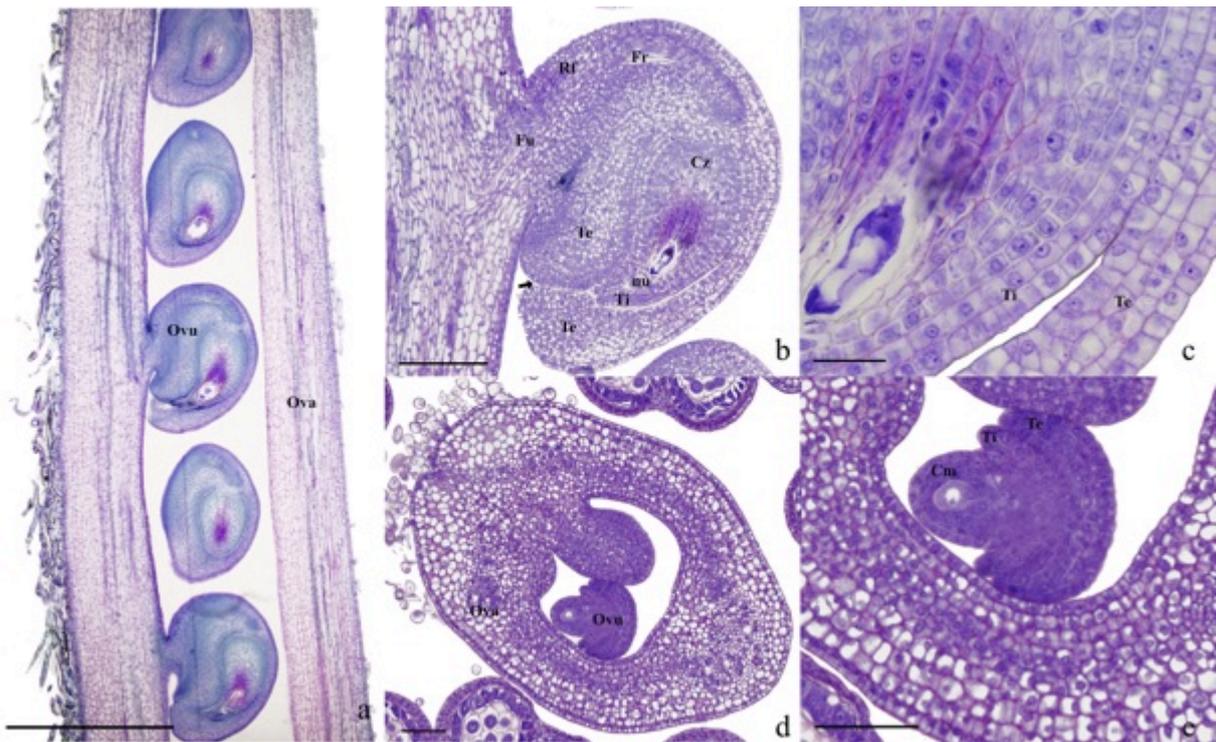


Figura 1. Ovário e óvulos de *Erythrina speciosa*. (a) Ovário em corte longitudinal mostrando óvulos. (b) Óvulo maduro em corte longitudinal. (c) Detalhe do óvulo evidenciando o tegumento externo, interno e saco embrionário em corte longitudinal. (d) Ovário em corte transversal evidenciando o início de formação dos tegumentos. (e) detalhe do óvulo em corte transversal evidenciando os tegumentos interno, externo e nucelo. Cz – Calaza; Cm – Célula mãe de megásporo; Fr – Feixe rafeal; Fu – Funículo; nu – nucelo, Ti – Tegumento interno; Te – Tegumento externo; Ova – Ovário, Ovu – Óvulo; Rf – Rafe; → micrópila. Escalas: (a) 500µm; (b) 100µm; (c) 20µm; (d) 50µm; (e) 50µm.

As sementes de *E. speciosa* apresentam características clássicas das sementes com dormência de leguminosas. A presença de uma cutícula espessa, células em paliçadas e a linha lúcida presentes em *E. speciosa* também foram observadas em sementes com dormência física de *Glycine max* (L.) Merr., *Vicia sativa* L. e *Medicago truncatula* Gaertn. (Harris, 1987; Büyükkartal *et al.*, 2013; Chai *et al.*, 2016).

Ontogênese do envoltório

No estágio 1 (figura 2a, b e f) o tegumento externo, na anti-rafe, tem 4 camadas. Há um discreto aumento radial das células da epiderme externa do tegumento externo, que é recoberto por cutícula. Não há alteração nas outras camadas celulares do tegumento externo e no tegumento interno.

No estágio 2 (figura 2c e g) a epiderme externa presente no tegumento externo, passa por alongamento celular, iniciando a formação das células em paliçadas. A parede periclinal externa se torna espessada e é recoberta por cutícula mais espessa que no estágio anterior. A parede periclinal interna também se torna espessada e nenhuma mudança é observada no restante do tegumento externo ou interno.

No estágio 3 (figura 2d e h) as células em paliçada se alongam, mais que o estágio anterior e aumentam também a espessura das paredes periclinais externa e interna da camada em paliçada, além da cutícula. Nesta fase já é possível observar a diferenciação da camada de células em ampulheta posicionadas logo abaixo da exotesta em paliçada. As células mais internas do tegumento externo (parênquima) tem as paredes espessadas e o tegumento interno se apresenta colapsado.

No estágio 4 (figura 2e, i), em que a semente madura está pronta para dispersão, a exotesta em paliçada apresenta células com as paredes espessadas, recoberta por grossa cutícula, e com depósito de compostos fenólicos no citoplasma. A camada de células em

ampulheta apresenta grandes espaços intercelulares entre as células e o restante do tegumento externo e interno se apresentam com as células colapsadas.

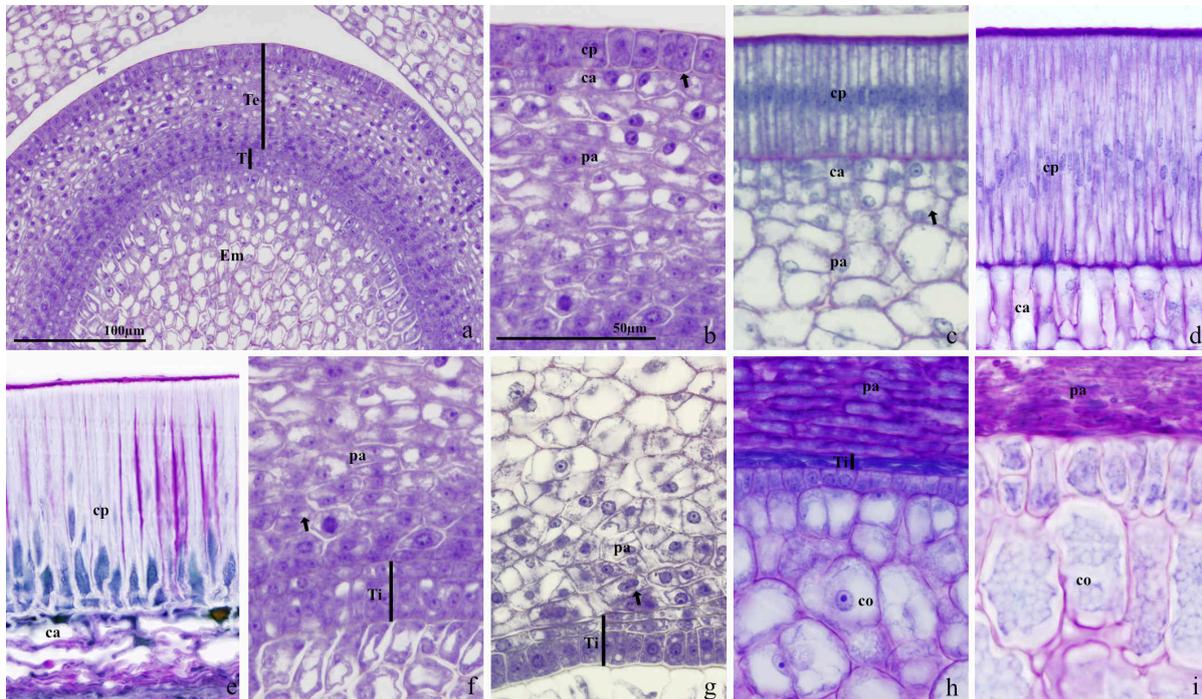


Figura 2. Desenvolvimento dos tegumentos externos e internos de *Erythrina speciosa*. (a) Visão geral da semente em desenvolvimento, evidenciando os tegumentos interno e externo. (a, b, f) estágio 1; (c, g) estágio 2; (d, h) estágio 3; (e, i) estágio 4. (b) Tegumento externo passando por diferenciação celular. (c-d) Alongamento das células em paliçadas e em ampulheta. (e) células em paliçadas e em ampulheta em sementes maduras. (f) Detalhe do tegumento interno formado por 3 camadas de células no estágio 1. (g, h) Redução da altura das células do tegumento interno nos estádios 2 e 3 respectivamente. (i) Células do tegumento interno colapsadas e indiferenciadas do parênquima na semente madura. ca – célula em ampulheta; co – cotilédone; cp – célula em paliçada; Em – embrião; pa – parênquima; Te – tegumento externo; Ti – tegumento interno.

Momentos após a fecundação, as células da testa passam pelo processo divisão e alongamento celular e depois pelo processo de diferenciação. As células do tegumento externo formam as células em paliçadas, as células em ampulheta e o parênquima presentes na semente madura, já as células do tegumento interno são obliteradas. A presença de compostos fenólicos nas células em paliçadas tem a função de proteger as sementes contra a herbívora. As células em ampulheta, por possuírem amplos espaços intercelulares preenchidos com ar na semente madura, tem a função de auxiliar na flutuabilidade (Cavazza, 1950; Moïse *et al.*, 2005; Cárdenas-Hernández *et al.*, 2011; Smýkal *et al.*, 2014).

O parênquima é um tecido importante na testa das sementes, por possuir muitas organelas, como por exemplo amiloplastos, retículo endoplasmático rugoso e plastídios,

sendo um tecido metabolicamente ativo que fornece nutrientes para o embrião durante o desenvolvimento. Nos estádios imaturos, as sementes possuem elevados teores de água, sugerindo que a água presente preencha os espaços intercelulares auxiliando no transporte de nutrientes entre a planta-mãe e o embrião. Já no estágio maduro, o tecido parenquimático é considerado uma das barreiras de proteção, durante a embebição, contra patógenos que podem deteriorar o embrião (Ceballos *et al.*, 1998; Moïse *et al.*, 2005; Smýkal *et al.*, 2014).

Região Hilar

A região hilar das sementes de *E. speciosa* é formada por estruturas elaboradas, com uma dupla camada de células em paliçadas, a barra de traqueídes e o parênquima ao redor da barra de traqueídes.

- Paliçada e Contra-paliçada

Na região do hilo, é possível observar as células da paliçada e contra-paliçada, que são

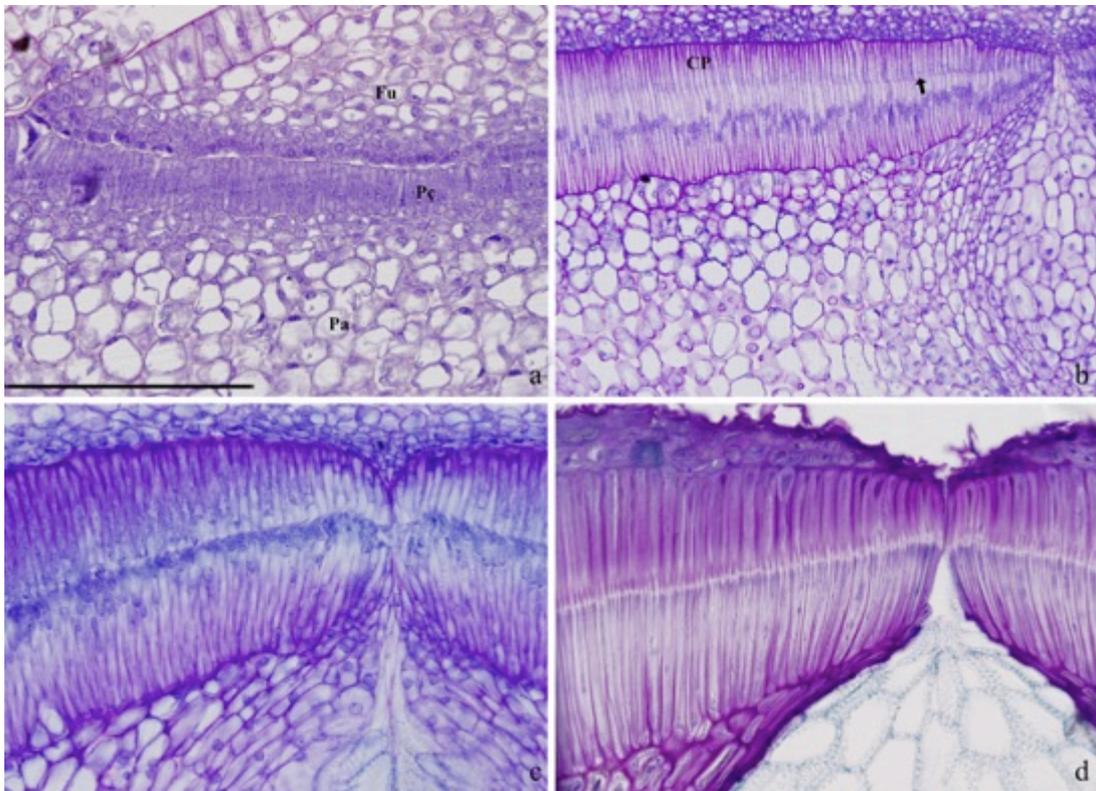


Figura 3. Diferenciação da contra-paliçada em corte transversal do hilo em sementes de *Erythrina speciosa*, visto em microscopia de luz (a) estágio 1; (b) estágio 2 (c) estágio 3; (d) estágio 4. Fu – Funiculo; Pc – células em paliçadas; Pa – Parênquima, CP – contra-paliçada → divisão da camada em paliçada, formando a contra-paliçada. Escalas: 50µm.

consideradas tecidos motores, visto que a umidade relativa cai, a contra-paliçada desidrata e encolhe as margens da fissura e quando a umidade relativa aumenta elas ficam túrgidas e fecham (Hyde, 1954).

No estágio 1 (figura 3a) ocorre um aumento radial nas células paliçadas. Não foi possível observar neste estágio as células contra-paliçadas. No estágio 2 (figura 3b) é possível observar o alongamento das células em paliçadas e o início da divisão celular a partir da fenda hilar para a região periférica do hilo, na formação da camada contra-paliçada. No estágio 3 (figura 3c) a divisão celular já está completa, porém as células em paliçadas apresentam paredes finas. Já no estágio 4 (figura 3d) é possível observar o espessamento na parede celular tanto das células em paliçadas e como nas contra-paliçadas ainda a presença da linha lúcida entre essas células.

- Barra de traqueídes

No estágio 1 (figura 4a) as células que irão formar a barra de traqueídes ainda estão em

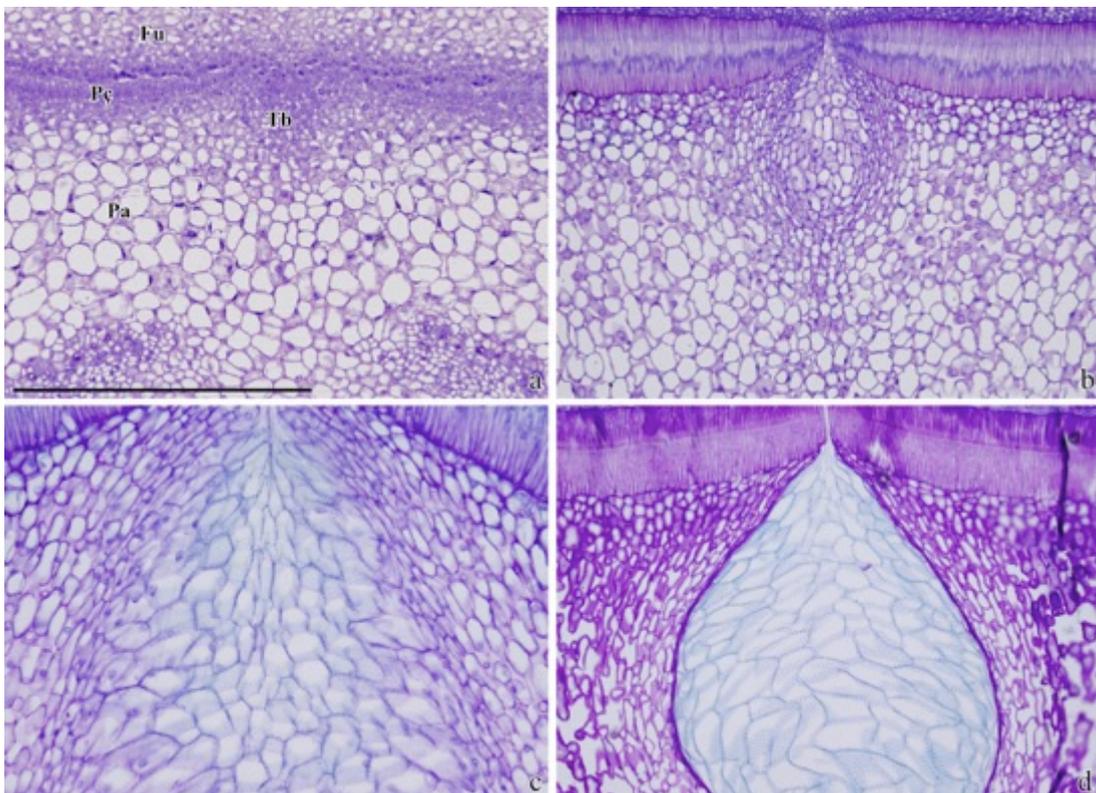


Figura 4 – Desenvolvimento da barra de traqueídes em sementes de *Erythrina speciosa*. (a) Estádio 1; (b) estágio 2; (c) estágio 3; (d) estágio 4. Fu – Funiculo; Pa – Parênquima; Pc – Células em paliçadas; Tb – Barra de traqueídes. Escala 200µm.

processo de divisão celular, sem apresentar um formato definido. No estágio 2 (figura 4b) é possível observar a divisão e expansão das células que formarão a barra de traqueídes. No estágio 3 (figura 4c), as células da barra de traqueídes passam por diferenciação celular da região central para as regiões periféricas. Nesse estágio a barra de traqueídes apresenta um formato ovoide, sem limites ainda definidos. Já no estágio 4 (figura 4d) é possível observar a completa diferenciação do tecido que forma a barra de traqueídes, sendo circundada por uma camada espessa de pectina.

A barra de traqueídes tem paredes lignificadas e quase sempre orientadas perpendicularmente ao eixo maior do hilo sendo diferenciada e rodeada por parênquima frouxo com células de composição fenólica na região subhilar. As células que formam a barra de traqueídes possuem paredes espessas e ornamentações elaboradas (figura 4a, b, c). A barra

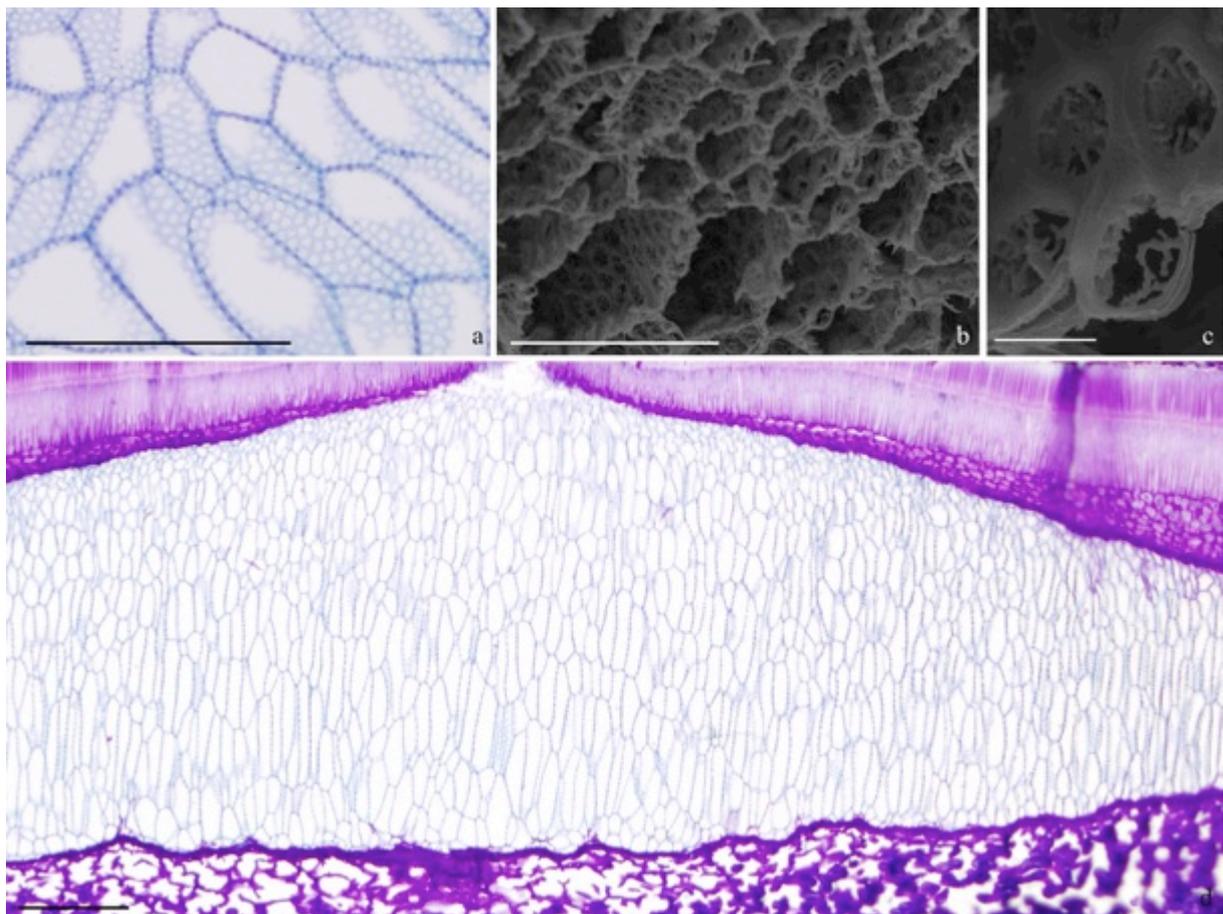


Figura 5 – Detalhe da barra de traqueídes em sementes maduras de *Erythrina speciosa*. (a,d) Microscopia de luz; (b,c) Microscopia eletrônica de varredura; (a, b, c) corte transversal; (d) corte longitudinal. Escalas: (a,d) 100 μ m; (b) 50 μ m; (c) 5 μ m.

de traqueídes, comum na família leguminoseae, está presente em toda extensão do hilo (figura 4d) (Cavazza, 1950; Corner, 1951; Patel, 1976; Lersten, 1982).

- Lente

Nas sementes de leguminosas é possível observar a presença da lente, que geralmente está localizada próximo ao hilo, mas do lado oposto da micrópila. Em sementes de *E.*

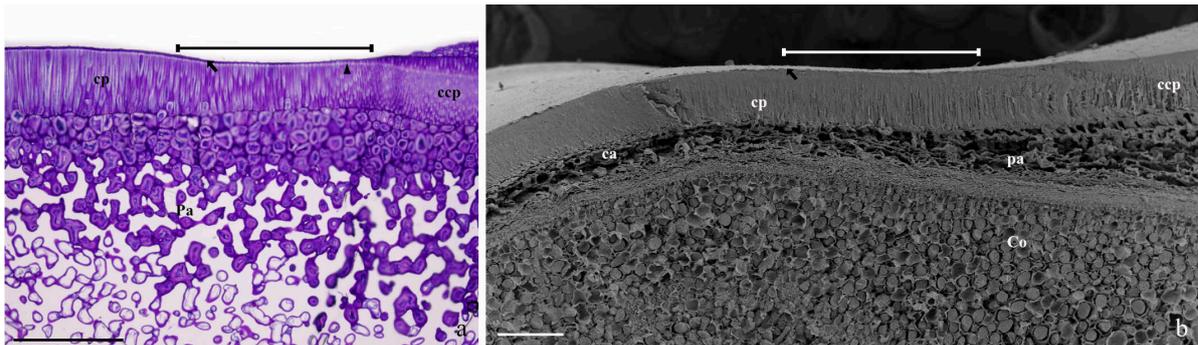


Figura 6 – Corte longitudinal em testa da sementes em *Erythrina speciosa*, evidenciando a lente (barra) (a) microscopia de luz; (b) microscopia eletrônica de varredura. Escalas: 50µm. ca – células em ampulheta; ccp – células contra-paliçadas; cp – células em paliçadas; pa – parênquima; ponta da seta – cutícula; ponta do triângulo – linha lúcida.

speciosa, a lente foi localizada próximo a rafe, e as células em paliçadas presentes nessa região são menores, como observa-se na Figura 6. A lente não faz parte da região hilar apesar de estar muito próxima (Lersten, 1982; Baskin, 2003).

Análises anatômicas

Análise anatômica - o tegumento de sementes dormentes dentro da família Fabaceae é composto de quatro camadas (Figura 7b): (i) a camada mais externa é a cutícula cerosa; (ii) a epiderme compreende apenas uma camada de paliçada também conhecida como células em paliçadas, além de camadas compreendendo células na região hilar também chamadas de contra-paliçadas. Nessa camada (epiderme) é possível observar a presença da linha lúcida, que é uma região densa; (iii) a hipoderme é formada por uma única camada de células em ampulheta, separadas por espaços intercelulares e ausentes na região hilar; (iv) a quarta e última camada é formada por células de parênquima, nas quais são frequentes nas sementes

maduras e se apresentam parcialmente ou completamente condensadas (Pammel, 1899; Cavazza, 1950; Corner, 1951; Rolston, 1978; Werker, 1981; Kelly *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1999; Souza e Marcos-Filho, 2001; Moïse *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2011; Smýkal *et al.*, 2014).

Na região do hilo foi possível observar a barra de traqueídes (figura 7c), comum nas Papilionoideae. Esta barra de traqueídes é larga, perfurada e lignificada. As células em paliçadas presentes nas sementes de *E. speciosa* são uniformes e na porção inferior é possível observar a presença de compostos fenólicos no lume celular. No entanto, como regra, a testa de sementes de leguminosas não é lignificada, portanto a dormência não é causada pela lignificação das células em paliçadas. A linha lúcida presente nas células em paliçadas localiza-se abaixo da cutícula e pode ser composta por cutina ou suberina e celulose.

As células de parênquima estão por todo tegumento de *E. speciosa*, também em torno da barra de traqueídes. Estas células são hidratadas nos quatro primeiros estádios de maturação, que correspondem ao elevado teor de água observado na análise física. Ao final da maturação (estádios 5 e 6), pode-se observar a redução do teor de água pela compactação do parênquima do tegumento e o aumento dos espaços intercelulares ao redor da barra de traqueídes, nas células em ampulheta e também entre as células do cotilédone. Além disso, observou-se uma camada espessa de pectina, em torno da barra da traqueídes e das células do cotilédone, nos estádios finais de maturação, mas esse fator não foi observado nos primeiros quatro estádios de maturação das sementes.

As células presentes nos cotilédones no estágio 1 têm vacúolos que apresentam retenção de água e pouca massa seca. Durante o processo de maturação a água é substituída por massa seca, como mostrado na Figura 7d, h, l, p. Uma redução evidente no teor de água ocorre no estágio 5 e 6 da maturação (Figura 7t, y) e esta redução pode ser observada através das membranas celulares que não estão próximas da parede celular.

Ao analisar minuciosamente o tegumento no estágio 5 e 6 da maturação da coleta de 2012, foi possível observar que houve uma diferença estatística na espessura da cutícula, onde

O

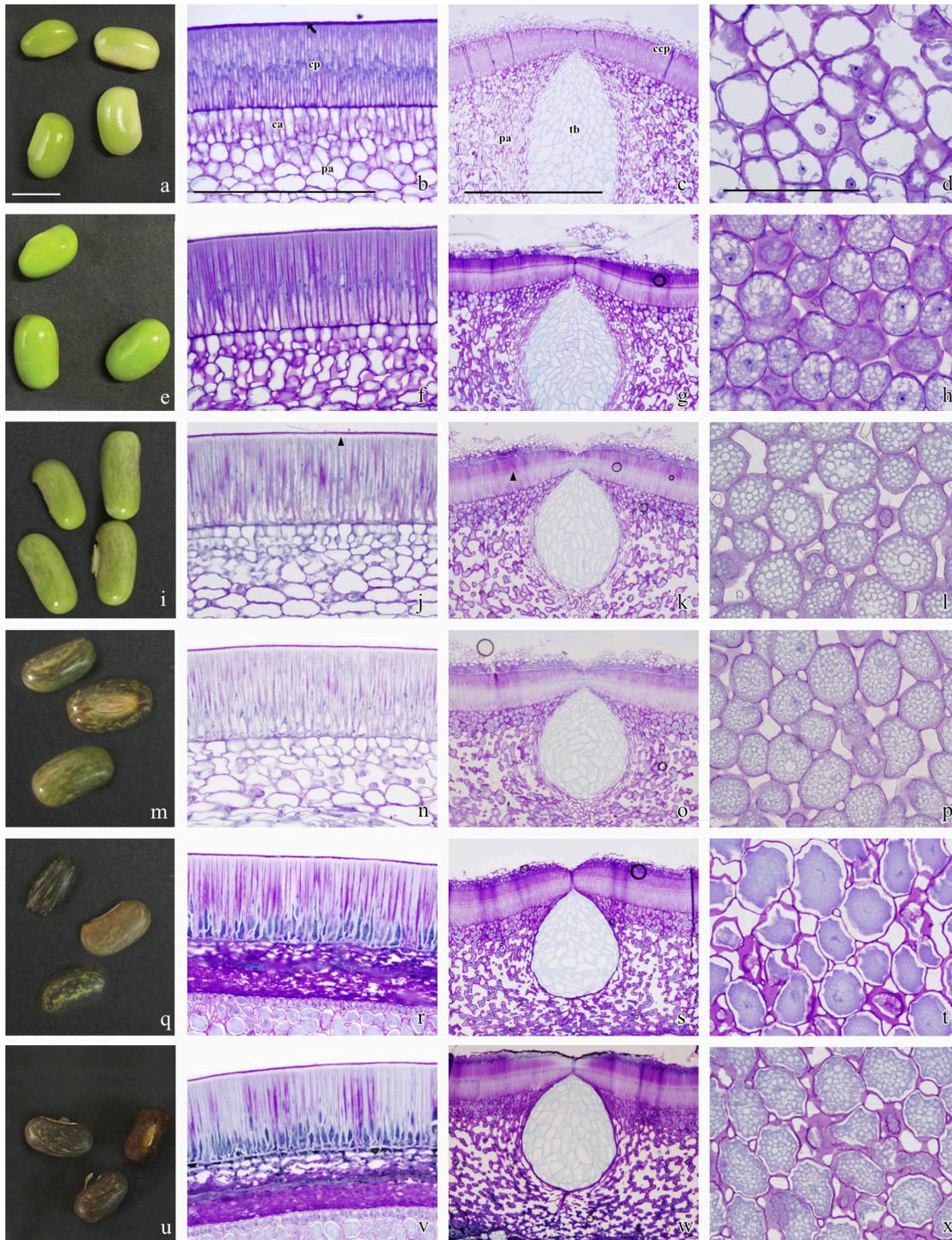


Figura 7. Aspectos visuais da cor do tegumento, anatomia da região do hilo, testa e cotilédones nos 6 estádios de maturação de sementes de *Erythrina speciosa*. Aspectos visuais das sementes (a, e, i, m, q, u). Anatomia da testa na região oposta ao hilo (b, f, j, n, r, v). Anatomia da região do hilo (c, g, k, o, s, w). Anatomia dos cotilédones (d, h, l, p, t, x). Estádio 1 (imaturo) (a-d). Estádio 2 (e-h). Estádio 3 (i-l). Estádio 4 (m-p). Estádio 5 (q-t) Estádio 6 (maduro) (u-y). Escalas: 1 cm (a, e, i, m, q, u). 200 μ m (b, f, j, n, r, v). 500 μ m (c, g, k, o, s, w). 100 μ m (d, h, l, p, t, x). ca – células em ampulheta; ccp – células contra-paliçadas; cp – células em paliçadas; pa – parênquima; tb – barra de traqueídes; ponta da seta – cutícula; ponta do triângulo – linha lúcida.

estádio 5 apresentou medida média de 0,110 μ m e no estágio 6 0,080 μ m. Essa diferença na espessura pode estar relacionada com a perda de água natural, uma vez que as sementes do estágio 5 tem a mesma aparência que as sementes do estágio 6, mas o tegumento do estágio 5 é amolecido e do estágio 6 tem aspecto rígido. Já nas células em paliçadas não foram observadas diferenças significativas quanto a altura das células.

Análises físicas e fisiológicas

Durante o período de maturação foi possível classificar essas sementes em 6 estádios distintos através de características morfológicas (figura 7), que também foram corroboradas pelos resultados físicos e fisiológicos. Estádio 1 (E1) - coloração verde-claro sem manchas no tegumento, comprimento médio de 1,3 cm (Figura 1a); Estádio 2 (E2) - coloração verde-claro, comprimento médio de 1,6 cm (Figura 1e); Estádio 3 (E3) - coloração verde-claro com manchas castanho-claro, comprimento médio de 1,6 cm (Figura 1i); Estádio 4 (E4) - coloração verde e coberto por manchas castanhas, comprimento médio de 1,88 cm (Figura 1m); Estádio 5 (E5) - coloração castanha com manchas verdes, comprimento médio de 1,52 cm (Figura 1q); Estádio 6 (E6) - coloração castanha, comprimento médio de 1,27 cm (Figura 1u).

Os estádios identificados na ontogênese são diferentes dos apresentados na maturação, por conta da identificação das divisões celulares que irão formar os tecidos da testa. Portanto, os estádios de 1 a 3 da ontogênese ocorrem antes do estágio 1 da maturação. O único estágio correspondente é o estágio 4 da ontogênese com o estágio 6 da maturação, mostrando a semente madura e pronta para a dispersão. Ou seja, a ordem de desenvolvimento da semente é composto pelos seguintes estádios em ordem cronológica: Ontogênese Estádio 1, Ontogênese Estádio 2, Ontogênese Estádio 3, Maturação Estádio 1, Maturação Estádio 2, Maturação Estádio 3, Maturação Estádio 4, Maturação Estádio 5 e Maturação Estádio 6 que é o mesmo que Ontogênese Estádio 4.

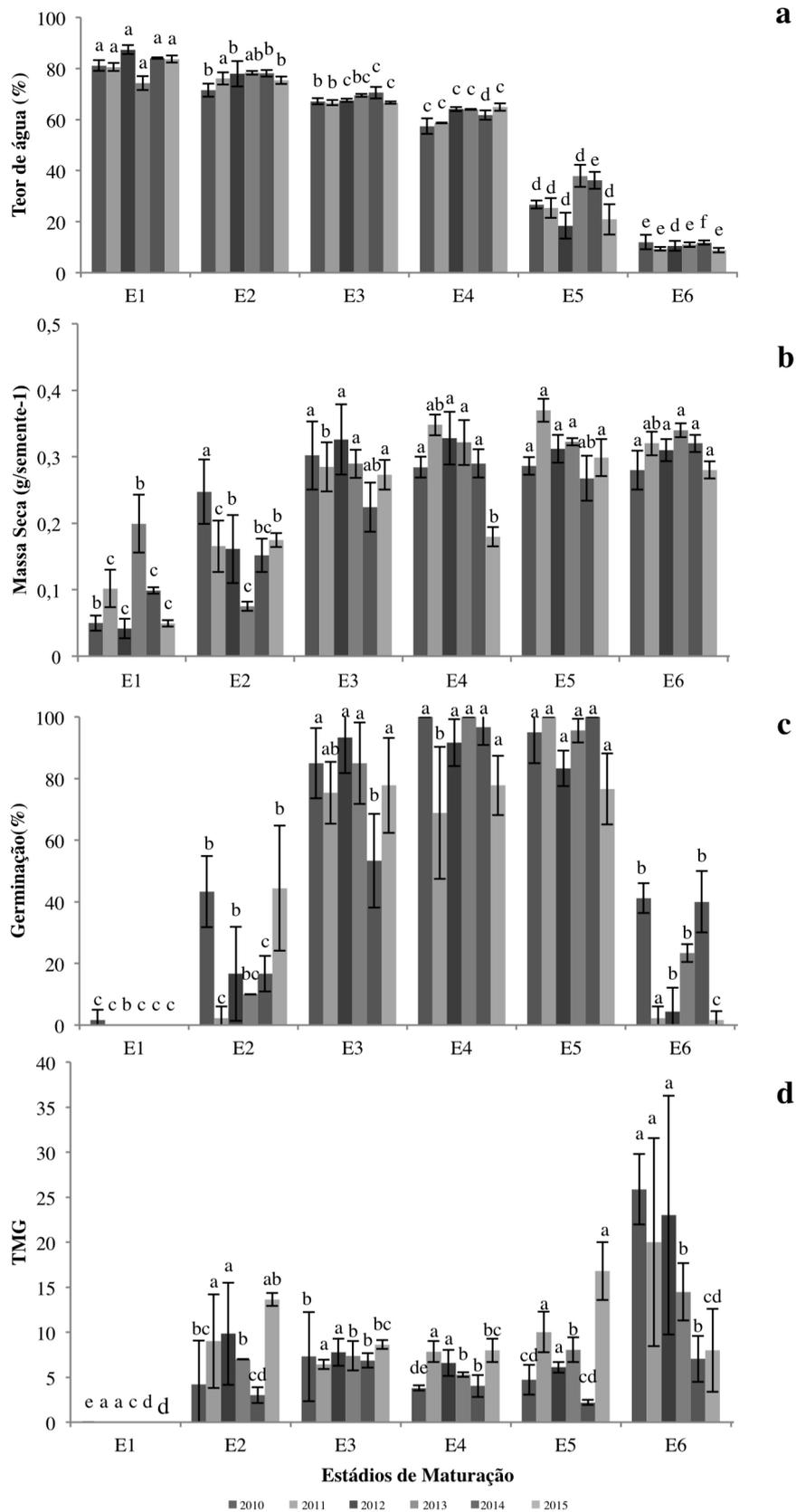


Figura 8. Alterações fisiológicas nos estádios de maturação de *Erythrina speciosa* nos anos de 2010, 2011, 2012, 2013, 2014 e 2015. “E” significa estágio e o número ao seu lado corresponde ao estágio de maturação. Teor de água (% - em base úmida) (a). Massa seca (%) (b). Germinação (%) (c). Tempo médio de germinação (d). As letras comparam os estádios de maturação entre si dentro de cada ano de coleta (2010, 2011, 2012, 2013, 2014 e 2015).

Sementes de *Erythrina speciosa* possuem um período de maturação relativamente curto, aproximadamente 60 dias após a antese. O processo de maturação foi classificado como clássico, onde apresentam elevados teores de água nos primeiros estádios (E1 e E2) com aproximadamente 80% para uma redução acentuada nos estádios finais (E5 e E6) passando para aproximadamente 10% (figura 8). Esse comportamento clássico também pode ser observado através do conteúdo de massa seca, que inicialmente foi de aproximadamente 0,05 g por semente no estágio 1 e passou para aproximadamente 0,310 g no estágio final (figura 8b). Além disso, não houve germinação no estágio inicial, enquanto nos estádios 5 e 6 as sementes germinaram em 100%, mas somente após escarificação mecânica, uma vez que no final do processo de maturação (estádio 6) houve dormência física com base na impermeabilidade à água do tegumento (figura 8c).

A diferença temporal quanto ao tempo médio de germinação (figura 8d) pode estar também relacionada a um possível mecanismo de aceleração para adquirir a impermeabilidade da camada de semente. De acordo com os dados obtidos, o tempo médio de germinação das coletas de estágio 6 de 2010, 2011 e 2012 levou em média 23 dias, enquanto as outras coletas demoraram cerca de sete dias para a protrusão da raiz primária. Além disso, o tempo médio de germinação do estágio 5 (coleta 2015) foi de 16 dias, enquanto no mesmo estágio da coleta de 2012 foi de 7 dias. Tal fato pode levantar questões sobre se as condições climáticas podem influenciar o grau de impermeabilidade, causando dormência física em sementes imaturas. Essa impermeabilidade prematura do tegumento foi obtida após sementes imaturas de *Trifolium ambiguum* M.Bieb. serem artificialmente secas. Curiosamente, isso mostra que mesmo as sementes imaturas são capazes de responder a sinais externos, mesmo que artificiais, resultando em dormência física prematura (Hay *et al.*, 2010).

O estudo de maturação nos 6 anos de coleta mostram que a faixa de temperatura obtida durante cada ciclo de maturação foi semelhante. A Figura 9 (a, b, c, d, e, f) mostra que o intervalo de precipitação causou diferentes balanços hídricos no solo (figura 9 g, h, i, j, k, l).

Observaram-se similaridades nas condições climáticas entre as coletas de 2011 e 2014, nos quais o déficit hídrico ocorreu ao longo de todo o período de maturação. Por outro lado, em 2013 e 2015 houve excesso de água causado por altas taxas de precipitação durante a maior parte do período de maturação.

Independente do balanço hídrico encontrado no solo, a germinação obtida nessas coletas não seguiu um padrão. Como por exemplo, nas coletas de 2011 e 2014 onde ocorreu déficit hídrico durante a maturação, ocorreu também diferença significativa entre as porcentagens de germinação, 2,2% e 40% respectivamente. Estudos realizados com *Digitaria milaniana* (Rendle) Stapf, mostram que a deficiência hídrica tornou as sementes mais dormentes (Hacker, 1984), diferente do fato observado em sementes de *E. speciosa*.

4 Conclusões

- A maturação de eritrina é composta por 6 estádios distintos, comprovados por análises físicas, fisiológicas, morfológicas e anatômicas e leva em média 60 dias para a obtenção da semente madura após a antese.
- No estágio 6 de pré-dispersão, essas sementes apresentam impermeabilidade à água;
- Coletas de diferentes anos apresentam diferentes graus de dormência.

5 Referências bibliográficas

- Barbedo, C. J., Centeno, D. C., Figueiredo-Ribeiro, R. D. C. L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40, 583–595.
- Baskin, C. C.** 2003. Breaking physical dormancy in seeds – focussing on the lens. *New Phytol.* 158, 227–238.
- Borges, I. F., Neto, J. D. G., Bilia, D. A. C., Figueiredo-Ribeiro, R. de C. L., Barbedo, C. J.** 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 48, 851–861.
- Borghetti, F., Ferreira, A.G.** 2004. Interpretação de resultados de germinação, in: Ferreira, A.G., Borghetti, F. (Eds.), *Germinação Do Básico Ao Aplicado*. Artmed, Porto Alegre, p. 323.
- Brasil. 2009.** Regras para análise de sementes. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento, Brasília.
- Büyükkartal, H. N., Çölgeçen, H., Pinar, N. M., Erdoğan, N.** 2013. Seed coat ultrastructure of hard-seeded and soft-seeded varieties of *Vicia sativa*. *Turk. J. Botany* 37, 270–275.
- Cárdenas-Hernández, J., Miranda L., D., Magnitskiy, S., Carranza, C.** 2011. Morphological and anatomical analyses of the seed coats of sweet granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) seeds. *Agron. Colomb.* 29, 377–385.
- Carvalho, N. M. de, Nakagawa, J.** 2012. *Semente: Ciência, Tecnologia e produção*, 5ª edição. Ed. Funep, Jaboticabal.
- Cavazza, L.** 1950. Recherches sur l'imperméabilité des graines dures chez les légumineuses Giardinelli. *Bull. la Société Bot. Suisse* 60, 596–610.
- Ceballos, L., Hossaert-McKey, M., McKey, D., Andary, C.** 1998. Rapid deployment of allelochemicals in exudates of germinating seeds of *Sesbania* (Fabaceae): roles of seed anatomy and histolocalization of polyphenolic compounds in anti-pathogen defense of seedlings. *Chemoecology* 8, 141–151.
- Chai, M., Zhou, C., Molina, I., Fu, C., Nakashima, J., Li, G., Zhang, W., Park, J., Tang, Y., Jiang, Q., Wang, Z.-Y.** 2016. A class II KNOX gene, KNOX4, controls seed physical dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 6997–7002.
- Corner, E. J. H.** 1951. The leguminous seed. *Phytomorphology* 1, 117–150.
- Faria, T. D. J., Cafêu, M. C., Akiyoshi, G., Ferreira, D. T., Galão, O. F., Andrei, C. C., Filho, P. P., Paiva, M. R. C., Barbosa, A. de M., Braz-filho, R.** 2007. Alcalóides de flores e folhas de *Erythrina speciosa* Andrews. *Quim. Nova* 30, 525–527.

- Ferreira, N. R., Franke, L. B., Moço, M. C. de C.** 2011. Estudos morfo-anatômicos relacionados à dormência em sementes de *Adesmia tristis* Vogel (Fabaceae). Rev. Brasileira Sementes 33, 447–453.
- Gama-Arachchige, N. S., Baskin, J. M., Geneve, R. L., Baskin, C. C.** 2011. Acquisition of physical dormancy and ontogeny of the micropyle--water-gap complex in developing seeds of *Geranium carolinianum* (Geraniaceae). Ann. Bot. 108, 51–64.
- Gomes, F. P.** 1982. Curso de estatística experimental, 10^a edição. Ed. Nobel, Piracicaba.
- Hay, F.R., Smith, R.D., Ellis, R.H., Butler, L.H.,** 2010. Developmental changes in the germinability, desiccation tolerance, hardseededness, and longevity of individual seeds of *Trifolium ambiguum*. Ann. Bot. 105, 1035–52.
- Hacker, J. B.** 1984. Genetic variation in seed dormancy in *Digitaria milaniana* in relation to rainfall at the collection site. J. Appl. Ecol. 21, 947–959.
- Harris, W. M.** 1987. Comparative ultrastructure of developing seed coats of “Hard-Seeded” and “Soft-Seeded” varieties of soybean, *Glycine max* (L.) Merr. Bot. Gazzete 148, 324–331.
- Hyde, E. O. C.** 1954. The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to the ripening of the seed and the permeability of the testa. Ann. Bot. 18, 241–256.
- Johansen, D. A.** 1940. Plant microtechnique. McGraw- Hill Book, New York.
- Kelly, K. M., Staden, J., Bell, W. E.** 1992. Seed coat structure and dormancy. Plant Growth Regul. 11, 201–209.
- Krukoff, B. A., Barneby, R. C.** 1974. A conspectus of the genus *Erythrina*. Lloydia 37, 332–459.
- Lamarca, E. V., Prativiera, J. S., Borges, I. F., Delgado, L. F., Teixeira, C. C., Camargo, M. B. P., Faria, J. M. R., Barbedo, C. J.** 2013. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. An. Acad. Brasileira Cienc. 85, 223–233.
- Leivas, J., Berlato, M., Fontana, D.** 2006. Risco de deficiência hídrica decendial na metade sul do Estado do Rio Grande do Sul. Rev. Brasileira Eng. Agrícola e Ambient. 10, 297–407.
- Lersten, N. R.** 1982. Tracheid Bar and Vestured Pits in Legume Seeds (Leguminosae: Papilionoideae). Am. J. Bot. 69, 98–107.
- Lima, H.** 2014. *Erythrina* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jard. Botânico do Rio Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29677> (accessed 2.18.14).
- Matheus, M. T., Lopes, J. C., Corrêa, N. B.** 2011. Maturação fisiológica de sementes de *Erythrina variegata* L. Ciência Florest. 21, 619–627.
- Mello, J. I. de O., Barbedo, C. J., Salatino, A., Figueiredo-Ribeiro, R. de C. L.** 2010.

- Reserve Carbohydrates and Lipids from the Seeds of Four Tropical Tree Species with Different Sensitivity to Desiccation. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 53, 889–899.
- Miller, S. S., Bowman, L. A., Gijzen, M., Miki, B. L. A.** 1999. Early Development of the Seed Coat of Soybean (*Glycine max*). *Ann. Bot.* 84, 297–304.
- Moïse, J. A., Han, S., Gudynaite-Savitch, L., Johnson, D. A., Miki, B. L. A.** 2005. Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 41, 620–644.
- O'Brien, T. P., Feder, N., McCully, M. E.** 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59, 368–373.
- Palermo, R. B. Z., Agostini, K.** 2010. Componentes de fecundidade em *Erythrina speciosa* (Leguminosae, Faboideae). *Bioikos* 24, 13–19.
- Pammel, L. H.** 1899. Anatomical characters of the seeds of leguminosae, chiefly genera of gray's manual. St. Louis, St. Louis.
- Patel, J. D.** 1976. Comparative Seed Coat Anatomy of Some Indian. *Phyt.* 17, 287–299.
- Perez, S. C. J. G. D. A.** 2004. Envoltórios, in: Gui Ferreira, A., Borghetti, F. (Eds.), *Germinação Do Básico Ao Aplicado*. Artmed, Porto Alegre, p. 323.
- Rolim, G. D. E. S., Camargo, M. B. P. De, Lania, D. G., Moraes, J. F. L.** 2007. Classificação climática de Löppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas. *Bragantia* 66, 711–720.
- Rolston, M. P.** 1978. Water impermeable seed dormancy. *Bot. Rev.* 44, 365–396.
- Silva, J. P. N., Centeno, D. da C., Figueiredo-ribeiro, R. D. C. L., Barbedo, C. J.** 2015. Maturation of seeds of *Poincianella pluviosa* (Caesalpinoideae). *J. Seed Sci.* 37, 131–138.
- Smýkal, P., Vernoud, V., Blair, M. W., Soukup, A., Thompson, R. D.** 2014. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Front. Plant Sci.* 5, 351.
- Souza, F. H. D. De, Marcos-Filho, J.** 2001. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Rev. Brasileira Botânica* 24, 365–375.
- Standifer, L. C., Wilson, P. W., Drummond, A.** 1989. The effects of seed moisture content on hard-seededness and germination in four cultivars of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.). *Plant Var. Seeds* 2, 149–154.
- Thornthwaite, C. W., Mather, J. R.** 1955. The water balance. Drexel Institute of Technology. (Publications in climatology), New Jersey.
- Werker, E.** 1981. Seed dormancy as explained by the anatomy of embryo envelopes. *Isr. Jour. Bot.* 29, 22–44.

Capítulos 2 - Grau de dormência em sementes de *Erythrina speciosa*

Andrés formadas sob diferentes condições ambientais

Resumo – As condições ambientais em que a planta-mãe está submetida interferem no processo de maturação das sementes, ocasionam variações na qualidade fisiológica das sementes e também na instalação da dormência física. Sementes de *Erythrina speciosa* são totalmente tolerantes à dessecação e podem ser armazenadas por diversos anos. Além disso, quando maduras apresentam o tegumento impermeável à absorção de água. O objetivo deste trabalho foi analisar física, fisiológica e anatomicamente as modificações no grau de dormência dessas sementes, bem como na sua sensibilidade à quebra dessa dormência, conforme as condições ambientais nas quais as sementes foram formadas. Sementes foram coletadas em 6 anos consecutivos nas mesmas matrizes e analisadas quanto o grau de dormência apresentado. Foi realizado também uma análise de correlação de fatores ambientais, anatômicos e fisiológicos para identificar possíveis causas para a alteração no grau de dormência. Com base nos resultados, foi possível observar que as condições climáticas em que a planta-mãe está submetida influencia no grau de dormência apresentado pelas sementes.

Palavras-chave: dormência, impermeabilidade do tegumento, sementes florestais, mata atlântica.-

1 Introdução

A dormência é um processo fisiológico que permite a sobrevivência das sementes em ambientes adversos, ao prevenir a germinação imediata e/ou sincronizada, o que resulta na dispersão temporal das sementes. Entre diversos tipos de dormência caracterizados, a dormência física imposta pela impermeabilidade do tegumento à água é encontrada na família das leguminosas. Ao final do processo de maturação é comum as sementes apresentarem a impermeabilidade do tegumento à água e a dessecação, essa fase é considerada como a sinalização para a instalação de dormência (Rolston, 1978; Slattery *et al.*, 1982; Baskin e Baskin, 2000; Jayasuriya *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2007).

As condições ambientais em que a planta-mãe está submetida interferem no processo de maturação das sementes, ocasionando variações na qualidade fisiológica das sementes e também na instalação da dormência física. Esses resultados indicam que variações da impermeabilidade do tegumento ocorrem naturalmente durante a maturação. Dessa maneira, sementes da mesma espécie podem apresentar diferenças consideráveis quanto a dormência física, se produzidas em diferentes locais ou anos (Hyde, 1954; Standifer *et al.*, 1989; Hay *et al.*, 2010; Gama-Arachchige *et al.*, 2011; Lamarca *et al.*, 2013)

A impermeabilidade do tegumento em relação à água ou gases é conhecida como dormência exógena física e é um fenômeno comum entre espécies da família Fabaceae. Este tipo de dormência pode ser causado por variáveis isoladas ou combinadas, tais como: presença de camada cerosa, presença de quantidades significativas de suberina, cutina e deposição de lignina na base das células, presença de ácidos graxos nos espaços intercelulares, oxidação de compostos fenólicos presentes nas células pigmentadas do tegumento, bloqueio da fenda hilar em sementes secas e ausência ou baixa densidade de poros nas camadas superficiais do tegumento (Perez, 2004; Marcos Filho, 2015).

Para que essas sementes possam dar início ao processo de germinação é necessário que ocorra um rompimento nessa camada impermeável. Portanto, em alguns casos sugere-se a

utilização de substância química corrosiva, como o ácido sulfúrico. Acreditava-se que o ácido sulfúrico poderia danificar os embriões das sementes, penetrando através de rachaduras no tegumento durante o tratamento (Jordan et al, 1983). Porém, estudos bioquímicos com *Erythrina speciosa* demonstraram que não há penetração do ácido em regiões internas das sementes (Koszo et al., 2007).

Erythrina speciosa Andrews (Leguminosae, Faboideae) é uma espécie que apresenta distribuição nas regiões de Cerrado e da Mata Atlântica. É conhecida popularmente como eritrina-candelabro, maçaranduba, mulungu, saranduba ou suinã. Apresenta aspecto arbóreo, entre 3 a 5 metros de altura, e é muito utilizada como planta ornamental. Sementes de *E. speciosa* são tolerantes à dessecação e podem ser armazenadas por diversos anos. Além disso, quando maduras apresentam o tegumento impermeável à absorção de água (Krukoff e Barneby, 1974; Faria et al., 2007; Koszo et al., 2007; Mello et al., 2010; Lima, 2014).

O objetivo deste trabalho foi analisar física, fisiológica, anatômica as modificações no grau de dormência conforme as condições ambientais nas quais as sementes de *E. speciosa* são formadas e, também, as variações na sensibilidade à quebra dessa dormência pela escarificação.

2 Material e métodos

Material vegetal: frutos de *Erythrina speciosa* foram coletados de 30 matrizes do Parque Cultural Catavento, em área urbana do município de São Paulo, SP (23°32'44"S e 46°37'40"O) em outubro de 2010, 2011, 2012, 2013, 2014 e 2015. A extração das sementes do estádio 6 foi realizada por meio de quebra dos frutos e retirada manual das sementes.

Análises físicas: ao fim do beneficiamento, o teor de água e o conteúdo de massa seca das sementes foram avaliados pelo método gravimétrico, em estufa a 103°C por 17 horas. Os resultados foram apresentados em porcentagem (base úmida) e em mg/semente (Brasil, 2009).

Análises fisiológicas: foram realizados testes de germinação em sementes intactas (testemunha) e sementes escarificadas manualmente. Apenas a coleta de 2012 não contou com a escarificação mecânica no lado oposto ao eixo embrionário. Os testes de germinação foram instalados em rolos de papel previamente umedecidos com água em 2,5 vezes o peso do papel (Brasil, 2009), e acondicionados em sala de germinação regulada para 25°C com umidade relativa de 70%. As avaliações foram realizadas a cada 2 dias durante 30 dias, sendo registradas as sementes que emitiram raiz primária, com tamanho igual ou superior a 0,5 cm (para o cálculo da porcentagem de germinação). Foi calculado também, o tempo médio de germinação de cada tratamento de escarificação e testemunha, utilizando a fórmula apresentada por Borghetti e Ferreira (2004).

Análises anatômicas: sementes intactas de todas as coletas tiveram o tegumento na região oposta ao hilo analisadas. As amostras foram fixadas em FAA70 (Johansen, 1940) e armazenados em etanol 70%, infiltradas em resina plástica, seccionadas transversalmente com navalha descartável em micrótomo rotativo manual, na espessura de 7µm e coradas com azul de toluidina 0,05% (O'Brien *et al*, 1964). A análise das lâminas foi realizada em fotomicroscópio Olympus BX51 e imagens com escala foram obtidas por câmera acoplada Olympus DP71, no programa DPManager.

A partir dessas imagens, foram analisadas diferenças apresentadas pelo tegumento das sementes intactas das 5 coletas com ajuda do programa ImageJ, onde foram medidas as seguintes estruturas: altura das células em paliçadas, células em formato de ampulheta e parênquima, espessura da parede celular das células em paliçadas e cutícula.

Análises climáticas: Os dados climáticos (temperaturas máxima e mínima e precipitação), dos 6 anos estudados foram obtidos de estações meteorológicas instaladas no Parque de Ciência e Tecnologia da USP (23°39'4"S 46°37'20"O). A escala decendial foi elaborada calculando a média a cada dez dias dos anos estudados para a temperatura máxima e temperatura mínima, e soma a cada dez dias para a precipitação. O balanço hídrico

sequencial também foi calculado com dados de precipitação pluvial utilizando o modelo proposto por Thornthwaite e Mather (1955), em ordem decrescente de nível de escala com capacidade de água disponível (AWC) de 125 mm (Leivas *et al.*, 2006; Rolim *et al.*, 2007).

Análises estatística: O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Cada tratamento contou com 4 repetições de 20 sementes para as análises fisiológicas e 4 repetições de 5 sementes para as análises físicas e medidas da estrutura celular. Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Gomes, 1982), utilizando o programa estatístico R.

Análises de correlação: A correlação dos dados climáticos dos 6 anos de coleta (2010, 2011, 2012, 2013, 2014 e 2015) com dados físicos, fisiológicos e anatômicos do estádio 6 sem superação de dormência, foram realizados, submetidos à análise de variância (teste F) ao nível de 5%. Foi realizado um teste de correlação com 61 variáveis, sendo apresentado apenas resultados que foram significativos.

3 Resultados e discussão

Análises físicas e fisiológicas - o teor de água apresentado pelas sementes de *Erythrina speciosa* nas 6 coletas avaliados, oscilou em torno de 3% (aproximadamente 9% a 12%, figura 1a), semelhante ao observado para sementes de *Erythrina velutina* (entre 8% e 5%), por Guedes *et al.* (2009), porém tal variação não foi estatisticamente diferente, assim como não foi para o conteúdo de massa seca das coletas de 2011, 2012, 2014 e 2015 (figura 1b), somente as coletas de 2010 e 2013 diferiram estatisticamente.

Já a germinação das sementes não escarificadas (figura 1c) foi mais elevada nas coletas de 2010 e 2014 e mais baixas nas coletas de 2011, 2012 e 2015. Após a escarificação mecânica ser realizada as sementes passaram a germinar próximo de 100%, demonstrando assim que as sementes sem escarificação que não germinaram estavam vivas e dormentes e

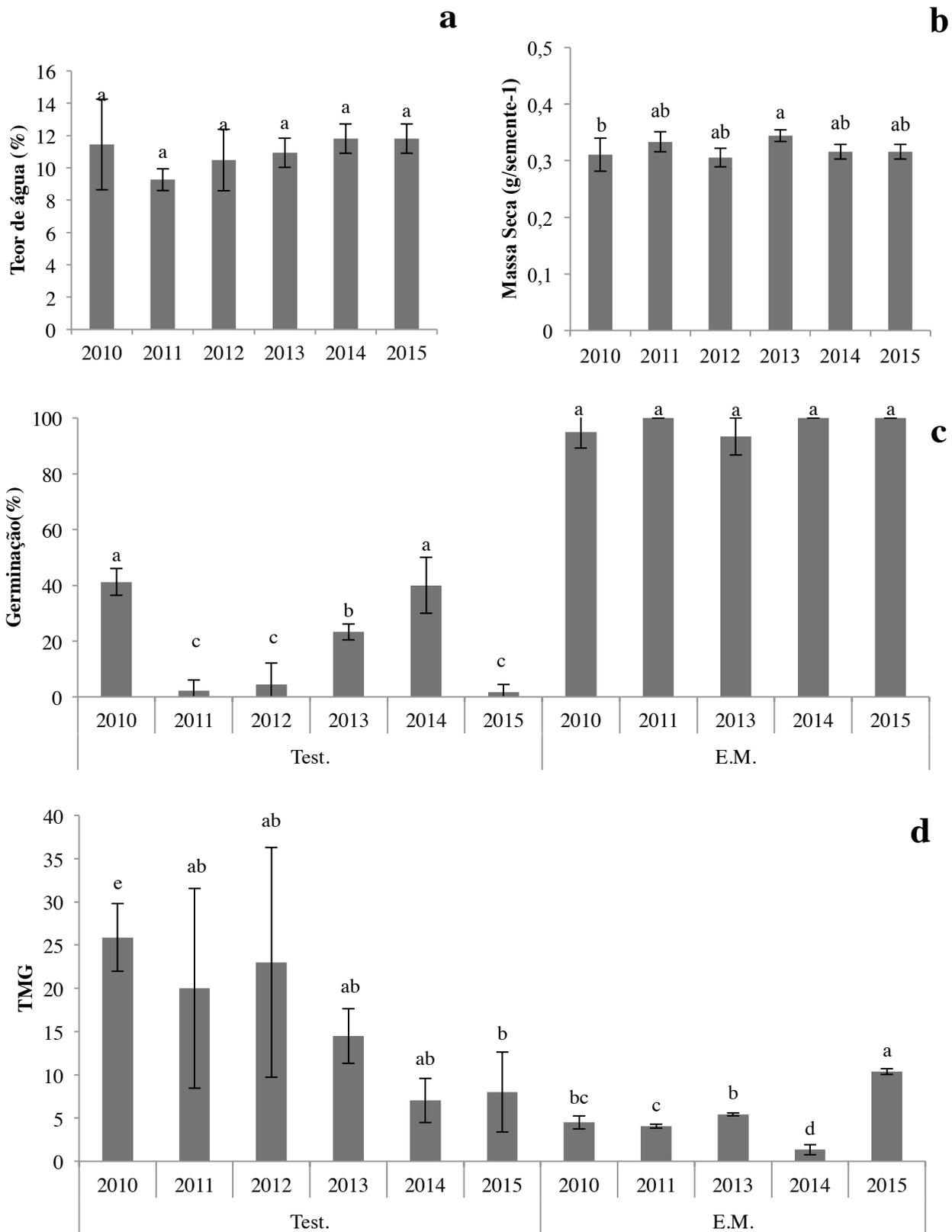


Figura 1. Respostas físicas e fisiológicas das sementes maduras de *Erythrina speciosa* em 5 anos. (a) Teor de água. (b) Massa seca. (c) Germinação das sementes sem nenhum tratamento para superação da dormência (Test.) e com escarificação mecânica (E.M.). (d) Tempo médio de germinação (TMG) das sementes sem nenhum tratamento e com escarificação mecânica. As letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Para germinação e TMG, foram comparados os lotes sem tratamento entre eles e os lotes escarificados entre eles.

também que a escarificação mecânica é uma metodologia indicada para quebrar a barreira de impermeabilidade à água e dar início ao processo de germinação.

A diferença nas porcentagens de germinação das sementes sem tratamento demonstram que cada coleta apresentava um grau de dormência diferente. Carvalho e Nakagawa (2012) esclarecem que é possível existir diferenças entre a dormência das coletas, entre as plantas, na mesma planta e até mesmo dentro do mesmo fruto, uma vez que as condições ambientais, nutricionais da planta e translocação de solutos não ocorrem exatamente na mesma proporção .

O tempo médio de germinação (TMG) das sementes não escarificadas e da testemunha (figura 1d) apresentou diferenças estatísticas, mas não foi observado uma relação entre elevadas porcentagens de germinação e baixos valores de TMG. As coletas de 2010 e 2014, por exemplo, que tinham germinação semelhante, foram diferentes quanto ao TMG, com a coleta de 2010 demorando mais para germinar. Os valores de TMG das sementes escarificadas mecanicamente foi mais baixo que as não escarificadas, ou seja as sementes germinaram mais rápido por não apresentarem mais a barreira impermeável que retarda a entrada da água e conseqüentemente retarda a germinação. Exceto pela coleta de 2015 que as sementes escarificadas levaram em média mais dias para germinar do que a testemunha.

Num estudo com sementes de *E. speciosa* realizado em duas coletas diferentes com escarificação ácida e com vários tempos de imersão foi possível observar acréscimo na porcentagem de germinação de acordo com o aumento no período de imersão das sementes em ácido sulfúrico. Mas cada coleta apresentou uma resposta diferente para superar totalmente a dormência. Valores próximos a 100% foram obtidos no tratamento de imersão por 15 minutos na coleta de 2010; já na coleta de 2011, esse mesmo valor foi obtido no tratamento de 40 minutos. Esses resultados mostram que as sementes apresentam diferenças no grau de dormência e também na extensão e forma em que o ácido sulfúrico promoveu a corrosão (Molizane, 2012).

Já foi visto na literatura que a dormência física pode apresentar diferentes graus em diferentes anos de coleta, diferentes plantas na mesma coleta, na mesma planta, na mesma

inflorescência e também no mesmo fruto (Carvalho e Nakagawa, 2012). Mas ao observar os resultados obtidos por Molizane (2012) com escarificação ácida em *E. speciosa*, é possível supor que a deposição de compostos que promovem a dormência física não são depositados igualmente em toda a testa das sementes. Então a mesma semente pode apresentar áreas de maior ou menor impermeabilidade. Essas áreas de menor impermeabilidade sob ação do ácido sulfúrico apresentam áreas mais extensas e profunda de corrosão na camada paliçada, como observado na coleta de 2010, e áreas de corrosão menos profundas e menos extensas, como observado na coleta de *E. speciosa* analisado em 2011. Ainda, seguindo essa teoria, as áreas mais impermeáveis apresentaram menos corrosão, ou seja, continuaram impedindo a entrada da água, necessitando assim de maior tempo de imersão para permitir a entrada da água.

Esses resultados demonstram que as sementes com um grau de dormência física mais elevado podem apresentar áreas maiores com deposições de compostos químicos que, durante a secagem, se tornam hidrofóbicos. Já as sementes com um menor grau de dormência apresentam menos áreas com essa deposição. Esse gradiente de dormência por impermeabilidade à água apresentado pelas sementes pode estar relacionado com as condições climáticas entre período da floração e maturidade das sementes. A influência das condições climáticas pode modificar a translocação dos compostos fotossintetizados, e ainda promover alterações químicas nesses compostos provenientes de uma disponibilidade nutricional do solo (Pimentel, 2004).

Na análise de correlação, a umidade relativa no mês de setembro (no período de formação da semente correspondente aos estádios 2 e 3) apresentou uma correlação negativa com a massa seca apresentada pelas sementes de *E. speciosa* do estágio 6 (maduro), conforme descrito no capítulo 1 dessa tese. Então quanto maior a umidade relativa menor é a massa seca apresentada pelas sementes. Já a umidade relativa do mês de setembro teve uma correlação negativa com a massa seca apresentada pelas sementes. No mês de setembro, a formação da sementes se intensifica e a troca de água por matéria seca ocorre nesse período. Portanto

quanto maior a umidade relativa, menor é a massa seca, devido a pouca eficiência na translocação de solutos.

Na análise de correlação (tabela 1) não foi observado significância do estresse hídrico, por falta de água no solo, com grau de dormência física apresentado por *E. speciosa*, apesar de ter sido um fator citado por Baskin & Baskin (2014) como um dos gatilhos para alteração na dormência física nas 13 espécies estudadas por esses autores. Também diferente do que foi observado em sementes de *E. speciosa*, sementes de *Digitaria milanjiana* (Rendle) Stapf, mostram que a deficiência hídrica tornou as sementes mais dormentes (Hacker, 1984). Portanto independente do balanço hídrico encontrado no solo (figura 3), a germinação obtida nessas coletas não seguiu um padrão, como pode ser observado na coletas de 2011 e 2014.

Tabela 1. Correlação dos dados fisiológicos e climáticos ocorridos durante os 6 anos de maturação avaliados em sementes de *Erythrina speciosa*.

	Germ		UR.mai		UR.set
TA	0,927 *		-0,929 *		-0,368
MS	-0,030		-0,332		-0,865 *
Germ			-0,828 *		-0,016

Germ = germinação. UR.mai = Umidade relativa no mês de maio. UR.set = umidade relativa no mês de setembro. TA = teor de água. MS = Massa seca. TMG = Tempo médio de germinação. (*) = resultados significantes ao nível de 5%. A tabela mostra apenas os resultados significativos. A análise de correlação foi analisado com 61 variáveis, mas somente os resultados significativos foram apresentados nesta tabela.

O teor de água apresentado pelas sementes no final do processo de maturação também é um dos fatores que podem influenciar a dormência física por impermeabilidade à água. Sementes de *Geranium carolinianum* apresentaram como gatilho, a redução no teor de água para instalação da dormência por impermeabilidade. Sementes imaturas que foram secas até atingirem 11% de água estavam totalmente dormentes, enquanto sementes com 13% não tiveram a dormência instalada (Gama-Arachchige *et al.*, 2011). Na análise de correlação (tabela 1) analisados neste estudo obteve-se uma resposta positiva para o teor de água e a germinação, portanto quanto menor o teor de água menor é a porcentagem de germinação.

Também foi possível observar que a umidade relativa elevada no mês de maio (período de formação dos botões florais) demonstrou uma correlação negativa com a germinação então quanto maior a umidade relativa no mês de maio, menor é a germinação e também o teor de água.

Análises anatômicas: As sementes de *E. speciosa* apresentam um tegumento marrom escuro. A testa é formada por uma camada paliçada alta, com a linha lúcida evidente, que está localizada próximo a cutícula (Figura 2), da mesma forma que foi observada em sementes de *Erythrina lysistemon* Hutch. (Cavazza, 1950; Corner, 1951; Manning e Staden, 1985; Kelly *et al.*, 1992; McDonald, 1999; Souza e Marcos-Filho, 2001).

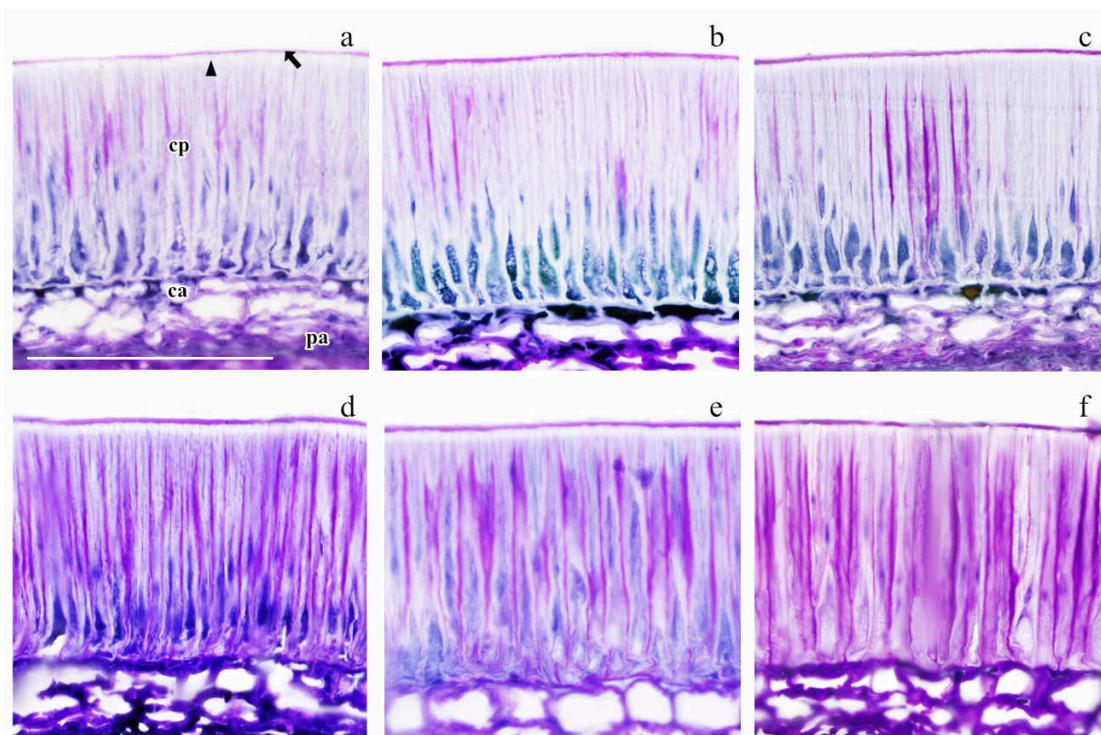


Figura 2. Anatomia da testa de sementes maduras (estágio 6) de *E. speciosa*, analisada em seis anos consecutivos. (a) 2010; (b) 2011; (c) 2012; (d) 2013; (e) 2014; (f) 2015. Escala 100 μ m ca – células em ampulheta; ccp – células contra-paliçadas; cp – células em paliçadas; pa – parênquima; tb – barra de traqueídes, ponta da seta – cutícula; ponta do triângulo – linha lúcida.

Apesar de observar que a cutícula presente na coleta de 2010 (Figura 2a) é mais fina, podendo facilitar a entrada da água, essa mesma redução na espessura da cutícula não foi observada na coleta de 2014 (Figura 2e), uma vez que as porcentagens de germinação nas sementes não escarificadas são semelhantes. Portanto não é possível atribuir à cutícula toda a

responsabilidade sobre a impermeabilidade à água. Também não é possível atribuir à altura das células em paliçadas a responsabilidade pela impermeabilidade à água em sementes de *E. speciosa*, uma vez que a análise de correlação não apresentou uma resposta significativa com a germinação. Esses resultados contradizem os resultados obtidos por Chai *et al.* (2016) e

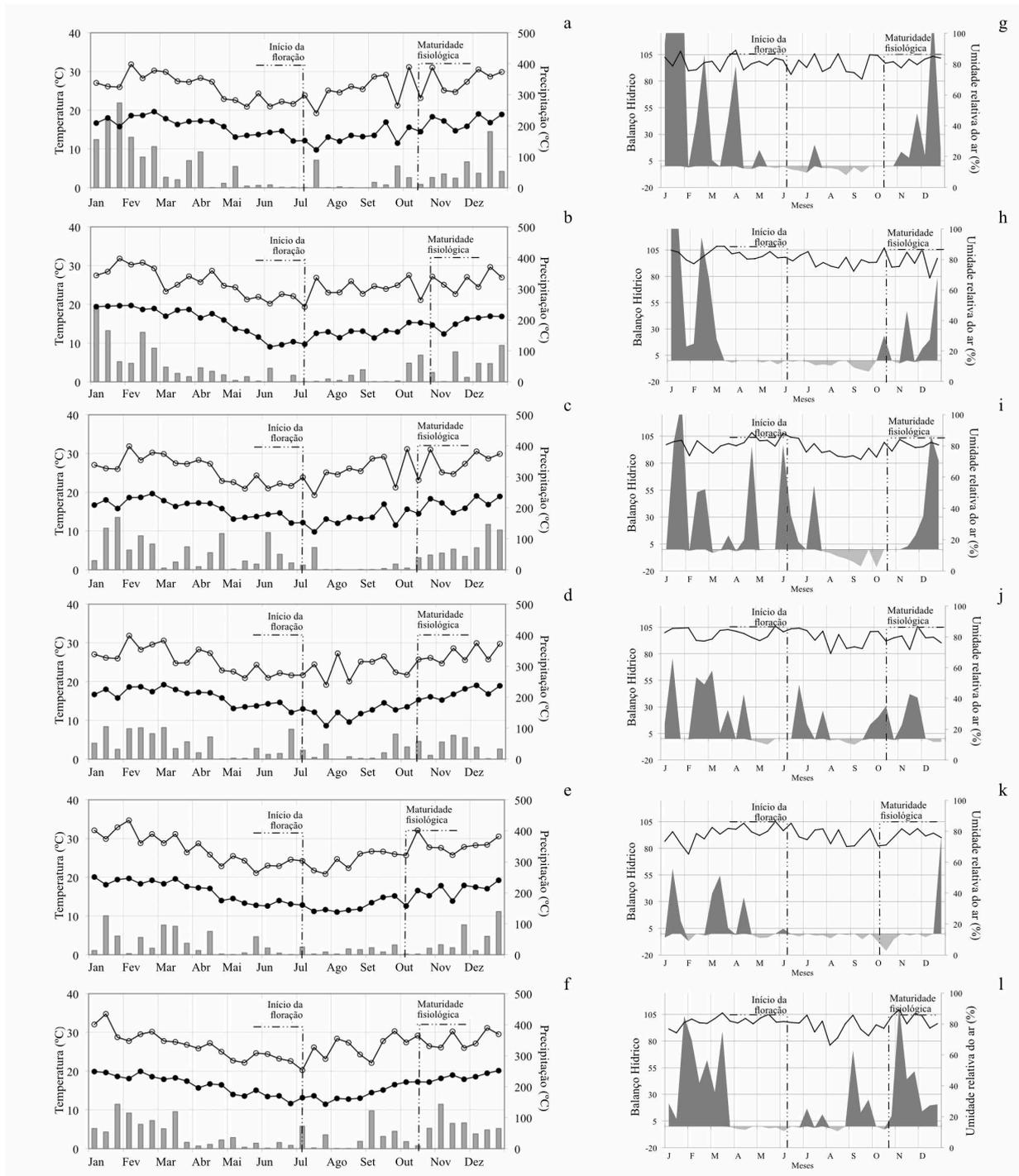


Figura 3. Condições climáticas e déficit hídrico durante os 6 anos de avaliação da maturação em sementes de *Erythrina speciosa*. Precipitação pluvial, temperaturas mínimas e máximas decendiais (a-f). Déficit hídrico e umidade relativa decendial (g-l). 2010 (a, g). 2011 (b,h). 2012 (c,i). 2013 (d,j). 2014 (e,k). 2015 (f, i).

Harris (1987) em sementes de *Glycine max* e *Vicia sativa*. Os autores indicam o tamanho da célula em paliçada e a espessura da cutícula como responsáveis pela dormência por impermeabilidade à água. As sementes dormentes apresentavam a linha lúcida densa, cutícula mais espessa e células em paliçadas maiores do que nas sementes não dormentes.

Seguindo o modelo proposto por Barbedo *et al.* (2013), as sementes apresentam diferentes graus de tolerância a dessecação e graus de capacidade de armazenamento, que estão intimamente relacionados com o avanço no processo de maturação. As sementes que permanecem mais tempo conectadas a planta-mãe avançam mais no processo de maturação e desenvolvem maior tolerância a dessecação. Ainda segundo esses autores, as sementes que apresentam dormência tem longevidade aumentada, pois a impermeabilidade à água protege contra a ação de condições adversas do ambiente em que a semente pode estar submetida. Tal fato foi observado em sementes intactas de *E. speciosa* que passaram por envelhecimento acelerado e não perderam a capacidade germinativa, como seria esperado em sementes sem dormência física (Brancaion *et al.*, 2010).

Em *E. speciosa* não é possível apontar com certeza qual é o gatilho para a alteração no grau de dormência, uma vez que as condições climáticas foram diversas durante os 6 anos de estudo. As sementes que apresentam dormência por impermeabilidade tem uma programação genética para desenvolver camadas específicas na testa da semente que poderão induzir a instalação da dormência, mas só isso não é necessário para que se tornem realmente impermeáveis. Barbedo *et al.* (2013) ainda sugerem que dormência não está integralmente ligada ao processo de maturação. Da mesma forma em que ocorrem graus de tolerância à dessecação, podem ocorrer também graus de dormência por impermeabilidade à água. E no caso de *E. speciosa* vários fatores em sequência podem influenciar no grau de dormência, como por exemplo, maior deposição de compostos específicos nas células em paliçadas e cutícula, através de condições climáticas adequadas, tempo de permanência da semente ligada a planta-mãe e secagem natural. As sementes que permanecem mais tempo ligadas a planta-

mãe podem receber mais fotossintetizados e isso pode aumentar a deposição de compostos tanto nos cotilédones, como na testa, fazendo com que haja aumento na matéria seca da semente e redução no teor de água.

4 Conclusões

- Coletas diferentes da mesma espécie, com mesma base genética e formadas em diferentes condições ambientais podem apresentar graus de dormência diferentes, não sendo identificado qual ou quais os fatores que influenciam nessa alteração
- Não foram encontradas diferenças anatômicas que estejam relacionadas com os diferentes graus de dormência apresentada pelas sementes de *E. speciosa*.
- A escarificação mecânica para *E. speciosa* é uma metodologia eficiente para a superação da dormência, pois permite que a água tenha facilidade de penetração até o embrião e possa dar início ao processo de germinação

5 Referências bibliográficas

- Barbedo, C. J., Centeno, D. C., Figueiredo-Ribeiro, R. D. C. L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40, 583–595.
- Baskin, C. C., Baskin, J. M.** 2014. *Seeds - Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Elsevier, San Diego.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C.** 2000. Evolutionary considerations of claims for physical dormancy- break by microbial action and abrasion by soil particles. *Seed Sci. Res.* 10, 409–413.
- Borghetti, F., Ferreira, A. G.** 2004. Interpretação de resultados de germinação, in: Ferreira, A.G., Borghetti, F. (Eds.), *Germinação Do Básico Ao Aplicado*. Artmed, Porto Alegre, p. 323.
- Brancalion, P. H. S., Novembre, A. D. L. C., Rodrigues, R. R., Marcos Filho, J.** 2010. Dormancy as exaptation to protect mimetic seeds against deterioration before dispersal. *Ann. Bot.* 105, 991–8.
- Brasil**, 2009. Regras para análise de sementes. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento, Brasília.
- Carvalho, N. M. de, Nakagawa, J.** 2012. *Semente: Ciência, Tecnologia e produção*, 5ª edição. ed. Funep, Jaboticabal.
- Cavazza, L.** 1950. Recherches sur l'imperméabilité des graines dures chez les légumineuses Giardinelli. *Bull. la Société Bot. Suisse* 60, 596–610.
- Chai, M., Zhou, C., Molina, I., Fu, C., Nakashima, J., Li, G., Zhang, W., Park, J., Tang, Y., Jiang, Q., Wang, Z.-Y.** 2016. A class II KNOX gene, KNOX4, controls seed physical dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 6997–7002.
- Corner, E. J. H.** 1951. The leguminous seed. *Phytomorphology* 1, 117–150.
- Faria, T. D. J., Cafêu, M.C., Akiyoshi, G., Ferreira, D.T., Galão, O.F., Andrei, C.C., Filho, P.P., Paiva, M.R.C., Brabosa, A. de M., Braz-filho, R.,** 2007. Alcalóides de flores e folhas de *Erythrina speciosa* Andrews. *Quim. Nova* 30, 525–527.
- Gama-Arachchige, N. S., Baskin, J. M., Geneve, R. L., Baskin, C. C.** 2011. Acquisition of physical dormancy and ontogeny of the micropyle-water-gap complex in developing seeds of *Geranium carolinianum* (Geraniaceae). *Ann. Bot.* 108, 51–64.
- Jayasuriya, K. M. G. G., Baskin, J. M., Geneve, R. L., Baskin, C. C.** 2007. Seed development in *Ipomoea lacunosa* (Convolvulaceae), with particular reference to anatomy of the water gap. *Ann. Bot.* 100, 459–70.
- Johansen, D.A.** 1940. *Plant microtechnique*. McGraw- Hill Book, New York.
- Gomes, F. P.** 1982. *Curso de estatística experimental*, 10ª ed. Nobel, Piracicaba, Piracicaba.

- Guedes, R.S. , Alves, E. U., Gonçalves, E. P., Santos, S. D. R. N., Lima, C. R.** 2009. Testes De Vigor Na Avaliação Da Qualidade Fisiológica De Sementes *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae - Papilionoideae). *Ciência e Agrotecnologia* 33, 1360–1365.
- Hacker, J. B.** 1984. Genetic variation in seed dormancy in *Digitaria milaniana* in relation to rainfall at the collection site. *J. Appl. Ecol.* 21, 947–959.
- Harris, W. M.** 1987. Comparative ultrastructure of developing seed coats of “Hard-Seeded” and “Soft-Seeded ” varieties of soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Bot. Gazzete* 148, 324–331.
- Hay, F. R., Smith, R. D., Ellis, R. H., Butler, L. H.** 2010. Developmental changes in the germinability, desiccation tolerance, hardseededness, and longevity of individual seeds of *Trifolium ambiguum*. *Ann. Bot.* 105, 1035–52.
- Hyde, E. O. C.** 1954. The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to the ripening of the seed and the permeability of the testa. *Ann. Bot.* 18, 241–256.
- Jayasuriya, K. M. G. G.** Baskin, J.M., Geneve, R.L., Baskin, C.C., 2007. Morphology and anatomy of physical dormancy in *Ipomoea lacunosa*: identification of the water gap in seeds of Convolvulaceae (Solanales). *Ann. Bot.* 100, 13–22.
- Jordan, J. L., Jordan, L. S., Jordan, C. M.** 1983. Some Effects of Sulphuric Acid Scarification on *Polygonum pensylvanicum* L Achenes. *Ann. Bot.* 51, 855–858.
- Kelly, K. M., Staden, J., Bell, W. E.** 1992. Seed coat structure and dormancy. *Plant Growth Regul.* 11, 201–209.
- Koszo, C. R. R., Rinaldi, M. C. S., Barbedo, C. J.** 2007. Germinação de sementes de *Erythrina speciosa* Andr., *Eugenia brasiliensis* Lam. e *Cucumis sativus* L. em meio ácido. *Hoehnea* 34, 271–282.
- Krukoff, B. A., Barneby, R. C.** 1974. A conspectus of the genus *Erythrina*. *Lloydia* 37, 332–459.
- Lamarca, E. V., Prativiera, J. S., Borges, I. F., Delgado, L. F., Teixeira, C. C., Camargo, M. B. P., Faria, J. M. R., Barbedo, C. J.** 2013. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. *An. Acad. Bras. Cienc.* 85, 223–233.
- Leivas, J., Berlato, M., Fontana, D.** 2006. Risco de deficiência hídrica decendial na metade sul do Estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* 10, 297–407.
- Lima, H.** 2014. *Erythrina* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. *Jard. Botânico do Rio Janeiro*. URL <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29677> (accessed 2.18.14).
- Manning, J. C., Staden, J.** 1985. The development and ultrastructure of the testa and tracheid bar in *Erythrina lysistemon* Hutch. (Leguminosae: Papilionoideae). *Protoplasma*

129, 157–167.

- Marcos Filho, J.** 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba.
- McDonald, M. B.** 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci. Technol.* 27, 177–237.
- 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 Arch. Biol. Technol.* 53, 889–899.
- Molizane, D.M.** 2012. Estabelecimento e superação de dormência em sementes de *Erythrina speciosa* ANDREWS 77.
- Nakagawa, J., Zucareli, C., Cavariani, C. C., Gaspar, C. M., Gaspar-Oliveira, C.** 2007. Maturação de sementes de mucuna-preta. *Biosci. J.* 23, 41–47.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E.** 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59, 368–373.
- Perez, S. C. J. G. D. A.** 2004. Envoltórios, in: Gui Ferreira, A., Borghetti, F. (Eds.), *Germinação Do Básico Ao Aplicado*. Artmed, Porto Alegre, p. 323.
- Pimentel, C.** 2004. A relação da planta com a água. Edur, Seropédica, RJ.
- Rolim, G. D. E. S., Camargo, M. B. P., Lania, D. G., Moraes, J. F. L.** 2007. Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas. *Bragantia* 66, 711–720.
- Rolston, M. P.** 1978. Water impermeable seed dormancy. *Bot. Rev.* 44, 365–396.
- Slattery, H.D., Atwell, B.J., Kuof, J.** 1982. Relationship between Colour, Phenolic Content and Impermeability in the Seed Coat of various *Trifolium subterraneum* L. genotypes. *Ann. Bot.* 50, 373–378.
- Souza, F. H. D., Marcos-Filho, J.** 2001. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Rev. Bras. Botânica* 24, 365–375.
- Standifer, L. C., Wilson, P. W., Drummond, A.** 1989. The effects of seed moisture content on hard-seededness and germination in four cultivars of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.). *Plant Var. Seeds* 2, 149–154.
- Thornthwaite, C. W., Mather, J. R.** 1955. The water balance. Drexel Institute of Technology. (Publications in climatology), New Jersey.

Capítulos 3 - Indução da impermeabilidade do tegumento em relação a água durante a maturação em sementes de *Erythrina speciosa* Andrews.

RESUMO – A dormência é um processo fisiológico que permite a sobrevivência das sementes em ambientes adversos, ao prevenir a germinação, o que resulta na dispersão temporal das sementes. Ao final do processo de maturação é comum as sementes apresentarem a impermeabilidade do tegumento à água, sendo considerada a dessecação, como uma sinalização para a instalação de dormência. As condições ambientais em que a planta-mãe está submetida interferem no processo de maturação das sementes, ocasionando variações na qualidade fisiológica das sementes e também na instalação da dormência física. O objetivo desse trabalho é verificar se a impermeabilidade da testa apresentado em sementes maduras de *Erythrina speciosa* pode ser observada em sementes imaturas que passaram pelo processo de secagem *ex situ*. Sementes de 3 estádios imaturos foram secas em intervalos gradativos. Inicialmente e após a secagem as sementes passaram por avaliações físicas (teor de água – 103° C/17h) e fisiológicas (germinação – 25°C). Amostras de cada nível de secagem foram fixadas em FAA70, desidratadas, incluídas em resina plástica, seccionada, corada em azul de toluidina e analisadas. A secagem, mesmo que *ex situ* foi capaz de promover a instalação da impermeabilidade da testa. Nas duas coletas analisados foi possível observar diferenças significativas nos estádios de maturação que ocorreu a instalação da dormência, na primeira coleta, o estágio 3 apresentou dormência nas secagens mais severas, enquanto na coleta 2 foi somente no estágio 5. Foi observado também que as condições climáticas em que planta-mãe está submetida pode influenciar o vigor das semente e ainda a dormência.

Palavras-chave: sementes florestais, dormência, secagem, tolerância a dessecação.

1 Introdução

A dormência apresentada pelas sementes de algumas espécies permite a sobrevivência das sementes em ambientes adversos, resultando na dispersão temporal das sementes. Entre diversos tipos de dormência listados, a dormência física imposta pela impermeabilidade do tegumento à água é facilmente encontrada em Fabaceae. Ao final do processo de maturação é comum as sementes apresentarem a dormência por impermeabilidade à água (DIA), sendo considerada a dessecação, como uma sinalização para a instalação de dormência (Rolston, 1978; Slattery *et al.*, 1982; Baskin e Baskin, 2000; Jayasuriya *et al.*, 2007a, 2007b; Nakagawa *et al.*, 2007).

As condições ambientais em que a planta-mãe está submetida interferem no processo de maturação das sementes, ocasionando variações na qualidade fisiológica das sementes, como observado em sementes de *Caesalpinia echinata* (Lamarca *et al.*, 2013). Esses resultados indicam que variações da impermeabilidade do tegumento ocorrem naturalmente durante a maturação, dessa maneira, sementes da mesma espécie podem apresentar diferenças consideráveis quanto a dormência física, se produzidas em diferentes locais ou anos (Hyde, 1954; Standifer *et al.*, 1989; Hay *et al.*, 2010; Gama-Arachchige *et al.*, 2011).

Sementes imaturas de *Trifolium ambiguum* submetidas a secagem artificial adquiriram dormência física simultaneamente ao processo de tolerância à dessecação, evidenciando assim, que mesmo sementes imaturas são capazes de responder a sinais externos, mesmo que artificiais, que resultam na instalação prévia da dormência física. Já em sementes de *Geranium carolinianum*, o teor de água apresentado nas sementes imaturas secas foi o responsável pela instalação da dormência. Sementes com 11% de água estavam totalmente dormentes, enquanto sementes com 13% não tiveram a dormência instalada (Hay *et al.*, 2010; Gama-Arachchige *et al.*, 2011).

Erythrina speciosa Andrews (Leguminosae, Faboideae) é uma espécie que apresenta distribuição nas regiões de Cerrado e da Mata Atlântica. É conhecida popularmente como

eritrina-candelabro, maçaranduba, mulungu, saranduba ou suinã. Apresenta aspecto arbóreo entre 3 a 5 metros de altura, e é muito utilizada como planta ornamental. Sementes de *E. speciosa* são tolerantes à dessecação e podem ser armazenadas por diversos anos, além disso, quando maduras apresentam o tegumento impermeável à absorção de água (Krukoff e Barneby, 1974; Faria *et al.*, 2007; Koszo *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2010; Lima, 2014).

O objetivo desse trabalho é verificar se a impermeabilidade da testa apresentada em sementes maduras de *Erythrina speciosa* pode ser observada em sementes imaturas que passaram pelo processo de secagem *ex situ*, corroborando assim para a teoria de que essa dormência não está vinculada ao processo de maturação e sim com a secagem natural ocorrida ao final da maturação.

2 Material e métodos

Material vegetal: Frutos de *Erythrina speciosa* foram coletados de 30 matrizes do Parque Cultural Catavento, em área urbana do município de São Paulo, SP (23°32'44"S e 46°37'40"O), entre os meses de agosto a outubro de 2013 e 2014. Três coletas foram realizadas a fim de obter 3 dos 6 estádios de maturação. A extração das sementes foi realizada por meio de quebra dos frutos e retirada manual das sementes e, em seguida, classificadas em 6 estádios de maturação conforme descrito abaixo, utilizando as características morfológicas do tegumento e tamanho das sementes, como descrito no primeiro capítulo dessa tese: Estádio 3 (E3) - coloração verde-claro com manchas castanho-claro, comprimento médio de 1,6 cm; Estádio 4 (E4) - coloração verde e coberto por manchas castanhas, comprimento médio de 1,88 cm; Estádio 5 (E5) - coloração castanha com manchas verdes, comprimento médio de 1,52 cm.

Análises físicas e fisiológicas: Ao fim do beneficiamento, imediatamente o teor de água e o conteúdo de massa seca das sementes de cada estádio acima citado, foram avaliados pelo método gravimétrico, em estufa a 103°C por 17 horas, utilizando 4 repetições de 5

sementes, e os resultados apresentados, respectivamente, em porcentagem (base úmida) e em mg/semente (Brasil, 2009). Os testes de germinação foram instalados em rolos de papel previamente umedecidos com água em 2,5 vezes o peso do papel (Brasil, 2009), e acondicionados em sala de germinação regulada para 25°C com umidade relativa de 70%. As avaliações foram realizadas a cada 2 dias durante 30 dias, sendo registradas as sementes que emitiram raiz primária, com tamanho igual ou superior a 0,5 cm (para o cálculo da porcentagem de germinação). Foi calculado também, o tempo médio de germinação de cada tratamento de secagem de cada estágio segundo a fórmula de Borghetti e Ferreira (2004).

Secagem: Sementes de *E. speciosa* nos estádios acima citados foram submetidas à secagem em estufa a 40°C com circulação forçada de ar, reduzindo o teor de água inicial das sementes em intervalos gradativos até atingirem teor de água de 7%. Após cada etapa de secagem, o teor de água e germinação foram avaliados. As sementes que apresentaram a testa impermeável foram então escarificadas mecanicamente com auxílio de lixa para madeira número 60, divididas e submetidas a dois testes, o primeiro foi o teste de germinação, conforme descrito acima e o segundo foi o teste de tetrazólio, onde as sementes foram incubadas diretamente na solução de sal de tetrazólio 0,01% por 24 horas. As sementes que apresentaram coloração rosa suave foram consideradas viáveis (França-Neto, 1994).

Análises anatômicas: Sementes de cada tratamento de secagem dos estádios 3, 4 e 5 da coleta de 2013 e estádios 4 e 5 da coleta de 2014 tiveram seus tegumentos analisados anatomicamente. Amostras de sementes citados anteriormente foram fixadas em FAA70 e armazenados em etanol 70%. As amostras foram infiltradas em resina plástica (Leica Historesin®), seccionadas transversalmente com navalha descartável em micrótomo rotativo manual RM2245 (Leica®), na espessura de 7µm; e coradas com azul de toluidina 0,05% (O'Brien *et al.*, 1964). A análise das lâminas foi realizada em fotomicroscópio Olympus BX51 e as imagens foram obtidas por câmera acoplada Olympus DP71, no programa DPManager, sendo as escalas obtidas nas mesmas condições das fotomicrografias.

A partir dessas imagens, foram analisadas diferenças apresentadas pelo tegumento das sementes das 2 coletas analisadas (2013 e 2014). Análises minuciosas foram realizadas com ajuda do programa ImageJ, onde foram medidas as seguintes estruturas: altura de cada camada presente no tegumento, ou seja, células em paliçadas, células em ampulheta e parênquima, além das medidas de espessura da cutícula.

Análises estatística: O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, abrangendo 3 estádios de maturação analisados entre si entre as secagens, utilizando 4 repetições de 20 sementes para as análises fisiológicas e 5 sementes para as análises físicas. As medidas realizadas em cada estrutura da testa contou com 3 repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%, onde foi utilizado o programa estatístico R.

3 Resultados e discussão

Análises Físicas e Fisiológicas: a secagem realizada nas sementes imaturas de *Erythrina speciosa* (figura 1a, b), apresentou um resultado com diferenças significativas em ambas as coletas. O estágio 3 de ambas as coletas inicialmente estava com 70% de teor de água. Na coleta de 2013, foi possível secar até 7% de água, já na coleta de 2014, 12%. No estágio 4, o teor de água inicial para a coleta de 2013 foi de 50% e na coleta de 2014 foi de 60%. A secagem máxima atingiu, na coleta de 2013, 7% e na coleta de 2014 foi de 14%. Já no estágio 5, o teor de água inicial para a coleta de 2013 foi de 38% e para a coleta de 2014 foi de 36% e a secagem máxima foi de 7% para a coleta de 2013 e para a coleta de 2014 foi de 12%.

No estágio 3 da coleta de 2013 as sementes se tornaram impermeáveis ao atingirem 15 e 7% de teor de água nas secagens S3 e S4, respectivamente, como pode ser observado através da redução da resposta germinativa, que atingiu 11 e 3%. Já no estágio 4 da coleta de

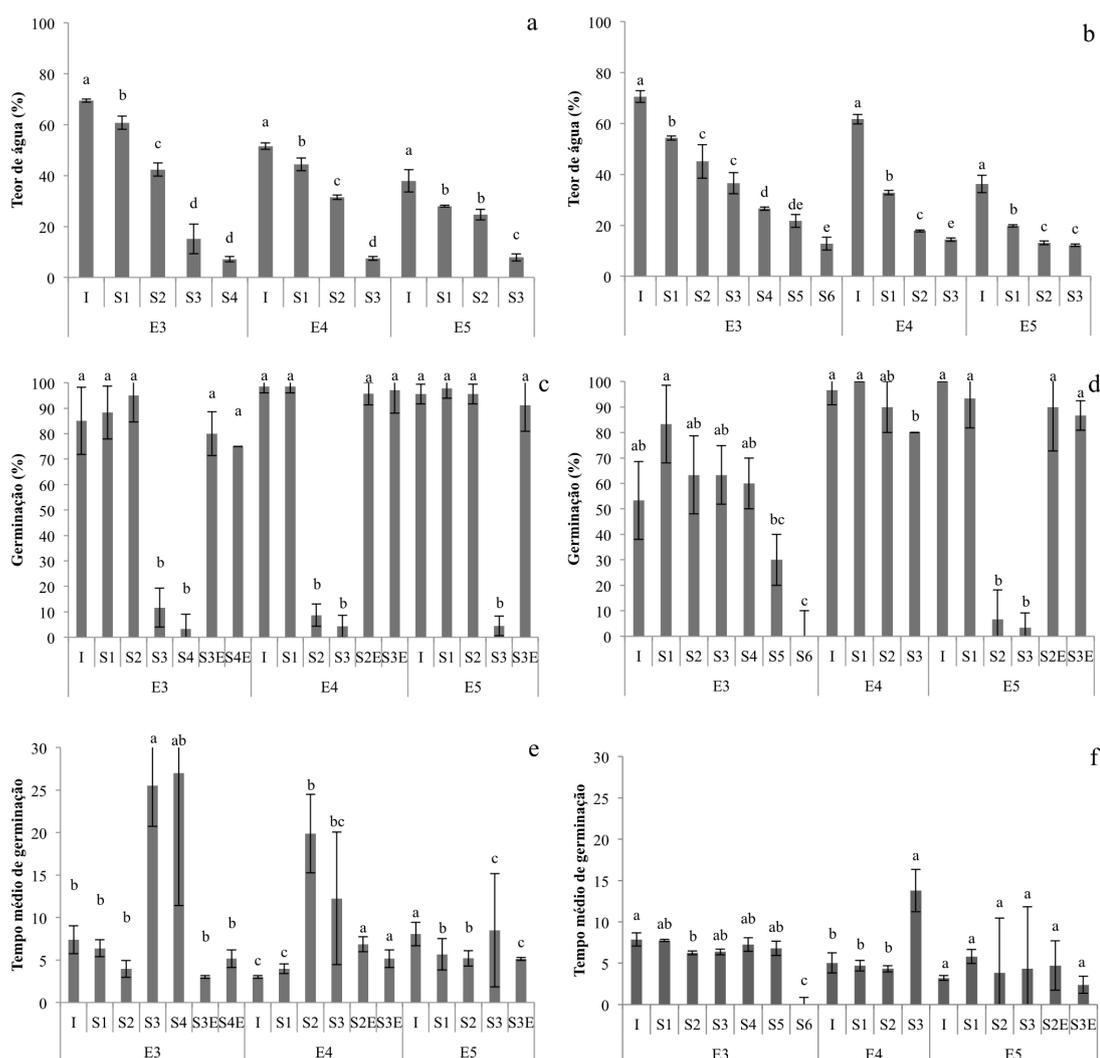


Figura 1 – Respostas físicas e fisiológicas de sementes de *Erythrina speciosa* imaturas intactas e submetida a secagem forçada. (a, b) Teor de água do lote de 2013 e 2014 respectivamente. (c, d) Germinação do lote de 2013 e 2014 respectivamente. (e, f) Tempo médio de germinação do lote de 2013 e 2014 respectivamente. E3- Estádio 3; E4 – Estádio 4; E5 – Estádio 5; S – secagem; E – Escarificada, I – Intacta. As letras comparam as secagem em cada estádios de maturação entre si dentro de cada ano de coleta (2013 e 2014).

2013 as sementes só se tornaram impermeáveis ao atingirem 31 e 7% de teor de água, pois apresentaram 8 e 4% de germinação, nas secagens S3 e S4, respectivamente. Já no estágio 5 a mesma diferença foi observada. Na coleta de 2013 as sementes apresentaram DIA quando atingiram 7% de teor de água com 4% de germinação. Já na coleta de 2014, somente o estágio 5 foi capaz de desenvolver impermeabilidade à água. As secagens S2 e S3 ao atingirem 13 e 12% de teor de água apresentaram 6 e 3% de germinação, respectivamente. Todos os tratamentos de secagem que apresentaram impermeabilidade à água foram posteriormente

escarificadas mecanicamente para verificar a viabilidade da coleta. Em todos os casos as porcentagens de germinação variaram entre 80 e 97% de germinação, demonstrando que as sementes desenvolveram impermeabilidade à água, como pode ser observado na figura 1.

A baixa porcentagem de germinação apresentado pelos estádios 3 e 4 (figura 1c) de ambos as coletas, pode até ser parecida inicialmente, mas há diferenças significativas quanto a instalação da DIA. No estádio 3 da coleta de 2013, as sementes adquiriram DIA, como demonstrado acima, mas no estádio 3 da coleta de 2014 (figura 1d) as sementes não foram capazes de sobreviver a secagem pois ainda não haviam se desenvolvido o suficiente para se tornarem tolerantes a dessecação. Já no estádio 4, as porcentagens de germinação (figura c), também apresentaram diferenças quanto a DIA. Na coleta de 2013, é possível observar que as sementes desenvolveram DIA e após a germinação ocorreu aumento na porcentagem de germinação. O mesmo não foi observado no estádio 4 da coleta de 2014 (figura 1d), visto que a resposta germinativa demonstra que as sementes já estavam tolerantes a dessecação, mas não possuíam DIA.

Com base nos resultados de teor de água e germinação é possível afirmar que as sementes imaturas se tornaram impermeáveis, mas não é possível determinar qual porcentagem de teor de água após a secagem torna a semente impermeável em sementes de *E. speciosa*, uma vez que cada estádio de cada coleta apresentou um teor de água diferente para a instalação da DIA. Diferente do que foi observado por Gama-Arachchige *et al.* (2011), com sementes de *Geranium carolinianum*, que apresentaram como gatilho, para instalação da dormência por impermeabilidade, o teor de água. Sementes imaturas que foram secas até atingirem 11% de água estavam totalmente dormentes, enquanto sementes com 13% não tiveram a dormência instalada, apesar dos autores terem utilizado uma única coleta para determinar o gatilho para a instalação da DIA.

Diferenças na germinação em sementes provenientes do mesmo local, mas de anos distintos são esperados, uma vez que as condições climáticas em que a planta-mãe está

submetida podem influenciar na maturação e vigor. No segundo capítulo dessa tese, foi possível observar que sementes de *E. speciosa* analisadas durante a maturação em 6 anos consecutivos demonstraram diferenças na DIA, e foram influenciadas pelas condições climáticas. Em um estudo com o intuito de verificar se a dormência apresentada em várias espécies estava relacionada com hereditariedade ou condições ambientais em que a planta-mãe estava submetida, foi verificado que as condições ambientais influenciaram significativamente as características de dormência e germinação, mas nem todas apresentaram o mesmo gatilho para a instalação da DIA (Baskin e Baskin, 1973).

O tempo médio de germinação (TMG) apresentou diferenças significativas entre as sementes intactas e as que foram secas. No estágio 3 da coleta de 2013 (figura 1e), foi possível observar que nas secagens S3 e S4, as sementes germinaram após aproximadamente 25 dias do início do teste de germinação, enquanto na semente intacta e nos níveis de secagens iniciais foi de no máximo 7 dias. Já na coleta de 2014, TMG foi de 7 dias, sem diferenças significativas entre as secagens, exceto pela secagem final, onde as sementes estavam deterioradas, ou mortas. No estágio 4 da coleta de 2013, foi possível observar um aumento significativo somente nas secagens S2 e S3, mesmo que o índice seja maior na secagem S2 do que na secagem S3. Na coleta de 2014, apesar do aumento no TMG, que nas sementes intactas era de aproximadamente 5 dias e na secagem S3 foi de 13 dias, as sementes secas não apresentaram DIA. Já no estágio 5 na coleta de 2013 só foi possível observar diferenças significativas entre as sementes intactas e os tratamentos de secagens S1/S2 e S3, mas para a coleta de 2014 não foram observadas diferenças estatísticas entre o TMG, o tratamento inicial e os tratamentos de secagem. Diferenças no TMG podem indicar que o processo de instalação da DIA estava em progresso, mas que ainda não havia atingido toda a semente, portanto a água demorou mais tempo para entrar e dar início ao processo de germinação, como foi possível observar em estágio 3 e 4 nos tratamentos S3 e S4, assim como no estágio 4 da coleta de 2014 no tratamento S3.

Além da utilização dos testes de germinação com escarificação mecânica nas sementes de *E. speciosa* imaturas que desenvolveram a DIA, testes de tetrazólio (figura 2a, b) também foram realizados em ambas as coletas. O teste de tetrazólio é amplamente utilizado para verificar a qualidade da coleta, obtendo o resultado em poucos dias, sem a necessidade de aguardar até o final do teste de germinação para uma tomada de decisão. No caso das sementes de *E. speciosa* que adquiriam DIA, analisados neste estudo, os resultados foram semelhantes ao encontrado nos testes de germinação. As sementes que foram capazes de instalar a DIA, apresentavam cotilédones e eixo embrionários corados de rosa suave, seguindo os padrões utilizados por França-Neto (1994), para determinação da viabilidade das sementes, portanto não apresentavam danos que fossem letais. Esse resultado é semelhante aos testes de germinação com sementes que foram escarificadas mecanicamente, aonde a porcentagem de germinação apresentou valores próximos a 90%.

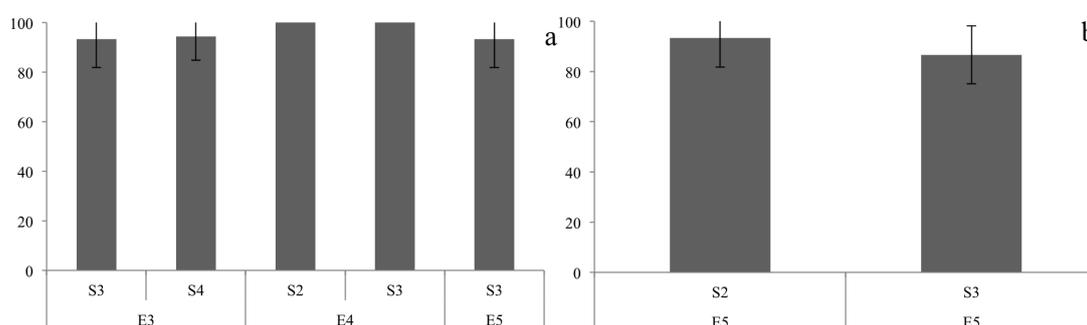


Figura 2 – Análise de sementes de *Erythrina speciosa* imaturas que adquiram dormência após a secagem avaliadas através do teste de tetrazólio. (a) Lote de 2013. (b) Lote de 2014. E3- Estádio 3; E4 – Estádio 4; E5 – Estádio 5; S – secagem.

As secagens mais severas realizadas nas sementes de *E. speciosa* na coleta de 2014 além de não apresentarem DIA, também mostraram a intolerância a dessecação, pois a redução da porcentagem de germinação está relacionada com a deterioração e morte das sementes. A capacidade de tolerar a dessecação e instalar a DIA não foi a mesma para as duas coletas analisadas, sugerindo assim que existe a necessidade de um desenvolvimento mínimo e independentemente da capacidade de germinar, tolerar a dessecação e também instalar a DIA. Essas diferenças observadas em ambas as coletas de *E. speciosa* não ocorreu com

sementes de *Trifolium ambiguum* (Kura clover), pois o resultado obtido são semelhantes quanto ao momento de início do processo de germinação e também da aquisição da tolerância a dessecação. No estudo os resultados com *T. ambiguum* mostram que as sementes atingiram o mesmo desenvolvimento mínimo em momentos semelhantes durante a maturação, tanto para a capacidade germinativa, que se desenvolveu primeiro, como também para a capacidade de tolerar a dessecação, que se desenvolveu depois (Hay *et al.*, 2010).

Os resultados desse estudo nos mostram que as sementes da coleta de 2014, nos estádio 3 e 4 não atingiram o desenvolvimento mínimo para tolerar a dessecação *ex situ*, e nem desenvolver a DIA, apesar das sementes apresentarem as características morfológicas, anatômicas e teores de água semelhantes à coleta de 2013. É possível observar, também, diferenças no desenvolvimento das sementes entre os estádios 3 das duas coletas. A coleta de 2013 já tinha iniciado o processo de reversão do metabolismo de acúmulo de reservas para dar início ao processo de germinação, enquanto a coleta de 2014 teve essa reversão ocorrendo durante a secagem, o que pode ter influenciado na capacidade de tolerar a dessecação. Essa reversão no metabolismo é descrito na literatura como um processo de preparação da semente para o período quiescente ou para DIA (Angelovici *et al.*, 2010).

As sementes maduras de *E. speciosa* são tolerantes a dessecação e a quantidade elevada de açúcares e lipídeos presentes no cotilédone e eixo embrionário podem promover uma proteção nas membranas celulares embrionárias contra danos causados pela dessecação (Mello *et al.*, 2010) ou, ainda, a presença de proteínas LEA que auxiliam na preservação da orientação das estruturas, mantendo a membrana celular íntegra (Barbedo e Bilia, 1998; Black e Pritchard, 2002; Berjak, 2006). Leprince *et al.* (2008) afirmam que a dessecação é considerada necessária para completar o ciclo de vida das sementes ortodoxas, que são aquelas capazes de sobreviver a secagens severas e serem armazenadas por longos períodos sem perder a viabilidade. Os autores ainda afirmam que a capacidade germinativa e a tolerância a dessecação nem sempre são adquiridas juntamente, em muitos casos a resposta

germinativa se desenvolve primeiro, já em outros casos é concomitante. Mas não deixam claro quais são os padrões, pois há vários fatores que interagem com a capacidade germinativa e também, com a tolerância a dessecação, dentre eles é possível citar os danos causados durante a embebição, que pode nos dar falsos resultados de tolerância a dessecação. Também é possível citar o colapso e desorganização nas membranas celulares nas secagens severas, onde os danos são permanentes e levam a morte das sementes.

Existe um conjunto de mecanismos de proteção/processos para que as sementes possam ser secas sem que ocorra danos. As sementes capazes de tolerar a dessecação podem apresentar características físicas, que são redução vacuolar (como observado no capítulo 1 dessa tese), reserva insolúvel, citoesqueleto e conformação do DNA. Também foi citado a diferenciação intracelular, desligamento metabólico, sistema anti-oxidante eficiente, presença de moléculas protetoras, como por exemplo sacarose, moléculas anfipáticas e LEAs (Embriongênese tardia abundante), que são altamente hidrofílicas devido à alta concentração de aminoácidos principalmente na elevada proporção de glicinas, sendo muito estáveis e de difícil degeneração que promovem também mecanismos de reparo durante a reidratação. Portanto quanto maior a capacidade de tolerar a dessecação mais proteção é necessária (Berjak e Pammenter, 2000; Coll et al, 2003). No caso de *E. speciosa*, por ser uma semente tolerante a dessecação, uma quantidade maior desses mecanismos/processos são necessários na semente madura. Já na semente imatura, esses mecanismos/processos ainda estão se desenvolvendo, e cada uma das coletas analisadas apresentou um momento durante a maturação para tolerar a dessecação.

Neste estudo foi comprovado que as sementes de *E. speciosa* foram capazes de adquirir DIA, desde que tenham a programação genética para tal, independente do processo de maturação, desde que apresente um desenvolvimento mínimo. Portanto é sugerido que não adianta secar as sementes imaturas que não apresentam os compostos necessários na testa das semente para uma transformação química que promovem à água. Também é sugerido que a

capacidade de tolerar a dessecação ocorra independentemente à da capacidade de instalar DIA.

Barbedo *et al.* (2013) citam a dormência como um fator que amplia a longevidade da semente, como também foi observado por Brancalion *et al.* (2010) em sementes de *E. speciosa* sem escarificação que passaram pelo processo de envelhecimento acelerado e não apresentaram sinais de deterioração. Barbedo *et al.* (2013) ainda mostram que há um gradiente de desenvolvimento mínimo para que as sementes de diferentes espécies se tornem tolerantes a dessecação, o que também foi observado nesse estudo com sementes de *E. speciosa*, mas em coletas com diferentes capacidade de sobreviver a secagem.

Análises anatômicas: as sementes de *E. speciosa* não apresentaram alterações anatômicas estruturais na testa em análises de microscopia de luz durante a secagem dos estádios imaturos, uma vez que as mesmas estruturas presentes nas sementes maduras estavam presentes nas sementes imaturas. Foi observado a cutícula, células em paliçadas, linha lúcida, células em ampulheta, e parênquima (figuras 3 e 4). As diferenças observadas, são descritas através da medição da altura das camadas presentes na testa.

A medição realizada na altura das células em paliçadas (figura 5a, b), no geral não apresentaram resultados significativos relacionados com a secagem. Foram observadas algumas diferenças significativas nos estádios E4 de ambas as coletas, mas por estarem aleatórios não estão relacionadas com a secagem, e sim com o diferenças de tamanho apresentadas pelas sementes. A espessura da linha lúcida e da cutícula (figura 5c, d) também não apresentaram diferenças significativas nas medidas que fossem relacionadas com a secagem. O tamanho das células em ampulheta (figura 5e, f) do estádio 4 da coleta de 2013 foi o único que apresentou resultados relacionados com a secagem, mas no geral isso não ocorreu, portanto não é possível afirmar que há diferenças relacionadas a secagem. Então, é possível supor que a partir do momento em que esses tecidos estão formados, a secagem, seja natural ou não, não afeta sua estrutura.

O único tecido presente na testa das sementes que apresentou diferenças nos estudos minuciosos de medição correlacionadas com a secagem foi o parênquima. É possível observar que os estádios 3 e 4 na coleta de 2013 apresentaram redução na altura, condizendo com a redução no teor de água presente na semente. Já o estágio 5 de ambas as coletas, o parênquima não apresentou redução na altura, possivelmente porque a água retirada durante a secagem estivesse presente nos cotilédones.

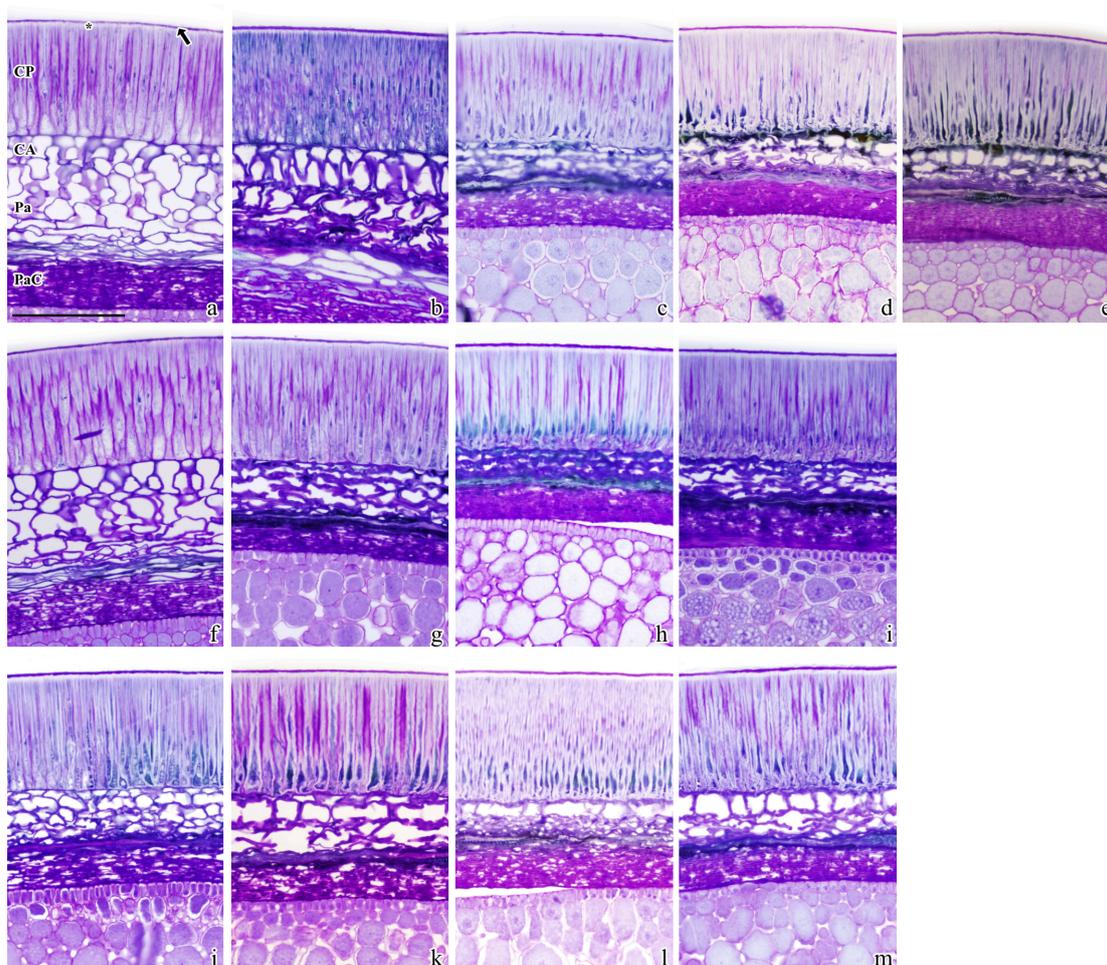


Figura 3 – Anatomia da testa de *Erythrina speciosa* em sementes imaturas intactas e submetida a secagem forçada do lote de 2013. (a, b, c, d, e) Estádio 3. (f, g, h, i) Estádio 4. (j, k, l, m) Estádio 5. (a, f, j) Sementes sem secagem. (b, g, k) Secagem 1. (c, h, l) Secagem 2. (d, i, m) Secagem 3. (e) Secagem 4. CP – Células em paliçadas; CA – Células em ampulheta; Pa – Parênquima; PaC – Parênquima condensado; → - Cutícula. * - Linha lúcida. Escala 100 µm.

Segundo Moïse *et al.* (2005), o parênquima é um tecido que nos estádios iniciais da maturação apresentam grande número de organelas e, portanto, é metabolicamente ativo, produzindo nutrientes destinados ao desenvolvimento do embrião. Nessa fase também possui

grandes espaços intercelulares que são preenchidos com uma solução aquosa com a função de difundir nutrientes a serem armazenados nos cotilédones. Nos estádios finais da maturação, esse tecido perde água, se degenera, se tornando uma outra fonte de nutrientes para o embrião, por isso tem aparência de tecido condensado.

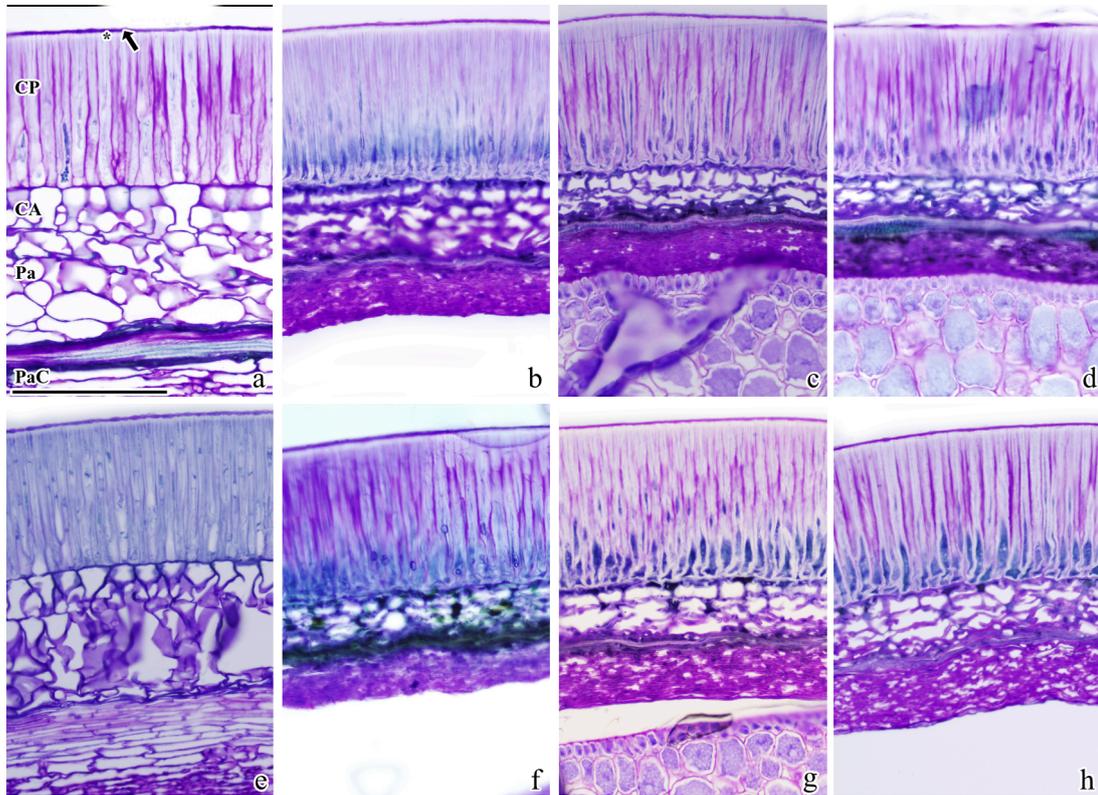


Figura 4. Anatomia da testa de *Erythrina speciosa* e sementes imaturas intactas e submetida a secagem forçada do lote de 2014. (a, b, c, d) Estádio 4. (f, g, h) Estádio 5. (a, e) Sementes sem secagem. (b, f) Secagem 1. (c, g) Secagem 2. (d, h) Secagem 3. CP – Células em paliçadas; CA – Células em ampulheta; Pa – Parênquima; PaC – Parênquima condensado; → - Cutícula. * - Linha lúcida. Escala 100 μ m

Medidas semelhantes para as células em paliçadas foram encontradas para sementes de várias espécies de *Mucuna*. Somente em *Mucuna atropurpurea* é que as células em paliçadas foram maiores que de *E. speciosa*. Já as células em ampulheta, as medidas observadas foram diferentes, em *E. speciosa* a medida média observada em todos os tratamentos de secagem foi de no máximo 35 μ m, enquanto nas sementes de *Mucuna* foi de 140 μ m. Já o parênquima apresentou medidas médias de 100 μ m, enquanto em *Mucuna* variou de 12 a 134 μ m (Vijayambika *et al.*, 2011). Esses resultados mostram que as camadas

presentes na testa de ambas as espécies apresentam a mesma estrutura, embora cada uma tem características específicas.

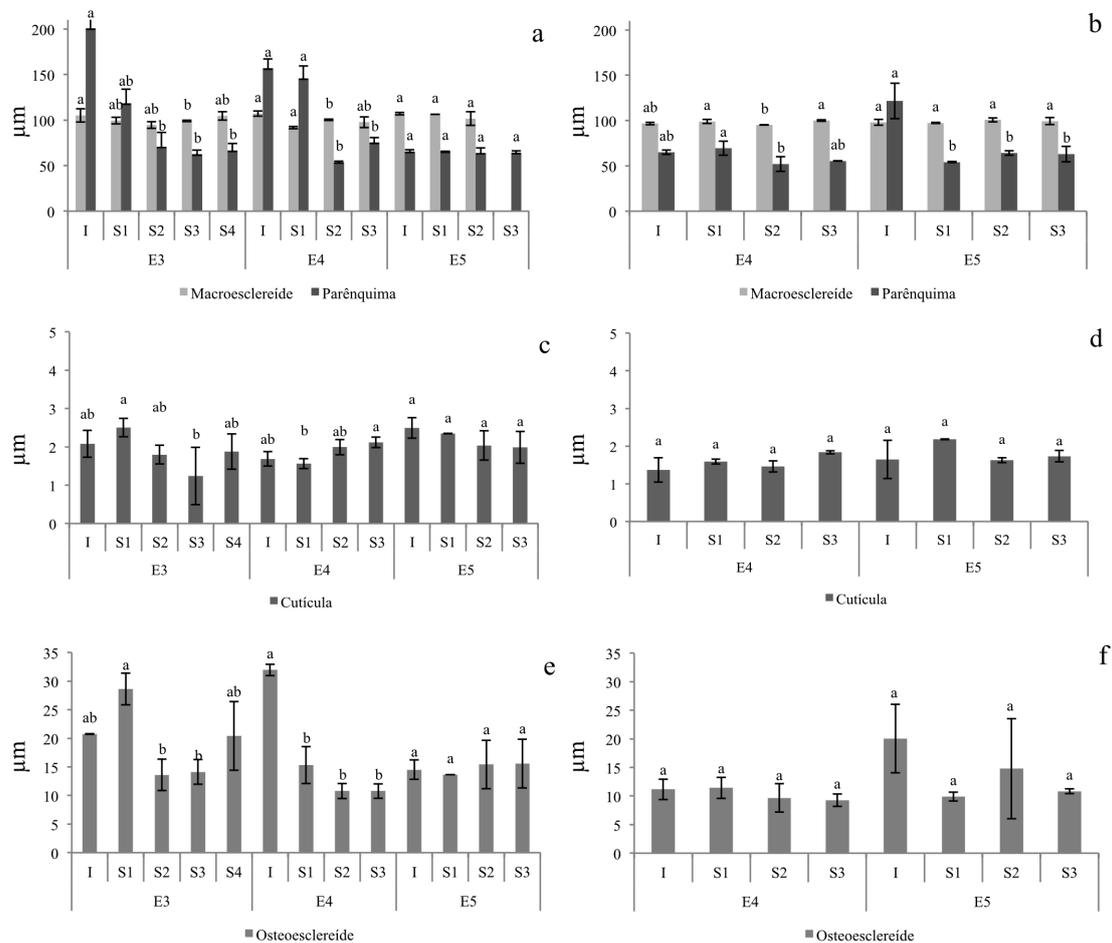


Figura 5. Medidas do comprimento das camadas de células da testa de *Erythrina speciosa* em sementes imaturas intactas e submetida a secagem forçada nos lotes de 2013 e 2014. (a, c, e) lote de 2013. (b, d, f) lote de 2014. (a, b) medidas das células em paliçadas e parênquima; (c, d) Cutícula e linha lúcida; (e, f) células em ampulheta.

Corroborando com os resultados obtidos no segundo capítulo dessa tese, não foram observadas diferenças anatômicas capazes de identificar alterações durante a secagem que comprovassem a relação da dormência com as células em paliçadas e a cutícula, como foi observado em sementes de *Glycine max* e *Vicia sativa* (Harris, 1987; Chai *et al.*, 2016). Portanto para *E. speciosa*, a DIA pode estar relacionada com diferenças bioquímicas presentes na testa das sementes influenciadas pelas condições ambientais, que neste estudo não foi possível ser determinada, pois pode ser uma combinação de fatores.

4 Conclusões

- A secagem em sementes imaturas pode induzir à instalação da dormência desde que haja uma pré-disposição genética e também desenvolvimento mínimo e são influenciadas pelas condições climáticas em que a planta-mãe está submetida.

5 Referências bibliográficas

- Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A.R., Fait, A.** 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.* 15, 211–8.
- Barbedo, C. J., Bilia, D. A. C.** 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Sci. Agric.* 55, 121–125.
- Barbedo, C. J., Centeno, D. C., Figueiredo-Ribeiro, R. D. C. L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40, 583–595.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C.** 2000. Evolutionary considerations of claims for physical dormancy- break by microbial action and abrasion by soil particles. *Seed Sci. Res.* 10, 409–413.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C.** 1973. Plant Population Differences in Dormancy and Germination Characteristics of Seeds: Heredity or Environment? *Am. Midl. Nat.* 90, 493–498. doi:10.2307/2424478
- Berjak, P.** 2006. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. *Seed Sci. Res.* 16, 1–15.
- Berjak, P., Pammenter, N. W.** 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 12, 22–55.
- Black, M., Pritchard, H. W.** 2002. *Desiccation and Survival in Plants: Drying without Dying*, Plant Breeding. CABI Publishing, New York.
- Borghetti, F., Ferreira, A. G.** 2004. Interpretação de resultados de germinação, in: Ferreira, A.G., Borghetti, F. (Eds.), *Germinação Do Básico Ao Aplicado*. Artmed, Porto Alegre, p. 323.
- Brancalion, P. H. S., Novembre, A. D. L. C., Rodrigues, R. R., Marcos Filho, J.** 2010. Dormancy as exaptation to protect mimetic seeds against deterioration before dispersal. *Ann. Bot.* 105, 991–8.
- Brasil.** 2009. *Regras para análise de sementes*. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento, Brasília.
- Chai, M., Zhou, C., Molina, I., Fu, C., Nakashima, J., Li, G., Zhang, W., Park, J., Tang, Y., Jiang, Q., Wang, Z.-Y.** 2016. A class II KNOX gene, KNOX4 , controls seed physical dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 6997–7002.
- Coll, J.B., Rodrigo, G.N., García, B.S., Tamés, R.S.,** 2003. *Fisiología Vegetal*. Edicione Pirámide, Madrid.

- Faria, T. D. J., Cafêu, M. C., Akiyoshi, G., Ferreira, D. T., Galão, O. F., Andrei, C. C., Filho, P.P., Paiva, M.R.C., Barbosa, A. de M., Braz-filho, R.** 2007. Alcalóides de flores e folhas de *Erythrina speciosa* Andrews. Quim. Nova 30, 525–527.
- França-Neto, J. de B.** 1994. O teste de tetrazólio em sementes de soja, in: Vieira, R.D., Carvalho, N.M. de (Eds.), Testes de Vigor Em Sementes. Funep, Jaboticabal, pp. 87–102.
- Gama-Arachchige, N. S., Baskin, J. M., Geneve, R. L., Baskin, C. C.** 2011. Acquisition of physical dormancy and ontogeny of the micropyle--water-gap complex in developing seeds of *Geranium carolinianum* (Geraniaceae). Ann. Bot. 108, 51–64.
- Harris, W. M.** 1987. Comparative ultrastructure of developing seed coats of “Hard-Seeded” and “Soft-Seeded ” varieties of soybean, *Glycine max* (L.) Merr. Bot. Gazzete 148, 324–331.
- Hay, F. R., Smith, R. D., Ellis, R. H., Butler, L. H.** 2010. Developmental changes in the germinability, desiccation tolerance, hardseededness, and longevity of individual seeds of *Trifolium ambiguum*. Ann. Bot. 105, 1035–52. doi:10.1093/aob/mcq037
- Hyde, E. O. C.** 1954. The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to the ripening of the seed and the permeability of the testa. Ann. Bot. 18, 241–256.
- Jayasuriya, K. M. G. G., Baskin, J. M., Geneve, R. L., Baskin, C. C.** 2007a. Morphology and anatomy of physical dormancy in *Ipomoea lacunosa*: identification of the water gap in seeds of Convolvulaceae (Solanales). Ann. Bot. 100, 13–22. doi:10.1093/aob/mcm070
- Jayasuriya, K. M. G. G., Baskin, J. M., Geneve, R. L., Baskin, C. C.** 2007b. Seed development in *Ipomoea lacunosa* (Convolvulaceae), with particular reference to anatomy of the water gap. Ann. Bot. 100, 459–70. doi:10.1093/aob/mcm137
- Koszo, C. R. R., Rinaldi, M. C. S., Barbedo, C. J.** 2007. Germinação de sementes de *Erythrina speciosa* Andr., *Eugenia brasiliensis* Lam. e *Cucumis sativus* L. em meio ácido. Hoehnea 34, 271–282.
- Krukoff, B. A., Barneby, R. C.** 1974. A conspectus of the genus *Erythrina*. *Lloydia* 37, 332–459.
- Lamarca, E. V., Prativiera, J. S., Borges, I. F., Delgado, L. F., Teixeira, C. C., Camargo, M. B. P., Faria, J. M. R., Barbedo, C. J.** 2013. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. An. Acad. Bras. Cienc. 85, 223–233.
- Leprince, O., Hendry, G. a. F., McKersie, B. D.** 2008. The mechanisms of desiccation

tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 3, 231–246.
doi:10.1017/S0960258500001859

- Lima, H.** 2014. *Erythrina* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jard. Botânico do Rio Janeiro. URL <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29677> (accessed 2.18.14).
- 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 Arch. Biol. Technol.* 53, 889–899.
- Moïse, J. A., Han, S., Gudynaite-Savitch, L., Johnson, D. A., Miki, B. L. A.** 2005. Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 41, 620–644. doi:10.1079/IVP2005686
- Nakagawa, J., Cavariani, C., Martins, C. C., Coimbra, R. D. A., Oliveira, R. R.** 2007. Intensidade de dormência durante a maturação de sementes de mucuna-preta. *Rev. Bras. Sementes* 29, 165–170. doi:10.1590/S0101-31222007000100023
- O'Brien, T. P., Feder, N., McCully, M. E.** 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59, 368–373.
- Rolston, M. P.** 1978. Water impermeable seed dormancy. *Bot. Rev.* 44, 365–396.
- Slattery, H. D., Atwell, B. J., Kuof, J.** 1982. Relationship between Colour, Phenolic Content and Impermeability in the Seed Coat of various *Trifolium subterraneum* L. genotypes. *Ann. Bot.* 50, 373–378.
- Standifer, L. C., Wilson, P. W., Drummond, A.** 1989. The effects of seed moisture content on hard-seededness and germination in four cultivars of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.). *Plant Var. Seeds* 2, 149–154.
- Vijayambika, C., Jegadeesan, M., Ganthi, A. S.** 2011. Comparative anatomical studies on seeds of *Mucuna* Adans. and *Canavalia* Dc. species. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 2, 81–87.

Considerações Finais

Nos seis anos em que foi estudado a maturação, pudemos observar que as classificações em seis estádios foram eficientes pois apresentaram pequenas diferenças quanto a valores de massa seca e teor de água. Mas em relação resposta germinativa e tempo médio de germinação, foi possível observar que as condições em que a planta-mãe está submetida podem promover alterações no vigor.

As diferenças observadas nas respostas fisiológicas em relação a dormência apresentadas pelo estudo com os 6 anos de maturação não foram observadas anatomicamente, apesar das sementes apresentarem a mesma base genética. Este fato mostra que as células tem uma programação genética para desenvolver determinadas camadas com formatos e funções específicas. Uma vez não encontradas diferenças anatômicas, podemos supor que da mesma forma que as sementes de coletas diferentes, de plantas diferentes, de inflorescência diferentes e até mesmo dentro do mesmo fruto apresentam graus de dormência por impermeabilidade água (DIA) diferentes, a deposição de compostos não são exatamente iguais em toda a testa da semente. Com isso é possível que ocorram áreas de maior impermeabilidade e áreas de menor impermeabilidade.

Os resultados do capítulo 2 demonstram que as sementes que apresentam um grau DIA mais elevado podem ter mais áreas com deposição de compostos que durante a secagem vão se tornar hidrofóbicos, enquanto as sementes com um grau menor de DIA podem ter áreas menores desses compostos. Esse gradiente de DIA apresentado pelas sementes de *E. speciosa* neste estudo são influenciados pelas condições climáticas em que a planta-mãe está submetida. E diferente de algumas espécies já estudadas, como por exemplo, *Digitaria milanjana* (Rendle) Stapf, que a deficiência hídrica tornou as sementes mais dormentes (Hacker, 1984), e também diferente de *Geranium carolinianum*, que apresentou como gatilho o teor de água após a secagem, as sementes de *E. speciosa* não apresentaram um gatilho

específico para a alteração no grau da DIA, uma vez que as condições climáticas foram diversas e não apresentaram uma correlação significativa com a dormência.

Neste estudo, além de não poder determinar o gatilho para a instalação da DIA, também não pudemos observar diferenças anatômicas entre as sementes dormentes e não dormentes. Vários autores, na literatura, citam a altura das células em paliçadas e ainda a espessura da cutícula como fatores para a DIA, o que não foi observado em sementes *E. speciosa*.

Então, podemos levantar a hipótese de que são necessários uma sequência de eventos para que a DIA se instale, como por exemplo, maior deposição de compostos específicos em grandes áreas nas células em paliçadas e cutícula, através de condições climáticas adequadas para translocação desses compostos, tempo de permanência da semente ligada a planta-mãe e ainda a secagem. As sementes que permanecem mais tempo ligadas a planta-mãe podem receber mais fotossintetizados e isso pode aumentar a deposição de compostos tanto nos cotilédones, como na testa, fazendo que haja aumento na matéria seca da semente e redução no teor de água.

A secagem natural que ocorre no final do processo de maturação nas sementes ortodoxas, sempre foi indicado como a sinalização necessária para a instalação da dormência. Neste estudo foi possível observar que a instalação da dormência está ligada a secagem, mas desde que haja uma programação genética, e condições mínimas de desenvolvimento para isso. Foi demonstrado que as sementes que não atingiram o desenvolvimento mínimo ao passar pela secagem entraram em processo de deterioração. Já as sementes imaturas, que atingiram um desenvolvimento mínimo, adquiriam dormência após passarem pela secagem *ex situ*. Essa diferença na resposta física e fisiológica também está intimamente ligada as condições ambientais em que a planta-mãe está submetida.

De um modo geral, as sementes que são capazes de tolerar a dessecação podem ter maior deposição de substâncias protetoras contra danos, impedindo assim a morte das

sementes, tanto no momento de secagem como no momento em que ocorre a embebição dando início ao processo de germinação. Da mesma forma ocorre na DIA, como dito anteriormente, mas não necessariamente esses dois fatores estão dependentes. Sementes imaturas do estágio 2 da coleta de 2013 (dados não publicados), foram capazes de adquirir DIA, mas após a escarificação mecânica as sementes morreram, sugerindo a incapacidade de tolerar a dessecação.

A classificação sugerida por E. H. Roberts quanto a tolerância a dessecação pode não ser aplicada a todas as espécies. Segundo Berjak & Pammenter (2000), classificar as sementes conforme o seu comportamento é um erro, pois estudos mostram que o mais provável é que ocorra um degrade contínuo desde as espécies mais sensíveis a dessecação até as mais tolerantes. Um novo olhar sobre essa classificação descrito por Barbedo *et al.* (2013) indica que sementes ortodoxas e recalcitrantes realmente não existem. E sim, as sementes são dispersas em diferentes pontos durante a maturação, e que possuem um gradiente de desenvolvimento mínimo para que as sementes de diferentes espécies se tornem tolerantes a dessecação.

As sementes ditas recalcitrantes são na verdade sementes imaturas, mas que já possuem capacidade germinativa. E as sementes ortodoxas são sementes que conseguiram avançar no processo de maturação, adquirir tolerância a dessecação e são capazes de passar pela secagem sem que ocorra danos.

Ainda segundo Barbedo *et al.* (2013), a DIA é um fator que amplia a longevidade da semente, uma vez que há uma barreira contra as alterações de umidade do ambiente, que podem promover aumento do metabolismo e conseqüentemente deteriorar o lote. Neste estudo foi comprovado que as sementes de *E. speciosa* foram capazes de adquirir DIA, desde que apresentem uma pré-disposição genética, independente do processo de maturação, mas que dependente de um desenvolvimento mínimo. Portanto é sugerido que não adianta secar as

sementes imaturas que não apresentam os compostos necessários na testa das sementes, para uma transformação química em compostos hidrofóbicos, pois a DIA não poderá ser instalada.

Portanto podemos concluir que a secagem em sementes imaturas pode induzir à instalação da DIA, desde que haja uma pré-disposição genética, desenvolvimento mínimo e condições ambientais favoráveis.

Bibliografia

Barbedo, C. J., Centeno, D. D. C., Figueiredo-Ribeiro, R. D. C. L., 2013. Do recalcitrant seeds really exist ? *Hoehnea* 40: 583–595.

Berjak, P., Pammenter, N. W., 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 12: 22–55.

6 Referências Bibliográficas

Algan, G., Büyükkartal, H. N. 2000. Ultrastructure of Seed Coat Development in the Natural Tetraploid *Trifolium pratense* L. J. Agron. Crop Sci. 184, 205–213.

Alves, M. D. C. S., Medeiros-Filho, S., Teófilo, E. M., Andrade-Neto, M. 2000. Superação da dormência em sementes de *Bauhinia monandra* Britt e *Bauhinia unguolata* L.-Caesalpinoideae. Rev. Brasileira Sementes 22, 139–144.

Anand, A., Bhardwaj, J., Nagarajan, S. 2011. Comparative evaluation of seed coat dormancy breaking treatments in *Stylosanthes seabrana*. Grass Forage Sci. 66, 272–276.

Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A. R., Fait, A. 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. Trends Plant Sci. 15, 211–8.

Barbedo, C. J., Bilia, D. A. C. 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. Sci. Agric. 55, 121–125.

Barbedo, C. J., Centeno, D. C., Figueiredo-Ribeiro, R. D. C. L. 2013. Do recalcitrant seeds really exist? Hoehnea 40, 583–595.

Barbedo, C. J., Marcos Filho, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. Acta Bot. Brasilica 12, 145–164.

Baskin, C. C. 2003. Breaking physical dormancy in seeds – focussing on the lens. New Phytol. 158, 227–238.

Baskin, C. C., Baskin, J. M. 2014. Seeds - Ecology, Biogeography, and, Evolution of Dormancy and Germination. 2ª edição. Elsevier, San Diego.

Baskin, J. M., Baskin, C. C. 2000. Evolutionary considerations of claims for physical dormancy- break by microbial action and abrasion by soil particles. Seed Sci. Res. 10, 409–413.

Berjak, P. 2006. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. Seed Sci. Res. 16, 1–15.

Berjak, P., Pammenter, N. W. 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. Rev. Brasileira Fisiol. Veg. 12, 22–55.

Bewley, J. D., Black, M. 1994. Seed physiology of development and germination. 2ª edição. Academic Press, San Diego.

Black, M., Pritchard, H. W. 2002. Desiccation and Survival in Plants: Drying without Dying, Plant Breeding. CABI Publishing, New York.

Boesewinkle, F. D., Bouman, F. 1995. The seed: structure and function, in: Kigel, J., Galili, G. (Eds.), Seed Development and Germination. Marcel Dekker, New York, pp. 1–24.

- Borges, I. F., Neto, J. D. G., 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 Arch. Biol. Technol.* 48, 851–861.
- Borisjuk, V. R. L.** 2014. Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Front Plant Sci.* 5, 510.
- Brançalion, P. H. S., Novembre, A. D. L. C., Rodrigues, R. R., Marcos Filho, J.** 2010. Dormancy as exaptation to protect mimetic seeds against deterioration before dispersal. *Ann. Bot.* 105, 991–8.
- Bruneau, A.** 1996. Phylogenetic and Biogeographical Patterns in *Erythrina* (Leguminosae: Phaseoleae) as Inferred from Morphological and Chloroplast DNA Characters. *Am. Soc. Plant Taxon.* 21, 587–605.
- Büyükkartal, H. N., Çölgeçen, H., Pinar, N. M., Erdoğan, N.** 2013. Seed coat ultrastructure of hard-seeded and soft-seeded varieties of *Vicia sativa*. *Turk. J. Botany* 37, 270–275.
- Cardoso, V. J. M.** 2004. Dormência: estabelecimento do processo, in: Ferreira, A.G., Borghetti, F. (Eds.), *Germinação Do Básico Ao Aplicado*. Artmed, Porto Alegre, p. 323.
- Carmona, R.** 1993. Influência das variações estacionais e profundidade de sementes no solo na dormência e germinação em *Rumex crispus* L. *Planta Daninha* 11, 29–35.
- Carvalho, N. M., Filho, J. F. de S., Grazaiano, T. T., Aguiar, I. B., Graziano, T. T.** 1980. Maturação fisiológica de sementes de Amendoim-do-campo. *Rev. Bras. Sementes* 2, 23–28.
- Carvalho, N. M., Nakagawa, J.** 2012. *Semente: Ciência, Tecnologia e produção*, 5ª edição. ed. Funep, Jaboticabal.
- Castro, R. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M.** 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água, in: Ferreira, A.G., Borghetti, F. (Eds.), *Germinação Do Básico Ao Aplicado*. Artmed, Porto Alegre, p. 323.
- Cavazza, L.** 1950. Recherches sur l'imperméabilité des graines dures chez les légumineuses Giardinelli. *Bull. la Société Bot. Suisse* 60, 596–610.
- Ceballos, L., Hossaert-McKey, M., McKey, D., Andary, C.** 1998. Rapid deployment of allelochemicals in exudates of germinating seeds of *Sesbania* (Fabaceae): roles of seed anatomy and histolocalization of polyphenolic compounds in anti-pathogen defense of seedlings. *Chemoecology* 8, 141–151.

- Chai, M., Zhou, C., Molina, I., Fu, C., Nakashima, J., Li, G., Zhang, W., Park, J., Tang, Y., Jiang, Q., Wang, Z.-Y.** 2016. A class II KNOX gene, KNOX4, controls seed physical dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 6997–7002.
- Corner, E.J.H.** 1951. The leguminous seed. *Phytomorphology* 1, 117–150.
- D’Ippolito, G.** 1905. Sülle cause che impediscono la germinazione dei semi duri nelle papilionacee. *Le Staz. Sper. Agr. Ital.* 38, 114.
- Faria, T. D. J., Cafêu, M. C., Akiyoshi, G., Ferreira, D. T., Galão, O. F., Andrei, C. C., Filho, P. P., Paiva, M. R. C., Barbosa, A. de M., Braz-filho, R.** 2007. Alcalóides de flores e folhas de *Erythrina speciosa* Andrews. *Quim. Nova* 30, 525–527.
- Ferreira, N. R., Franke, L. B., Moço, M. C. de C.** 2011. Estudos morfo-anatômicos relacionados à dormência em sementes de *Adesmia tristis* Vogel (Fabaceae). *Rev. Brasileira Sementes* 33, 447–453.
- Gola, G.** 1905. Ricerche sulla biologia e sulla fisiologia dei semi a tegument o mipermeabile. *Mem. R. Aocad. Sei. Torino II*, 2817.
- Groth, D., Neli, E. R., Andrade, B. D. E.** 2003. Caracterização morfológica de unidades de dispersão de cinco espécies ornamentais. *Rev. Brasileira Sementes* 24, 11–17.
- Gutterman, Y.** 2000. Maternal effects on seeds during development, in: Fenner, M. (Ed.), *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CABI Publishing, Oxon, pp. 59–84.
- Harris, W. M.** 1987. Comparative ultrastructure of developing seed coats of “Hard-Seeded” and “Soft-Seeded” varieties of soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Bot. Gazzete* 148, 324–331.
- Hay, F. R., Smith, R. D.** 2002. Seed Maturity, in: Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.H., Pritchard, H.W., Probert, R.J. (Eds.), *Seed Conservation: Turning Science Into Practice*. Kew Publishing, p. 1022.
- Hilhorst, H. W. M.** 2007. Definitions and hypotheses of seed dormancy, in: Bradford, K.J., Nonogaki, H. (Eds.), *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell Publishing, Oxford, p. 367.
- Hong, T. D., Ellis, R. H.** 1996. A protocol to determine seed storage behaviour, Technical. Ed. Notes. IPGRI, Rome.
- Hyde, E. O. C.** 1954. The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to the ripening of the seed and the permeability of the testa. *Ann. Bot.* 18, 241–256.
- Kantar, F., Hebblethwaite, P. D., Pilbeam, C.J.** 1996. Factors influencing disease resistance in high and low tannin *Vicia faba* 83–88.

Kelly, K. M., Staden, J., Bell, W. E. 1992. Seed coat structure and dormancy. *Plant Growth Regul.* 11, 201–209.

Koszo, C. R. R., Rinaldi, M. C. S., Barbedo, C.J. 2007. Germinação de sementes de *Erythrina speciosa* Andr., *Eugenia brasiliensis* Lam. e *Cucumis sativus* L. em meio ácido. *Hoehnea* 34, 271–282.

Lamarca, E. V., Prativiera, J. S., Borges, I. F., Delgado, L. F., Teixeira, C. C., Camargo, M. B. P., Faria, J. M. R., Barbedo, C. J. 2013. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. *An. Acad. Bras. Cienc.* 85, 223–233.

Lersten, N. R. 1982. Tracheid Bar and Vestured Pits in Legume Seeds (Leguminosae: Papilionoideae). *Am. J. Bot.* 69, 98–107.

Lersten, N. R., Gunn, C. R., Brubaker, C. L., 1992. Comparative Morphology of the Lens on Legume (Fabaceae) Seeds , with Subfamilies Caesalpinioideae and Mimosoideae. *Agric. Res. Serv. - Technical Bull.* 1971, 1–49.

Li, X., Baskin, J. M., Baskin, C. C. 1999. Anatomy of two mechanisms of breaking physical dormancy by experimental treatments in seeds of two north american *Rhus* species (Anacardiaceae). *Am. J. Bot.* 86, 1505–1511.

Lodi, I. E. 2008. Álcool combustível (Série Indústria em Perspectiva). IEL/NC, Brasília.

Manning, J. C., Staden, J. van. 1985. The development and ultrastructure of the testa and tracheid bar in *Erythrina lysistemon* Hutch. (Leguminosae: Papilionoideae). *Protoplasma* 129, 157–167.

Marcos Filho, J. 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba.

Martins, S. V., Silva, D. D. 1997. Maturação e época de colheita de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr.All.ex Benth. *Rev. Brasileira Sementes* 19, 96–99.

Matheus, M. T., Lopes, J. C., Corrêa, N. B. 2011. Maturação fisiológica de sementes de *Erythrina variegata* L. *Ciência Florest.* 21, 619–627.

Mello, J. I. de 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 Arch. Biol. Technol.* 53, 889–899.

Miller, S. S., Bowman, L. A., Gijzen, M., Miki, B. L. A. 1999. Early Development of the Seed Coat of Soybean (*Glycine max*). *Ann. Bot.* 84, 297–304.

Moïse, J. A., Han, S., Gudynaite-Savitch, L., Johnson, D. A., Miki, B.L. A. 2005. Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 41, 620–644.

Molizane, D.M. 2012. Estabelecimento e superação de dormência em sementes de *Erythrina speciosa* ANDREWS. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu.

Molizane, D. M., Kanashiro, S., Tavares, A. R., Barbedo, C. J. 2013. Maturação de sementes de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker e *Vriesea paraibica* Wawra (Bromeliaceae). *Hoehnea* 40, 619–625.

Neill, D. A. 1988. Experimental Studies on Species Relationships in *Erythrina* (Leguminosae: Papilionoideae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75, 886–969.

Obroucheva, N. V., Lityagina, S. V., Novikova, G. V., Sin’kevich, I. A. 2012. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination. *AoB Plants* 12, 1–14.

Ogeda, T. L., Petri, D. F. S. 2010. Hidrólise enzimática de biomassa. *Quim. Nova* 33, 1549–1558.

Oliveira, D. M. T., Paiva, E. A. S. 2005. Anatomy and ontogeny of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae: Faboideae) seed. *Braz. J. Biol.* 65, 483–494.

Oliveira, D. M. T. 2001. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Tephrosieae. *Rev. Brasileira Botânica* 24, 85–97. doi:10.1590/S0100-84042001000100010

Paiva, E. A. S. 2009. Ultrastructure and post-floral secretion of the pericarpial nectaries of *Erythrina speciosa* (Fabaceae). *Ann. Bot.* 104, 937–44.

Palermo, R. B. Z., Agostini, K. 2010. Componentes de fecundidade em *Erythrina speciosa* (Leguminosae, Faboideae). *Bioikos* 24, 13–19.

Pammel, L. H. 1899. Anatomical characters of the seeds of leguminosae, chiefly genera of gray’s manual. St. Louis, St. Louis.

Popiginis, F. 1985. Fisiologia da Semente. Sília, Brasília.

Probert, R. J. 2000. The Role of Temperature in the Regulation of Seed Dormancy and Germination, in: Fenner, M. (Ed.), *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CAB International.

Ramsay, G. 1997. Inheritance and linkage of a gene for testa-imposed seed dormancy in faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Breed.* 289, 287–290.

Reeve, R. M. 1946. Ontogeny of the Sclereids in the Integument of *Pisum sativum* L. *Am. J. Bot.* 33, 806–816.

Roberts, E. H. 1973. Predicting the storage life seeds. *Seed Sci. Res.* 1, 499–514.

Rolston, M. P. 1978. Water impermeable seed dormancy. *Bot. Rev.* 44, 365–396.

Santos, I. R. I. 2000. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Rev. Brasileira Fisiol. Veg.* 12, 70–84.

Smýkal, P., Vernoud, V., Blair, M. W., Soukup, A., Thompson, R. D. 2014. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Front. Plant Sci.* 5, 351.

Souza, F. H. D., Marcos-Filho, J. 2001. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Rev. Brasileira de Botânica* 24, 365–375.

Tucker, S. C. 2003. Update on Floral Development Floral Development in Legumes. *Plant Physiol.* 131, 911–926.

Van Dongen, J. T., Ammerlaan, A. M. H., Wouterlood, M., Van Aelst, A. C., Borstlap, A. C. 2003. Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. *Ann. Bot.* 91, 729–737.

Vitali-Veiga, M. J., Machado, V. L. L. 2000. Visitantes florais de *Erythrina speciosa* Andr. (Leguminosae). *Rev. Brasileira Zool.* 17, 369–383.

Werker, E. 1981. Seed dormancy as explained by the anatomy of embryo envelopes. *Isr. Jour. Bot.* 29, 22–44.

Willis, C. G., Baskin, C. C., Baskin, J. M., Auld, J. R., Venable, D. L., Cavender-Bares, J., Donohue, K., de Casas, R. R., Bradford, K., Burghardt, L., Kalisz, S., Meyer, S., Schmitt, J., Strauss, S., Wilczek, A. 2014. The evolution of seed dormancy: Environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytol.* 203, 300–309.