

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS

**CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS, FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS  
DE SEMENTES DE *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* (Willd.) Benth  
(FABACEAE-MIMOSOIDEAE) SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS**

**RONISCLEY PEREIRA SANTOS**

**Manaus-AM  
Janeiro, 2012**

**RONISCLEY PEREIRA SANTOS**

**CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS, FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS  
DE SEMENTES DE *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* (Willd.) Benth  
(FABACEAE-MIMOSOIDEAE) SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS**

**Orientador: Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves**

Tese apresentada ao PPG-CFT do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências de Florestas Tropicais, área de concentração: Ecofisiologia Florestal.

**Manaus-AM**

**Janeiro, 2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Roniscley Pereira

Características morfoanatômicas, fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* (Willd.) Benth (Fabaceae-Mimosoideae) submetidas a diferentes temperaturas/ Roniscley Pereira Santos – Manaus: [sn], 2011.

Tese (doutorado) INPA, Manaus, 2011.

Orientador: José Francisco de Carvalho Gonçalves

Área de concentração: Ecofisiologia Florestal

Vegetal  
1. *Parkia multijuga* 2. *Parkia pendula* 3. Anatomia Vegetal 4. Morfologia

5. Reservas Orgânicas. I Título

CDD

### Sinopse:

Atributos morfoanatômicos, fisiológicos e bioquímicos de sementes de *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* (Willd.) Benth foram investigados durante a germinação sob diferentes temperaturas. Morfoanatomia, germinação e mobilização dos metabólitos primários foram analisados com objetivo de verificar as alterações estruturais e funcionais nas sementes durante o processo germinativo.

**Palavras-chave:** Fisiologia da germinação, sementes florestais e mobilização de reservas.

Ao SENHOR Deus de bondade pelo dom da vida e amparo em todos os momentos de minha vida.

A toda minha família querida, pelo incentivo, apoio e confiança. Em especial à minha mãe Alexandrina, meu pai José (*in memoriam*), minha irmã Rute e aos meus irmãos Raimundo e Reginaldo.

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais (PPG-CFT), pela oportunidade de realização deste trabalho e experiências adquiridas.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento desta pesquisa por meio do Programa de Colaboração Acadêmica (CAPES/PROCAD).

Ao meu orientador Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves, pela amizade, sabedoria, paciência e humildade no momento da orientação para execução do estudo, pelas críticas construtivas, pelas oportunidades oferecidas e, principalmente, pela valiosa contribuição ao meu aprendizado, o qual refletirá em toda minha carreira profissional.

Ao Dr. Eduardo Euclides de Lima e Borges da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela parceria no projeto CAPES/PROCAD e pela oportunidade de desenvolver parte das análises em seu laboratório.

A equipe do Laboratório de Semente Florestais da UFV, em especial ao técnico José Mauro pela amizade, disponibilidade e ajuda fundamental na execução das análises.

A Dra. Maria Silvia de Mendonça da Universidade Federal do Amazonas e aos membros do Laboratório de Botânica Florestal (LABAF - UFAM), pelo apoio nas análises anatômicas e histoquímicas. Em especial ao amigo Manoel pela importante ajuda.

À Sheylla Fontes pelos ensinamentos em morfologia de sementes e contribuição ao meu aprendizado.

A minha namorada Keyth Priscila pelo apoio, companheirismo, carinho e compreensão em todos os momentos.

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (INPA/LFBV), em especial a Larissa, Carlos, Marciel e Gilberto, pela ajuda, conversas enriquecedoras e momentos de descontração.

Aos amigos que passaram pelo LFBV, Glaudecy, Eneida e Bariani, pela amizade e convívio harmonioso.

A todos (as) da secretaria do PPG-CFT Ana Clycia, Jamile, Lira, Valdecira e seu Alcione pelo apoio e amizade.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

**Meus sinceros agradecimentos.**

## RESUMO

Estudo de espécies florestais nativas envolvendo análise de sementes tem merecido atenção no meio científico, seja por consequência da destruição e degradação dos ecossistemas brasileiros, seja visando à obtenção de informações que expressem a qualidade fisiológica das sementes e suas potenciais aplicações. Tecnicamente sabe-se que o sucesso no estabelecimento de uma espécie deve-se ao fato de suas sementes germinarem de forma rápida e uniforme, vencendo a concorrência com as demais espécies ou tendo a capacidade de se manter viável por longos períodos até que as condições tornem-se favoráveis à germinação e ao desenvolvimento inicial das plântulas. Para tanto, a fonte de energia dos processos vitais e da formação de novos tecidos é resultante da mobilização de reservas contidas nas sementes. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar e comparar os atributos morfoanatômicos, fisiológicos e bioquímicos de sementes quiescentes de *Parkia multijuga* e *Parkia pendula*, assim como investigar o efeito da temperatura na germinação e mobilização de suas reservas. Para isso, foram desenvolvidas as seguintes atividades: I) caracterização morfológica das sementes (biometria e descrição das características externas e internas da semente), II) determinação do grau de umidade, III) caracterização anatômica e histoquímica das diferentes estruturas da semente, IV) fisiologia da germinação, V) caracterização bioquímica de carboidratos, lipídeos e proteínas e seus respectivos desdobramentos (ácidos graxos, fracionamento de proteínas e eletroforese monodimensional), no intuito de elucidar as alterações estruturais e funcionais ocasionadas durante a germinação. Os resultados evidenciaram que as espécies apresentam padrões morfológicos distintos e que temperaturas constantes entre 25 a 30°C para *P. pendula* e 30 a 35°C para *P. multijuga*, favorecem maior porcentagem de germinação das sementes, com maior índice de velocidade em menor intervalo de tempo. Dentre os metabólitos primários, os carboidratos na forma de amido, correspondem quantitativamente às reservas mais estocadas nos cotilédones de sementes da espécie *Parkia multijuga*, ao passo que as proteínas são acumuladas em maior quantidade em cotilédones de sementes de *Parkia pendula*. As espécies apresentam concentrações distintas de açúcares solúveis totais, lipídeos totais, proteínas totais e no perfil protéico e similaridade na composição dos ácidos graxos e na composição das proteínas. Diante dos resultados obtidos para os metabólitos analisados nesta investigação, verificou-se que apesar de pertencerem à mesma família e sub-família botânica, as espécies estudadas apresentam estratégias distintas na utilização das reservas orgânicas estocadas em seus cotilédones.

## ABSTRACT

Studies involving seeds of native species analysis has received attention in the scientific community, whether as result of destruction and degradation of brazilian ecosystems, or aiming attainment of information that reflect seeds physiological quality and their potential applications. Technically it is known that the success in the establishment of a species is related to the fact that their seeds can germinate rapidly and uniformly, winning the competition to other species or being able to remain viable for long periods until the conditions become favorable to germination and initial seedlings development. To this end, the energy source of vital processes and new tissues formation results of seeds reserves mobilization. In this sense, this study aimed to investigate and compare morphological, physiological and biochemical attributes of quiescent seeds of *Parkia multijuga* and *Parkia pendula*, as well as to investigate the effect of temperature on germination reserves mobilization. Thus, the following activities were developed: I) seeds morphological characterization (seed biometry and external and internal description), II) determination of the moisture content, III) anatomical and histochemical characterization of seed different structures, IV) germination physiology, V) biochemical characterization of carbohydrates, lipids and proteins and their developments, respectively (fatty acids, protein fraction and one-dimensional electrophoresis), in order to elucidate the structural and functional alterations caused during germination. Results showed that species have distinct morphological patterns and that constant temperatures between 25 to 30 ° C for *P. pendula* and 30 to 35 ° C for *P. multijuga* favor higher percentage of seed germination, with the highest speed in a shorter period of time. Among the primary metabolites, carbohydrates as starch, correspond quantitatively to more stored reserves in the *P. multijuga* cotyledons seeds, while proteins are accumulated in greater quantities in *P. pendula* cotyledons seeds. The species have different concentrations of total soluble sugars, total lipids, total protein and protein profile while present similarity in fatty acids and proteins composition. Considering the results obtained for the metabolites analyzed in this investigation, was verified that despite belonging to the same botanical family and subfamily, these species have different strategies in the use of organic reserves stored in their cotyledons.

(CNPq / CAPES / INPA)

## Lista de figuras

### Capítulo I

**Figura 1.** Aspectos morfológicos da semente de *Parkia multijuga* Benth. **A, B** – Aspecto geral da semente; **C** – Detalhe do hilo; **D** – Aspecto da semente hidratada, evidenciando o aumento de volume comparado a semente desidratada; **E** – Embrião; **F** – Detalhe da plúmula bem desenvolvida, evidenciando os primórdios foliares diferenciados. **ct** – cotilédone, **nc** – nó cotiledonar, **eh** – eixo hipocótilo-radícula, **ep** – epicótilo, **hi** – hilo, **pl** – plúmula, **rd** – radícula, **sd** – semente desidratada, **sh** – semente hidratada, **te** – tegumento externo (testa).-19

**Figura 2.** Aspectos morfológicos da semente de *Parkia pendula* (Willd.) Benth. Ex. Walp.. **A, B** – Aspecto geral da semente; **C** – Detalhe do hilo; **D** – Detalhe do pleurograma a 90%, com linhas de tamanhos diferentes; **E** – Aspecto da semente hidratada, evidenciando o aumento de volume comparado a semente desidratada; **F** – Embrião; **G** – Detalhe do eixo hipocótilo-radícula com plúmula bem desenvolvida. **ct** – cotilédone, **nc** – nó cotiledonar, **ep** – epicótilo, **hi** – hilo, **hp** – hipocótilo, **pl** – plúmula, **rd** – radícula, **sd** – semente desidratada, **sh** – semente hidratada, **te** – tegumento externo (testa).-----20

**Figura 3:** Aspectos gerais das características anatômicas dos tegumentos (A e B), cotilédones (C e D) e embriões (E, F e G) de sementes de *Parkia multijuga* (A, C e E) e *P. pendula* (B, D, F e G). Legenda: **Ad** – adaxial, **Pp** – parênquima paliçádico, **lc** – linha lúcida, **ot** – osteosclereíde, **Pe** – parênquima esponjoso ou lacunoso, **Ab** – abaxial, **Co** – cotilédone, **cpc** – cordão procambial, **pl** – plúmula, **ehr** – eixo hipocótilo radícula, **ar** – ápice radicular.-----27

**Figura 4:** Testes histoquímicos em estruturas de sementes de *Parkia multijuga* submetidas a distintos corantes e reagentes. **A)** Cotilédone: branco (sem corantes ou reagentes); **B)** Cotilédone: Xylidine Ponceau (cor vermelha: vista geral das proteínas totais); **C)** Cotilédone: Xylidine Ponceau (cor vermelha: detalhe dos corpos proteicos), **cp** – corpos proteicos; **D)** Embrião: Xylidine Ponceau (cor vermelha: proteínas totais), **cp** – corpos protéicos; **E)** Cotilédone: Sudan III (cor laranja: lipídeos totais), **cl** - corpos lipídicos; **F)** Tegumento: vermelho de rutênio (cor violeta arroxeadado: pectinas), **pec** – pectina.-----30

**Figura 5:** Testes histoquímicos em estruturas de sementes de *Parkia pendula* submetidas a diferentes corantes e reagentes. **A)** Tegumento: branco (sem corantes ou reagentes); **B)** Cotilédone: Xylidine Ponceau (cor vermelha: proteínas totais), **cp** – corpos protéicos; **C)**



Embrião: Xylidine Ponceau (cor vermelha: proteínas totais), **cp** – corpos protéicos; **D)** Cotilédone: Sudan III (cor laranja: lipídeos totais), **cl** - corpos lipídicos; **E)** Embrião: Sudan III (cor laranja: lipídeos totais), **cl** - corpos lipídicos; **F)** Tegumento: vermelho de rutênio (cor violeta arroxeado: pectinas), **pec** – pectina.-----31

**Figura 6:** Concentração de metabólitos primários em cotilédones de sementes quiescentes de duas espécies arbóreas da flora amazônica. AST - açúcares solúveis totais. \*Nitrogênio total x 5,71 = proteínas totais. Letras comparam os metabólitos primários entre as espécies pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.-----32

**Figura 7:** Conteúdo de ácidos graxos em cotilédones de sementes quiescentes de duas espécies arbóreas da flora amazônica. Barras significam Desvio Padrão.-----34

**Figura 8** – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% das frações globulínicas. M: Marcadores de massa molecular, Promega. 1: Cotilédone de semente quiescente de *Parkia pendula*. 2: Cotilédone de semente quiescente de *Parkia multijuga*.-----37

## Capítulo II

**Figura 1** – Porcentagem de germinação de sementes de *Parkia multijuga* e *Parkia pendula* (Fabaceae-Mimosoideae) submetidas a diferentes temperaturas.-----54

**Figura 2** – Tempo médio de germinação (TMG) de sementes de *Parkia multijuga* e *Parkia pendula* (Fabaceae-Mimosoideae) submetidas a diferentes temperaturas.-----55

**Figura 3** – Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Parkia multijuga* e *Parkia pendula* (Fabaceae-Mimosoideae) submetidas a diferentes temperaturas.-----56

**Figura 4** – Aspectos morfológicos da germinação de sementes de *Parkia multijuga* Benth (Fabaceae-Mimosoideae). **A** – semente quiescente, **B** – Protrusão da raiz (7 dias), **C** – Alongamento radicular (9 dias), **D** – Alongamento do epicótilo e expansão das primeiras folhas (12 dias), **E** – Plântula completamente formada (16 dias). Legenda: tg – tegumento, eo – eófilo, epi – epicótilo, co – cotilédones, hip – hipocótilo, rp – raiz primária, rs – raiz secundária.-----58

**Figura 5** – Estádios de desenvolvimento de plântulas de *Parkia multijuga* Benth (Fabaceae-Mimosoideae), germinadas em bandeja plástica contendo vermiculita como substrato e incubadas sob temperatura de 30°C durante 25 dias. **A** – semente quiescente embebida, **B** – Protrusão da raiz (7 dias), **C** – Alongamento radicular (9 dias), **D** – Surgimento de raízes secundárias (10 dias), **E** – Alongamento do epicótilo e expansão das primeiras folhas (12 dias), **F** – Plântula completamente formada (16 dias).-----58

**Figura 6** – Aspectos morfológicos da germinação de sementes de *Parkia pendula* (Willd.) Benth. (Fabaceae-Mimosoideae): **A** – semente quiescente, **B** – Protrusão da raiz (3 dias), **C** – Alongamento radicular (5 dias), **D** – Gancho plumular (6 dias), **E** – Alongamento do hipocótilo (7 dias), **F** – Abertura dos cotilédones (8 dias), **G** – Plântula completamente formada (9 dias). Legenda: tg – tegumento, eo – eófilo, epi – epicótilo, co – cotilédones, hip – hipocótilo, rp – raiz primária, rs – raiz secundária.-----60

**Figura 7** – Estádios de desenvolvimento de plântulas de *Parkia pendula* (Willd.) Benth (Fabaceae-Mimosoideae), germinadas em bandeja plástica contendo vermiculita como substrato e incubadas sob temperatura de 30°C durante 25 dias. **A** – semente quiescente embebida, **B** – Protrusão da raiz (3 dias), **C** – Alongamento radicular (5 dias), **D** – Gancho plumular (6 dias), **E** – Abertura dos cotilédones com alongamento do hipocótilo (7 dias), **F** – Plântula completamente formada (9 dias).-----60

### Capítulo III

**Figura 1:** Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) em cotilédones de sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação (dia). Controle: semente quiescente; A: 5 dias após semeadura (DAS); B: 10 DAS; C: 15 DAS e D: 20 DAS.-----76

**Figura 2:** Conteúdo de amido em cotilédones de sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação (dia). Controle: semente quiescente; A: 5 dias após semeadura (DAS); B: 10 DAS; C: 15 DAS e D: 20 DAS.-----78

**Figura 3:** Conteúdo de lipídeos em cotilédones de sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação (dia). Controle: semente quiescente; A: 5 dias após semeadura (DAS); B: 10 DAS; C: 15 DAS e D: 20 DAS.-----81

- Figura 4:** Conteúdo de ácido mirístico em cotilédones de sementes de *P. multijuga* submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação.-----82
- Figura 5:** Conteúdo de ácido palmítico em cotilédones de sementes de *P. multijuga* (A e C) e *P. pendula* (B e D) submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação (dia).-----83
- Figura 6:** Conteúdo de ácido linoléico em cotilédones de sementes de *P. multijuga* (A e C) e *P. pendula* (B e D) submetidas a diferentes temperaturas e tempos de germinação (dia).-----84
- Figura 7:** Conteúdo de proteínas totais em cotilédones de sementes de *P.a multijuga* e *P. pendula* submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação (dia). Nitrogênio total x 5,71 = proteínas totais. Controle: semente quiescente; A: 5 dias após semeadura (DAS); B: 10 DAS; C: 15 DAS e D: 20 DAS.-----87
- Figura 8:** Fracionamento de proteínas de reserva em sementes quiescentes e submetidas a diferentes temperaturas e tempos de germinação de *P. multijuga* (A, C e E) e *P. pendula*, duas espécies florestais pertencentes à família Fabaceae-Mimosoideae.-----89
- Figura 9:** Fracionamento de proteínas de reserva em sementes quiescentes e submetidas a diferentes temperaturas e tempos de germinação de *P. multijuga* (A, C e E) e *P. pendula* (B, D e F), duas espécies florestais pertencentes à família Fabaceae-Mimosoideae.-----90
- Figura 10:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% das frações globulínicas em cotilédones de sementes quiescentes e durante a germinação de *P. pendula* e *P. multijuga*. M: Marcadores de massa molecular, Promega. 1: Semente quiescente de *P. pendula*. 2: Cotilédones de *P. pendula* no estágio de emissão da radícula quando submetidas à germinação a 25°C. 3: Cotilédones de *P. pendula* no estágio de emissão da radícula quando submetidas à germinação a 40°C. 4: Semente quiescente de *P. multijuga*. 5: Cotilédones de *P. multijuga* no estágio de emissão da radícula quando submetidas à germinação a 25°C. 6: Cotilédones de *P. multijuga* no estágio de emissão da radícula quando submetidas à germinação a 40°C.-----93

## Lista de tabelas

### Capítulo I

**Tabela 1.** Características biométricas e grau de umidade de sementes de duas espécies florestais pertencentes à família Fabaceae (n=100).-----21

**Tabela 2.** Características micromorfométricas das estruturas anatômicas do tegumento de sementes de duas espécies florestais Fabaceae-Mimosoideae.-----25

**TABELA 3:** Teste histoquímico aplicado em estruturas das sementes quiescentes de *P. multijuga* e *P. pendula* (+ presença, - ausência; o número de sinais expressa a intensidade da reação).-----26

**Tabela 4.** Fracionamento de proteínas de reserva em sementes quiescentes de duas espécies florestais pertencentes à família Fabaceae-Mimosoideae. Letras comparam as médias nas colunas pelo teste t de student a 5% de probabilidade.-----33

### Capítulo II

**Tabela 1** - Fisiologia da germinação de duas espécies arbóreas Fabaceae-Mimosoideae submetidas a diferentes temperaturas. Germinação (G%), tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG). -----49

### Capítulo III

**Tabela 1.** Fracionamento de proteínas de reserva em sementes quiescentes de duas espécies florestais pertencentes à família Fabaceae-Mimosoideae. Letras comparam as médias nas colunas pelo teste t de student a 5% de probabilidade.-----84

## Sumário

RESUMO-----	i
ABSTRACT-----	ii
LISTA DE FIGURAS -----	iii
LISTA DE TABELAS-----	vii
1. INTRODUÇÃO-----	1
2. OBJETIVOS-----	4
2.1. Objetivo geral-----	4
2.2. Objetivo específico-----	4
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	5
<b>CAPÍTULO I-----</b>	<b>8</b>
CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E BIOQUÍMICA DE SEMENTES QUIESCENTES DE <i>Parkia multijuga</i> Benth e <i>Parkia pendula</i> (Willd.) Benth (FABACEAE-MIMOSOIDEAE)	
RESUMO -----	8
1. INTRODUÇÃO-----	9
2. MATERIAL E MÉTODOS-----	12
2.1. Material vegetal-----	12
2.1. Procedência do material biológico-----	12
2.2. Caracterização morfológica-----	12
2.2.1. Biometria das sementes-----	12
2.2.2. Morfologia das sementes-----	13
2.3. Grau de umidade-----	13
2.4. Testes histoquímicos-----	13
2.5. Caracterização anatômica-----	14
2.6. Análises dos componentes do metabolismo primário-----	14
2.6.1. Extração de lipídeos-----	14
2.6.2. Quantificação de ácidos graxos-----	15
2.6.3. Extração de carboidratos-----	15

2.6.4. Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e amido-----	15
2.6.5. Determinação do nitrogênio total-----	16
2.6.6. Fracionamento de proteínas-----	16
2.6.7. Eletroforese em SDS-PAGE-----	17
2.6.8. Análises estatísticas -----	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	18
3.1. Caracterização da morfologia externa e interna da semente-----	18
3.2. Biometria e grau de umidade-----	22
3.3. Análises anatômicas e histoquímicas-----	24
3.3.1. Anatomia das estruturas da semente-----	24
3.3.2. Histoquímica dos metabólitos primários-----	27
3.4. Análises bioquímicas dos metabólitos primários-----	31
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE-----	36
4. CONCLUSÃO-----	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	39

## **CAPÍTULO II-----46**

### CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Parkia multijuga* Benth E *Parkia pendula* (Willd.) Benth SOB NÍVEIS CRESCENTES DE TEMPERATURA

RESUMO -----	46
1. INTRODUÇÃO-----	47
2. MATERIAIS E MÉTODOS-----	49
2.1. Procedência do material biológico-----	49
2.2. Instalação do experimento-----	49
2.2.1. Teste de germinação-----	49
2.2.2. Morfologia da germinação-----	50
2.3. Delineamento experimental-----	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	52
3.1. Teste de germinação-----	52
3.2. Aspectos da germinação-----	57

4. CONCLUSÃO-----	61
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	62
<b>CAPÍTULO III-----</b>	<b>66</b>
MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE <i>Parkia multijuga</i> BENTH E <i>Parkia pendula</i> SUBMETIDAS A DIFERENTES REGIMES DE TEMPERATURA	
RESUMO -----	66
1. INTRODUÇÃO-----	68
2. MATERIAIS E MÉTODOS-----	70
2.1. Procedência do material biológico-----	70
2.2. Instalação do experimento-----	70
2.3. Análises dos compostos do metabolismo primário-----	70
2.3.1. Extração de lipídeos-----	71
2.3.2. Quantificação de ácidos graxos-----	71
2.3.3. Extração de carboidratos-----	71
2.3.3.1. Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e amido-----	72
2.3.4. Determinação do nitrogênio total-----	72
2.3.5. Fracionamento de proteínas-----	73
2.3.6. Eletroforese em SDS-PAGE-----	73
2.4. Delineamento experimental e análise estatística-----	74
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----</b>	<b>75</b>
3.1. Açúcares solúveis totais (AST)-----	75
3.2. Amido-----	77
3.3. Lipídeos totais-----	79
3.4. Perfil dos ácidos graxos-----	81
3.5. Proteínas totais-----	85
3.6. Fracionamento de proteínas-----	87
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE-----	91
4. CONCLUSÃO-----	94
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	96

## 1. Introdução

A germinação de sementes é um processo biológico que envolve um grande número de reações químicas, pelas quais compostos orgânicos são desdobrados e reorganizados, de maneira a permitir o desenvolvimento do eixo embrionário, suas diversas etapas decorrem sobre temperaturas específicas ao processo metabólico e enzimático (Kageyama *et al.*, 1978; Malavasi, 1988; Rahman *et al.* 2011).

No entanto, é válido salientar que antes mesmo do metabolismo atingir seu nível pleno, várias alterações de caráter estrutural já se processaram, implicando mudanças morfológicas e anatômicas que coordenadamente também fazem parte do processo germinativo, inclusive sinalizando as primeiras mudanças funcionais quando de fato os fatores água, luz, oxigênio e temperatura são fornecidos dentro das faixas adequadas para as espécies em estudo.

Considerando que o efeito da temperatura sobre a germinação tem especial importância para a ecologia de populações, assim como sabe-se que para sementes serem capazes de germinar, suas temperaturas cardiais devem corresponder às condições externas que asseguram um desenvolvimento suficientemente rápido para as plantas jovens (Borges, 2003; Perez, 2004). A maior parte das sementes quiescentes quando não manifestaram algum tipo de dormência, apresentaram máximas germinabilidade e velocidade de germinação entre 20 e 30°C, algumas entre 30 e 35°C (Borghetti, 2005; Rahman *et al.*, 2011). Assim, o efeito da temperatura na germinação das sementes pode ser expresso em termos de temperaturas cardiais que são mínima, máxima e ótima (Bewley & Black, 1982; Malavasi, 1988).

No que diz respeito à fisiologia da germinação, a temperatura pode interferir na velocidade de absorção de água e também nas reações bioquímicas, que determinam todo o processo metabólico e, em consequência de suas alterações, afeta tanto a velocidade e uniformidade de germinação, como a germinação total (Carvalho & Nakagawa, 2000). Sementes de plantas cultivadas nos trópicos e subtropicais, apresentam temperaturas ótimas que vão da faixa de 20°C-30°C (Borges & Rena, 1993).

No que concerne às sementes, sabe-se que as mesmas são os principais propágulos para a reprodução da maioria das espécies lenhosas, e suas características morfológicas externas são importantes para auxiliar na identificação da família, gênero e espécie, além de poder ajudar nos estudos de germinação, armazenamento e dos métodos de cultivo (Oliveira *et al.*, 2006).



Atualmente, há crescente interesse na caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de espécies nativas (Amorim *et al.* 2006; Ramos & Ferraz 2008; Paiva Sobrinho & Siqueira 2008; Paoli & Bianconi 2008; Cosmo *et al.* 2009; Nogueira *et al.* 2010; Lopes *et al.* 2010). Os estudos morfoanatômicos fornecem informações para a identificação botânica das espécies, auxiliam na interpretação dos testes de germinação em laboratório, orientam quanto ao armazenamento de sementes e métodos de cultivo, além de facilitarem o reconhecimento das espécies em banco de sementes no solo (Donadio & Demattê 2000). Ademais, quando estes estudos são associados às investigações de cunho funcionais espera-se que haja entendimento mais robusto sobre os tecidos, órgãos e organismos como um todo.

Além dos atributos morfológicos das sementes e plântulas, características dos cotilédones como tamanho, função e posição no desenvolvimento inicial de plântulas podem ser decisivos na captura de recursos ambientais, os quais podem contribuir para diminuição da mortalidade e aumentar o “fitness” (Ibarra-Manríquez *et al.* 2001). Este conjunto de características, que representa a morfologia e a anatomia da germinação, recebeu atenção especial no sentido de compreender o significado ecológico da história de vida das plantas (Garwood 1983; Miquel 1987; Garwood 1996).

As plantas apresentam diferentes estratégias de adaptação às alterações dos fatores bióticos e abióticos no meio em que habitam. Diante disto, o acúmulo de compostos de reserva em sementes representa parte importante do processo. Estas substâncias são utilizadas durante a germinação e, posteriormente, metabolizadas para o crescimento e desenvolvimento inicial das plântulas. São atribuídos diferentes propósitos para estas substâncias de reserva, como a geração de energia e a produção de novas biomoléculas para a construção de novos tecidos e células até a plântula se tornar um organismo autotrófico (Buckeridge *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2009).

De maneira geral, informações científicas sobre a composição química de sementes são úteis para a compreensão de sua fisiologia e obtenção de novos produtos a partir de reservas estocadas, como as proteínas em sementes de espécies leguminosas (Vitale & Bollini, 1995), os carboidratos que além do seu papel central no metabolismo também regulam muitos outros processos fisiológicos (Gibson, 2004) e lipídeos em alta proporção nas sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, desempenhando uma possível vantagem adaptativa à espécie (Corte *et al.*, 2006).

A composição química das sementes bem como as alterações no conteúdo de carboidratos, lipídeos e proteínas durante a germinação, crescimento inicial e desenvolvimento de plântulas tem suas concentrações alteradas, desde o período pré-

germinativo até a total senescência e abscisão dos cotilédones (Suda & Giorgini, 2000; Corte *et al.*, 2006).

Para se investigar a efetiva participação de fatores externos, como temperatura e tempo de germinação sobre as alterações morfoanatômicas, fisiológicas e metabólicas em sementes de duas espécies florestais (*Parkia multijuga* e *Parkia pendula*) foram implementados experimentos que se destinaram a estudar mudanças estruturais e funcionais durante o processo germinativo. Nesta tese três capítulos representam o estudo comparativo de duas espécies de Fabaceae pertencentes ao mesmo gênero botânico:

Capítulo I - Caracterização morfoanatômica, histoquímica e bioquímica de sementes quiescentes de *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* (Willd.) Benth (Fabaceae-mimosoideae)

Capítulo II - Características morfológicas e fisiológicas da germinação de sementes de *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* (Willd.) Benth sob níveis crescentes de temperatura.

Capítulo III - Mobilização de reservas durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* submetidas a diferentes regimes de temperatura.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo geral

Investigar e comparar os atributos morfológicos, anatômicos, fisiológicos e bioquímicos de sementes de *Parkia multijuga* e *Parkia pendula*, destacando as características da germinação e mobilização das reservas orgânicas (carboidratos, lipídeos e proteínas) sob níveis crescentes de temperatura.

### 1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a morfoanatomia, a composição bioquímica e a localização dos principais grupos de reserva nas diferentes estruturas de sementes quiescentes de *Parkia multijuga* e *Parkia pendula*;
- Analisar as características germinativas de sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* sob elevação da temperatura;
- Investigar a influência da temperatura na mobilização dos carboidratos, lipídeos e proteínas em sementes de *P. multijuga* e *P. pendula*.

## 2. Referências bibliográficas

- Amorim, I.L.; Ferreira, R.A.; Davide; A.C.& Chaves. M.M.F. 2006. Aspectos morfológicos de plântulas e mudas de trema. *Revista Brasileira de Sementes* 28: 86-91.
- Bewley, J.D. & BLACK, M. 1982. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. New York: Springer-Verlag, 375 p.
- Borghetti, F. Temperaturas extremas e a germinação das sementes. In: Nogueira, R. J.M.C. et al. (Eds.) Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. Recife: UFRPE, 2005. 499 p.
- Borges, E.E.L. & Rena, A.B. 1993. Germinação de sementes. In: Aguiar, I.B.; Piña-Rodrigues, F.C.M.; Figliolia, M.B. *Sementes florestais tropicais*. Brasília: ABRATES, 350 p.
- Borges, E.E.L. 2003. Comportamento bioquímico e fisiológico de sementes florestais nativas durante a embebição. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 107 pp.
- Buckeridge, M.S.; Tiné, M.A.S.; Santos, dos H.P.; Lima, DU. de. 2000. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12 (Edição Especial): 137162.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J. 2000. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p.
- Corte, V.B.; Borges, E.E.L.; Pontes, C.A.; Leite, I.T.A.; Ventrella, M.C. & Mathias, A.A. 2006. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *R. Árvore*, Viçosa-MG, v.30, n.6, p.941-949.
- Cosmo, N.L.; Gogosz, A.M.; Nogueira, A.C.; Bona, C. & Kuniyoshi, Y.S. 2009. Morfologia do fruto, da semente e morfo-anatomia da plântula de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (Lamiaceae). *Acta Botanica Brasílica* 23: 389-397.
- Donadio, N.M.M.; Dematte, M.E.S.P. 2000. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) e jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. Ex. Benth)-Fabaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.22, n.1, p.64-73.
- Garwood, N.C. 1983. Seed germination in a seasonal tropical forest in Panama: a community study. *Ecological monographs* 53: 159-181.

- Garwood, N.C. 1996. Functional morphology of tropical tree seedlings. Pp. 59-129. In: Swaine, M.D. (ed.). The ecology of tropical forest tree seedlings. Paris, Unesco.
- Gibson, S.I. 2004. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J. Exp. Bot.* 55:253-264.
- Ibarra-Manríquez, G.; Ramos, M.M. & Oyama, K. 2001. Seedling functional types in a lowland rain Forest in Mexico. *American Journal of Botany* 88: 1801-1812.
- Kageyama, P.Y.; Castro, C.E.F. & Márquez, F.C.M. 1978. Efeito da temperatura na germinação de sementes de pau-rei (*Sterculia striata*). *Silvicultura*, São Paulo, v. 2, n. 14, p. 339-342.
- Lopes, R.M.F.; Freitas, V.L.O. & Lemos Filho, J.P. 2010. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Plathymenia reticulata* Benth. e *Plathymenia foliolosa* Benth. (Fabaceae - Mimosoideae). *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.34, n.5, p.797-805.
- Malavasi, M.M. 1988. *Germinação de sementes*. In: Piña-Rodrigues, F.C.M. Manual de análise de sementes florestais. Campinas: Fundação Cargill, p.25-40. Cap.3.
- Miquel, S. 1987. Morphologie fonctionnelle de plantules d'espèces forestières du Gabon. *Bulletin du Muséum National d' Histoire Naturelle* 9:101-121.
- Melo, Z.L. de O.; Gonçalves, J.F. de C.; Mazzafera, P. & Santos, D.Y.A.C. dos. 2009. Mobilization of seed reserves during germination of tropical species of the Amazon Rainforest. *Seed Sci. & Technol.*, 37, 597-607.
- Nogueira, F.C.B.; Filho, S.M. & Gallão, M.I. 2010. Caracterização da germinação e morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Dalbergia cearensis* Ducke (pau-violeta) – Fabaceae. *Acta bot. bras.* 24(4): 978-985.
- Oliveira, A.K.M.; Schleder, E.D.; Favero, S. 2006. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. *Revista Árvore*, v.30, n.1, p.25-32.
- Paiva Sobrinho, S. & Siqueira, A.G. 2008. Caracterização morfológica de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam. – Sterculiaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.30: 114-120.
- Paoli, A.A.S. & Bianconi, A. 2008. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pseudima frutescens* (Aubl.) Radlk. (Sapindaceae). *Revista Brasileira de Sementes* 30: 146-155.
- Perez, S.C.J.G. de A. 2004. Envoltórios. In: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. (Orgs). *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p. 31-50.

- Rahman, Md.M; Ahammad, K.U. & Alam, Md.M. 2011. Effect of soaking condition and temperature on imbibition rate of maize and chickpea seeds. *Research Journal of Seed Science*, 4(2): 117-124.
- Ramos, M.B.P. & Ferraz, I.D.K. 2008. Estudos morfológicos de frutos, sementes e plântulas de *Enterolobium schomburgkii* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae). *Revista Brasileira de Botânica* 31: 227-235.
- Suda, C.N.K. & Giorgini, J.F. 2000. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12(3): 226-245.
- Vitale, A.; Bollini, R. 1995. Legume Storage Proteins. In: Kigel, J.; Galili, G. (Eds). *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York. p. 73-102  
York: Plenum Press, 445 pp.

## CAPÍTULO I

### **CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E BIOQUÍMICA DE SEMENTES QUIESCENTES DE *Parkia multijuga* Benth. e *Parkia pendula* (Willd.) Benth. (FABACEAE-MIMOSOIDEAE)**

**RESUMO** – Caracterização morfoanatômica, histoquímica e bioquímica de sementes quiescentes de *Parkia multijuga* Benth. e *Parkia pendula* (Willd.) Benth. (Fabaceae-Mimosoideae). O conhecimento dos aspectos morfoanatômicos das estruturas das sementes fornecem características taxonômicas e filogenéticas importantes na identificação de espécies, assim como estudos ligados a composição bioquímica das sementes pode contribuir significativamente para o entendimento das características ecofisiológicas, como germinação, crescimento inicial das plantas e estabelecimento das espécies. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo investigar a caracterização morfoanatômica, histoquímica e bioquímica de sementes das espécies Fabaceae-Mimosoideae: *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* (Willd.) Benth. Para a descrição da morfologia foram realizadas observações das características externas e internas das sementes, com auxílio de lupa de mesa e estereomicroscópio. Amostras de cotilédones secos e pulverizados foram utilizadas para extração e quantificação dos metabólitos primários e seus respectivos desdobramentos. Sendo os lipídeos totais extraídos usando-se éter de petróleo, os carboidratos com etanol 80% e as proteínas conforme sua solubilidade. As sementes de *P. multijuga* são grandes, comprimento médio de 5 cm e com forma lanceolada, ao passo que, sementes de *P. pendula* são pequenas, comprimento médio de 1 cm, com forma elíptica. As espécies apresentaram grau de umidade e características morfoanatômicas dos cotilédones e embrião semelhantes. No que concerne à composição bioquímica, sementes de *P. multijuga* acumulam predominantemente carboidrato na forma de amido e *P. pendula* acumulam proteínas, como principais compostos de reservas nos cotilédones. Sendo que, *P. multijuga* apresentou duas bandas protéicas, uma com massa molecular em torno de 15 kDa e outra entre 30 e 50 kDa, ao passo que *P. pendula* apresentou uma banda protéica com massa molecular entre 30 e 50 kDa. Entretanto, ambas apresentaram composição das proteínas com predomínio da fração globulínica e lipídeos constituídos por ácidos graxos insaturados.

**Palavras-chave:** Morfologia, anatomia, sementes florestais, metabólitos primários.

## 1. INTRODUÇÃO

As Fabaceae representam família botânica que abrange no Brasil cerca de 200 gêneros e 1500 espécies presentes nos mais variados ecossistemas. É uma família vasta, cosmopolita e geologicamente antiga. Os trópicos são particularmente ricos em espécies herbáceas e lenhosas dessa família (Bukart, 1952; Muniz, 1986; Souza & Lorenzi, 2005). É de grande importância para a flora amazônica, cabendo-lhe o primeiro lugar entre os vegetais lenhosos, quanto ao número de gêneros e espécies, sendo ainda “uma das família mais naturais do sistema botânico” (Ducke, 1949). É a terceira maior família entre as plantas com flores (fanerógamas) de acordo com Lima *et al.*, (1994).

A delimitação taxonômica de Fabaceae é um tema bastante discutido e alguns autores como Lewis (1987), Judd *et al.*, (1999), Smith *et al.*, (2004) e Simpson (2006), admitem três subfamílias: Caesalpinioideae, Papilionoideae (Faboideae) e Mimosoideae. Das seis tribos que compreendem as Mimosoideae, as do gênero *Parkia* são consideradas plantas pantropicais que apresentam cerca de 30 espécies, metade destas ocorre nos neotrópicos de Honduras até o sudeste do Brasil (Hopkins, 1983; 1986). Entre as espécies florestais de potencial econômico pertencentes ao gênero *Parkia*, encontram-se a *Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp e *Parkia multijuga* Benth. A espécie *P. pendula* é popularmente conhecida como visgueiro, é uma árvore de dossel, apresenta copa plana, formando uma das mais distintas e bonitas formas em árvores da Amazônia. Tem ocorrência natural nos Estados do Pará, Amazonas, Acre, Mato Grosso, Rondônia e Maranhão (Souza *et al.*, 1997), sul da Bahia e norte do Espírito Santo, na floresta fluvial (Lorenzi, 2000). É amplamente usada na construção civil, embarcações, móveis, artigos domésticos e decorativos (Souza *et al.*, 1997), taboados, caixotaria, lâminas para compensados e canoas (Loureiro *et al.*, 2000). Pode ser empregada em plantios em áreas degradadas de preservação permanente, devido ao seu rápido crescimento em ambientes abertos (Lorenzi, 2000). Sua madeira tem características físicas e mecânicas favoráveis para uso comercial, promovendo alto índice de exploração da espécie, o que diminui consideravelmente os exemplares em sua área de ocorrência natural (Rosseto *et al.*, 2009).

Por sua vez, a espécie *Parkia multijuga*, conhecida popularmente como benguê, tucupí, paricá, visgueiro, faveira-benguê, arara-tucupí e faveira-pé-de-arara é uma espécie madeireira da Amazônica Central que ocorre na floresta de terra firme e várzea alta em solo argiloso (Hopkins, 1986). Essa planta de porte arbóreo (20-30m) floresce durante os meses de agosto-outubro e a maturação dos frutos verifica-se no período novembro-dezembro. Sua



madeira é usada principalmente na fabricação de compensados (Hopkins, 1986). Essa espécie apresenta produção anual moderada de sementes viáveis (Lorenzi, 1992). Suas sementes apresentam dormência física, imposta pelo tegumento duro e impermeável à água (Hopkins, 1986). São sementes grandes, com comprimento de até 6 cm e massa entre 3 e 9 g. Apresentam germinação do tipo hipógea e criptocotiledonar (Ferraz *et al.*, 2004).

Assim como a grande maioria das espécies florestais arbóreas da Amazônia, a semente é a principal forma de reprodução de ambas as espécies em questão. Desempenhando papel de fundamental importância para a dispersão e perpetuação destas espécies.

Do ponto de vista botânico, a semente é constituída basicamente pelo embrião, endosperma e pelo tegumento (Kerbaudy, 2004; Beltrati & Paoli, 2006). A grande variedade brasileira de espécies Magnoliophyta (Angiospermae) indica enorme quantidade de sementes, que variam em formato, tamanho e estrutura. A superfície da semente ou do tegumento também pode variar em cor e consistência ou textura; podem ocorrer tricomas e emergências (Souza & Paoli, 2009).

Durante a fase de maturação das sementes ocorre a expansão celular e a alocação de substâncias de reserva no endosperma ou cotilédone. Essas reservas consistem de compostos oriundos do metabolismo primário, considerados essenciais para a sobrevivência dos organismos (Kerbaudy, 2004). Desta forma, à medida que a semente vai se desenvolvendo há diminuição na quantidade destas substâncias mais simples e, ao mesmo tempo, acúmulo de moléculas maiores e mais complexas como as proteínas, amido, lipídios, celulose, etc. (Guimarães, 1999).

Os carboidratos, proteínas, lipídeos e minerais representam os principais materiais de reserva nas sementes. Eles determinam as características nutricionais, industriais e tecnológicas e, contribuem significativamente para as características ecofisiológicas, como germinação, crescimento inicial das plantas e estabelecimento das espécies (Gonçalves *et al.*, 2002; Buckeridge *et al.*, 2004).

A composição química do conteúdo e materiais de reserva pode variar bastante de espécie para espécie, mas eles são acumulados em organelas específicas que podem estar presentes em tecidos embrionários ou de reserva, como o endosperma, perisperma e/ou cotilédones (Bewley & Black, 1983; Buckeridge *et al.*, 2004).

Sementes de espécies florestais fornecem grande quantidade de características taxonômicas e filogenéticas, sendo as de emprego taxonômico as mais superficiais, mas os caracteres internos são de maior interesse na classificação (Souza & Oliveira, 2004). Características morfológicas das sementes, tanto externas quanto as internas são pouco

modificadas pelo ambiente, sendo, portanto, um critério bastante seguro para identificação de plantas ao nível de espécie (Gunn, 1972; Ramos & Ferraz, 2008). Aliado a esses fatos, o conhecimento das estruturas da semente torna-se de grande importância, pois é possível obter informações sobre a germinação, armazenamento, viabilidade e métodos de semeadura (Kuniyoshi, 1983; Araújo Neto *et al.*, 2002a; Donadio & Demattê, 2000).

Neste sentido, o conhecimento dos aspectos anatômicos das estruturas das sementes, associados a histoquímica, que é uma técnica que tem por objetivo localizar *in situ*, os principais grupos químicos que ocorrem nos tecidos, podem contribuir decisivamente para confirmação ou não das mudanças estruturais e funcionais decorrentes do processo germinativo ou influência do meio em curso. Como tal, a histoquímica associa à histologia, um aspecto químico, o da determinação da natureza das substâncias presentes nos tecidos e da sua localização de forma qualitativa (Figueiredo *et al.*, 2007). Com base nos resultados dos testes histoquímicos na localização e natureza das substâncias oriundas do metabolismo primário ou secundário, essas substâncias podem ser extraídas e quantificadas com eficiência pelos testes bioquímicos específicos para cada grupo de substâncias detectadas.

Portanto, diante de estratégias científicas tecnicamente possíveis e com crescente interesse pelo isolamento, caracterização estrutural e funcional e da prospecção de moléculas bioativas, torna-se relevante conhecer os aspectos relacionados a morfoanatomia, fisiologia, histoquímica e bioquímica de sementes de espécies Fabaceae arbóreas da Amazônia.

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo investigar a caracterização morfoanatômica, histoquímica e bioquímica de sementes das espécies Fabaceae-Mimosoideae: *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* (Willd.) Benth.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Material Vegetal

#### 2.1. Procedência do material biológico

Para realização dos experimentos foram utilizadas sementes das espécies florestais *Parkia multijuga* Benth. e *Parkia pendula* (Willd.) Benth., pertencentes a família Fabaceae e subfamília Mimosoideae, oriundas da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Km 26 da rodovia AM-010), pertencente ao Instituto de Pesquisas da Amazônia – INPA, com uma área de 100 km<sup>2</sup>, situada na periferia de Manaus, nas coordenadas de 03°08' S e 59°52' W. O clima da região é do tipo Afi de koppen, com temperatura média de 26°C (mínima 19 °C e máxima 39°C) e precipitação anual que varia de 1.800 mm a 2.000 mm (Luizão & Vasconcelos 2005).

Após a coleta os frutos foram acondicionados em sacos de polietileno e transportados para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV-INPA), local onde foi realizado o beneficiamento das sementes e instalação dos ensaios morfoanatômicos, germinativos e bioquímicos.

Neste trabalho foram desenvolvidas as seguintes atividades: I) caracterização morfológica das sementes (biometria e classificação das características externas e internas), II) determinação do grau de umidade, III) caracterização anatômica e histoquímica das diferentes estruturas da semente e IV) caracterização bioquímica dos metabólitos primários e seus respectivos desdobramentos (determinação de ácidos graxos, fracionamento de proteínas e eletroforese monodimensional).

### 2.2. Caracterização morfológica

#### 2.2.1. Biometria das sementes

As avaliações biométricas foram realizadas com auxílio de paquímetro digital, com precisão de 0,01 mm, mensurados quanto ao comprimento, largura e espessura de 100 sementes escolhidas ao acaso, para medição individual. Nas medições foram considerados como comprimento, a medida longitudinal entre o ápice e a base da semente, largura a medida da região mediana transversal ao comprimento e espessura à medida da região mediana paralela ao comprimento.

### 2.2.2. Morfologia das sementes

Para a descrição da morfologia das sementes foram utilizadas cinquenta (50) sementes de cada espécie escolhidas ao acaso. As observações foram feitas com lupa de mesa e estereomicroscópio. Características morfológicas externas (dimensão, cor, textura e consistência dos tegumentos, forma, posição do hilo e da micrópila, rafe e outras estruturas presentes) e internas (forma e posição do embrião, eixo hipocótilo-radícula, cotilédones e plúmula e presença de endosperma) foram descritas. Para permitir o estudo da morfologia interna, as sementes foram escarificadas por desponte e embebidas em água destilada durante 24h. As descrições foram realizadas conforme metodologias descritas por Ducke (1965), Stearn (1983), Gunn (1984, 1991) e Barroso *et al* (1984, 1999).

### 2.3. Grau de umidade

O grau de umidade das sementes quiescentes foi determinado por meio do método da estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, conforme as Regras de Análises de Sementes (Brasil, 2009). Duzentas (200) sementes de *Parkia multijuga* foram usadas para o teste de umidade, sendo 5 repetições de 20 sementes inteiras e 5 repetições de 20 sementes cortadas ao meio. Para a espécie *Parkia pendula* foram usadas 200 sementes distribuídas em 5 repetições de 40 sementes inteiras. A porcentagem de umidade foi calculada na base na massa úmida, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Umidade (U)} = \frac{100 (P-p)}{P-t}$$

Para efeito de aplicação da equação acima:

P = peso inicial, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente úmida;

p = peso final, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente seca;

t = tara, peso do recipiente com sua tampa.

### 2.4. Testes histoquímicos

Para os testes histoquímicos e para análise da natureza química das estruturas foram realizados cortes em secções transversais dos cotilédones, endosperma, tegumento e embrião (frescos) com auxílio de micrótomo de mesa. Os cortes frescos foram montados entre lâminas e lamínulas com glicerina e água. Os reagentes e corantes utilizados foram: Lugol para amido (Johansen 1940), Xylidine Ponceau para proteínas totais (O'Brien & McCully, 1981), Sudan

III e Black B para lipídios totais (Johansen 1940), vermelho de rutênio para pectinas (Johansen, 1940) e Floroglucinol ácido para lignina (Johansen 1940).

Para comparação de resultados foram utilizados os controles, o branco, para as duas espécies (material sem aplicação de corantes ou reagentes) foi usado para possível pigmentação natural de compostos que poderiam influenciar na coloração com os reagentes, de acordo com as recomendações de Ascensão (2004).

## 2.5. Caracterização anatômica

A caracterização anatômica das sementes foi realizada em cortes transversais e longitudinais, em amostra de sementes fixadas em FAA<sub>50</sub> durante 48 horas. Após lavagem em solução-tampão, as amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica) e polimerizadas durante 15 horas a 60°C, em estufa. Os blocos foram cortados em secções de 7 µm de espessura em micrótomo rotativo de avanço manual (RM 2145 – Leica). A coloração foi feita com azul de toluidina a pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981), durante 10 minutos e as lâminas foram montadas em resina sintética Permunt<sup>®</sup>. O azul de toluidina foi usado para meta cromazia (O'Brien *et al.* 1964).

As observações e registros fotográficos para os testes histoquímicos e anatômicos foram realizados em microscópio de luz (Zeiss) com câmara fotográfica acoplada, no Laboratório de Botânica Agroflorestral (LABAF) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

## 2.6. Análises dos compostos do metabolismo primário

As sementes tiveram a dormência tegumentar quebrada por desponete no lado oposto a emissão da radícula para *P. multijuga* e escarificação química pela imersão em ácido sulfúrico durante 25 minutos para *P. pendula* e então, embebidas durante 24 horas em água destilada, a fim de facilitar a separação das estruturas da semente. Após essas etapas, coletou-se amostras de cotilédones, os quais foram secos em estufa a 45°C durante 72 horas, pulverizados em moinho e utilizados para extração e quantificação dos metabólitos primário.

### 2.6.1. Extração de lipídeos

Os lipídeos totais foram estimados com base na massa, segundo o método modificado da Silva (1990). Amostras pulverizadas foram colocadas em cartuchos de papel e acondicionadas em aparelho tipo soxhlet, sendo mantidas em refluxo durante seis horas,

usando éter de petróleo como extrator. Ao final da extração, os cartuchos foram retirados, secos e pesados. O teor de lipídeo foi estimado pela diferença de peso da amostra seca inicial e final. O material desengordurado resultante foi utilizado para análises de carboidratos e de proteínas (Melo *et al.* 2009).

#### 2.6.2. Quantificação de Ácidos Graxos

Após extração dos lipídeos totais, utilizou-se 20 mg, o qual passou por processo de esterificação para posteriormente 1  $\mu\text{L}$  de amostra ser injetado em cromatógrafo a gás (SHIMADZU GC - 14A) para detecção dos ácidos graxos. O cromatógrafo foi calibrado com a temperatura da coluna de 190 – 220°C a 2°C por minuto, temperatura do injetor a 250°C e temperatura do detector a 275°C. Utilizou-se Coluna capilar Shimadzu 50 m CBP10 – M50 Recheio Carbowax e, hidrogênio como gás de arraste com fluxo de 0,5 Kg/cm<sup>2</sup>.

#### 2.6.3. Extração de carboidratos

Os carboidratos foram extraídos conforme metodologia descrita por Black *et al.* (1996), com modificações. Amostras de 200 mg de material desengordurado foram homogeneizadas em 1 mL de álcool 80% e, posteriormente, mantidas em banhomaria a 75°C durante 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm durante cinco minutos, repetindo-se esse processo por mais três vezes. Os sobrenadantes foram misturados em amostra única e, posteriormente, seca em estufa a 50°C até total evaporação do álcool; ressuspendidos em 1 mL de água ultrapura, o qual foi utilizada para as análises de açúcares solúveis totais. Os precipitados, após secos em estufa, foram utilizados para extração e quantificação de amido.

#### 2.6.4. Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e amido

A quantificação de açúcares solúveis foi realizada a partir da diluição de 20  $\mu\text{l}$  da amostra da extração de carboidratos e adicionando-se 80  $\mu\text{l}$  de água ultrapura. Dessa diluição original retirou-se 20  $\mu\text{l}$  e adicionou-se 980 $\mu\text{l}$  de água ultrapura, 500  $\mu\text{l}$  de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico.

A extração do amido foi realizada a partir de 20 mg da amostra do precipitado de onde foram extraídos os açúcares solúveis totais, o qual foi colocado em eppendorf e adicionado 1,0 mL de ácido perclórico 35%, agitado em vortex e deixando digerir o amido durante 15 minutos. Após a digestão as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga a 10.000 rpm, durante cinco minutos. A quantificação do amido foi realizada em alíquotas de

20 µL do sobrenadante, adicionadas à 980 µL de água destilada, 500µL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico absoluto. Tanto os açúcares solúveis totais quanto o amido foram quantificados por espectrofotométrica com leitura a 490 nm, utilizando-se glicose (Sigma) como padrão, conforme metodologia descrita por Dubois *et. al.*, (1956).

#### 2.6.5. Determinação do nitrogênio total

A quantificação do nitrogênio total foi realizada pelo método de Kjeldahl, utilizando procedimentos descritos no Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes da EMBRAPA (1999), após secagem em estufa à 65°C durante 72 horas. Amostras de 100 mg do material desengordurado foram colocadas em tubo de ensaio juntamente com 5,0 mL de solução digestora. A digestão da amostra foi realizada em bloco digestor a 350°C até o material apresentar-se incolor. Em seguida, realizou-se a destilação adicionando-se 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 40% após mistura da amostra em 20 mL de água destilada. O destilado foi coletado em becker contendo 10 mL de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) solução receptora.

A destilação se completou quando o volume do becker chegou a 60 mL de uma solução com coloração verde menta, indicando a presença de nitrogênio na amostra. A titulação foi realizada utilizando ácido sulfúrico a 0,01 N. O teor de proteínas totais foi estimado utilizando o fator de correção 5,71 (Ezeagu *et. al.*, 2002).

#### 2.6.6. Fracionamento de proteínas

O fracionamento proteico foi obtido conforme a solubilidade das proteínas, em globulinas, prolaminas, albuminas, glutelinas ácidas e básicas (Osborne, 1924). Inicialmente 5 g de amostra desengordurada (sem lipídeos) foi homogeneizada em 50 mL de solução salina (NaCl 0,5 M), sob agitação constante durante quatro horas. Posteriormente, foi centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos à 4°C e filtrado em papel filtro. O sobrenadante foi submetido à diálise em água destilada durante 48 horas e centrifugado nas condições descritas anteriormente, sendo que o novo sobrenadante corresponde a fração albumina e o precipitado, ressuspenso em 15 mL de NaCl 0,5 M, constituindo a fração globulinas, conforme metodologia descrita por Pinto *et al.* (2005).

O resíduo da extração anterior foi homogeneizado em solução de etanol 70% durante 1 hora e, posteriormente, centrifugado, onde o sobrenadante correspondeu a fração prolaminas e o precipitado submetido a homogeneização em solução de HCl 0,1 M por 1 hora e após

filtrado, o sobrenadante foi dialisado durante 48 horas para obtenção das globulinas ácidas.

O último resíduo foi submetido à extração em solução de NaOH 0,1 M por 1 hora e centrifugado nas mesmas condições anteriores para obtenção das glutelinas básicas.

A concentração relativa de proteínas solúveis dos extratos foi estimada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando a BSA (albumina sérica bovina) como padrão. As absorvâncias foram obtidas em espectrofotômetro com leitura a 595 nm.

#### 2.6.7. Eletroforese em SDS-PAGE

A análise do perfil protéico foi realizada apenas para as proteínas da classe das globulinas, encontradas em maior quantidade nos cotilédones das espécies em estudo. Utilizou-se o método descrito por Laemmli (1970), com modificações. O gel foi preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% e de N-N'-metileno bis-acrilamida 0,8%. Para o gel de concentração a 5%, foi utilizado tampão Tris-HCl 0,125M, pH 6,8, e para o gel de separação 12,5%, tampão Tris-HCl 1M, pH 8,8, sendo acrescentado em ambos SDS 20%, sendo a polimerização conseguida pela adição de TEMED e PSA 10%.

As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,08 M, pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,1% de azul de bromofenol. Como agente redutor foi utilizado o ditioneitol (DTT) a 0,1M. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue em ácido acético 0,1%, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v/v) e descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v/v).

#### 2.6.8. Análises estatísticas

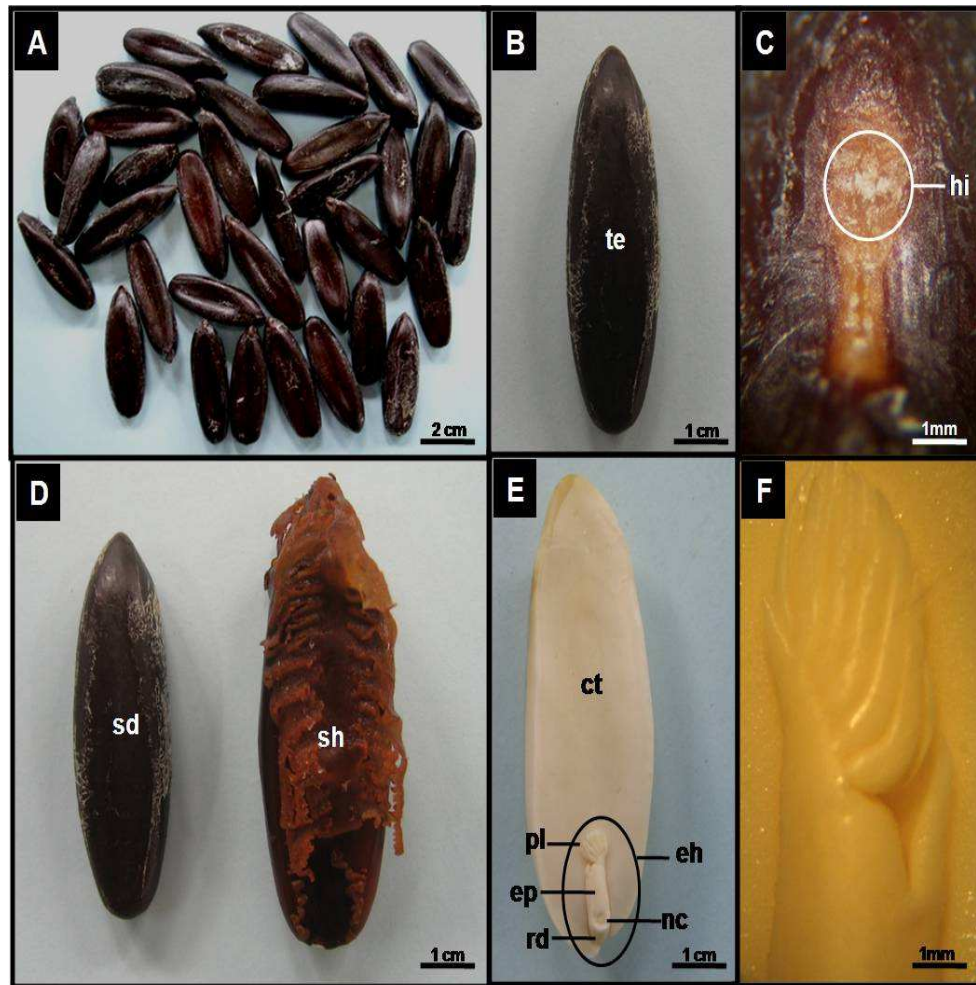
Para os dados de biometria das sementes, espessura das estruturas anatômicas da semente e ácidos graxos, utilizou-se apenas estatística descritiva. Ao passo que para os dados de carboidratos, lipídeos e proteínas utilizou-se análise de variância e posterior comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e teste t de student a 5% de probabilidade para os dados de fracionamento de proteínas.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização da morfologia externa e interna da semente

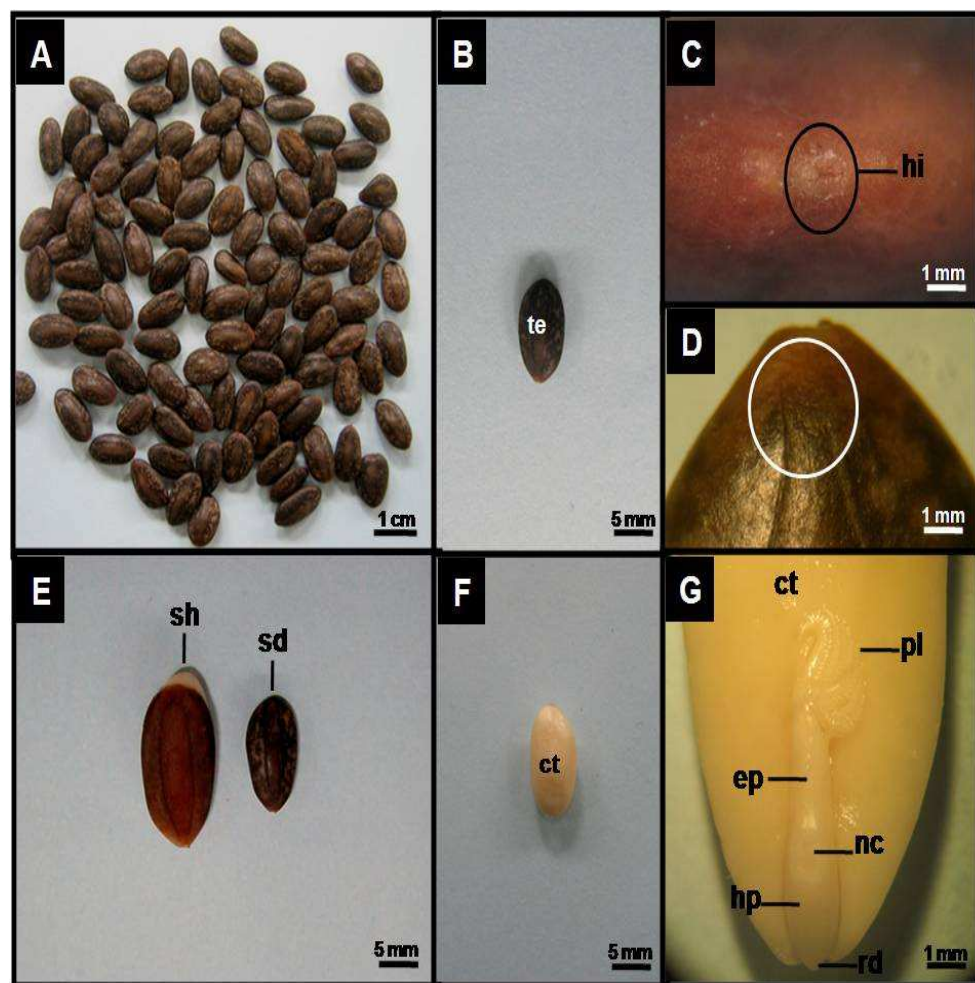
A semente da espécie *P. multijuga* foi caracterizada como estenospérmica, de forma lanceolada, com ápice levemente truncado e base aguda (Figura 1A-B). O tegumento externo (testa) é ósseo e coriáceo (hidratada) (Figura 1D), de coloração castanha, com superfície lisa, glabra e sem brilho, apresenta pleurograma de 100%, com linha homócroma, de tamanhos iguais; a região hilar é basal, com hilo punctiforme, ligeiramente depresso, de cor creme (Figura 1C). Tegumento interno coriáceo (hidratado), castanho claro, ligeiramente espesso, adnato a testa. O embrião é axial, total, carnoso, de coloração amarela esbranquiçada (Figura 1E). Cotilédones carnosos, dominantes, de cor amarela esbranquiçada e forma lanceolada, com ápice ligeiramente emarginado, margem inteira e base cuneada, as lâminas são levemente convexas com as faces superiores em contato, apresentam-se chanfrados com a radícula escondida. O eixo hipocótilo-radícula está entre os lóbulos cotiledonares, longo, de coloração amarela esbranquiçada, com epicótilo longo, hipocótilo imperceptível, nó cotiledonar visível (Figura 1E) e plúmula bem desenvolvida com os primórdios foliares diferenciados (Figura 1F).



**Figura 1.** Aspectos morfológicos da semente de *Parkia multijuga* Benth. **A, B** – Aspecto geral da semente; **C** – Detalhe do hilo; **D** – Aspecto da semente hidratada, evidenciando o aumento de volume comparado a semente desidratada; **E** – Embrião; **F** – Detalhe da plúmula bem desenvolvida, evidenciando os primórdios foliares diferenciados. **ct** – cotilédone, **nc** – nó cotiledonar, **eh** – eixo hipocótilo-radícula, **ep** – epicótilo, **hi** – hilo, **pl** – plúmula, **rd** – radícula, **sd** – semente desidratada, **sh** – semente hidratada, **te** – tegumento externo (testa).

Da mesma forma que para *P. multijuga*, a semente da espécie *P. pendula* também foi caracterizada como estenospérmica, entretanto, com forma elíptica, ápice arredondado e base ligeiramente retusa (Figura 2A-B), apresentando tegumento externo (testa) pétreo e coriáceo (hidratado) (Figura 2E), com coloração rajada de marrom e creme, com superfície lisa, glabra e sem brilho, no centro de cada face, observa-se um pleurograma de 90%, com linhas de tamanhos diferentes, de cor castanha (Figura 2D), diferentemente a *P. multijuga* que foi de 100%. A região hilar é basal, com hilo punctiforme, levemente depresso, de cor castanha (Figura 2C), diferindo de *P. multijuga* apenas na coloração. O tegumento interno é coriáceo (hidratado), de cor marrom clara, delgado, adnato a testa; o embrião é axial, total, carnoso, de

coloração branca (Figura 2F). Os cotilédones são carnosos, dominantes, de forma elíptica, com ápice e base arredondados, e margem inteira, coloração esbranquiçada, com lâminas levemente convexas e as faces superiores em contato, apresentam-se auriculados com a radícula exposta; o eixo hipocótilo-radícula é parcialmente exposto aos lóbulos cotiledonares, longo, de cor branca, com hipocótilo curto; diferentemente de *P. multijuga* onde o mesmo não foi observado, nó cotiledonar visível, epicótilo longo e plúmula bem desenvolvida com os primórdios foliares diferenciados (Figura 2G), assim como em *P. multijuga*.



**Figura 2.** Aspectos morfológicos da semente de *Parkia pendula* (Willd.) Benth. Ex. Walp.. **A, B** – Aspecto geral da semente; **C** – Detalhe do hilo; **D** – Detalhe do pleurograma a 90°, com linhas de tamanhos diferentes; **E** – Aspecto da semente hidratada, evidenciando o aumento de volume comparado a semente desidratada; **F** – Embrião; **G** – Detalhe do eixo hipocótilo-radícula com plúmula bem desenvolvida. **ct** – cotilédone, **nc** – nó cotiledonar, **ep** – epicótilo, **hi** – hilo, **hp** – hipocótilo, **pl** – plúmula, **rd** – radícula, **sd** – semente desidratada, **sh** – semente hidratada, **te** – tegumento externo (testa).

No presente estudo a forma elíptica foi observada em sementes de *P. pendula*, sendo que, nas subfamílias Mimosoideae e Caesalpinioideae, geralmente, as sementes são oblongas ou elípticas, mais ou menos comprimidas (Barroso, 1984).

Nas Parkias em estudo, foi observado presença do pleurograma no tegumento da semente. O pleurograma é descrito como uma marca lateral na superfície de certas sementes, e apresenta-se como uma linha em forma de U, ou como estrutura fechada, de colorido mais forte que o da testa ou como linha que circunda a borda da semente (Barroso *et al.*, 1999). Essa característica está presente nas subfamílias Mimosoideae e Caesalpinioideae, sendo que, nas Caesalpinioideae ocorrem apenas nas formas de 90% e 100% (Gunn, 1984, 1991). Essa linha pode ser originada pela interrupção na camada paliçada da exotesta ou por diferenças nas camadas externas complexas da testa, apresentando-se em forma de U na maioria das sementes de Mimosoideae (Barroso *et al.*, 1999). Sementes com pleurograma são raras, exceto em Fabaceae e Curcubitaceae. Entre as Fabaceae, ele está ausente nas Faboideae, ocorrendo entre 67 a 70% dos gêneros de Mimosoideae e entre 9 a 14% dos gêneros de Caesalpinioideae estudados (Beltrati, 1994). Em Fabaceae e Curcubitaceae, o pleurograma pode ser observado como uma linha circular ou elíptica (pleurograma fechado) ou em forma de U invertido (pleurograma aberto), localizada lateralmente (Beltati & Paoli, 2006).

Nas espécies estudadas foi observado hilos diminutos, entretanto, com formato punctiforme em *P. multijuga* e *P. pendula*. Em espécies pertencentes a subfamília Caesalpinioideae e Mimosoideae as sementes apresentam hilo diminuto, circular, que pode ser terminal ou subterminal (Barroso *et al.*, 1999).

A micrópila apresenta-se como um pequeno orifício, que pode ser perceptível ou não (Barroso *et al.*, 1999). A lente é perceptível em cerca de 34% nos gêneros de Caesalpinioideae e em 50% nos de Mimosoideae (Gunn, 1991). No presente estudo, não foi possível visualizar a micrópila nem a lente, nas sementes de ambas as espécies.

Em *Dalbergia nigra* (Fabaceae-Papilionoideae) as sementes são planas, com hilo bem demarcado, micrópila pequena e rafe situada na parte ventral (Braz *et al.*, 2009). Porém, em *Dalbergia cearensis* Ducke, o hilo e micrópila não são visíveis a olho nu, a micrópila é inconspícua e, encontram-se localizados na região basal. Características essas, que podem ser utilizadas na distinção destas espécies (Nogueira *et al.*, 2010).

No presente estudo, tanto na espécie *P. multijuga* quanto em *P. pendula* foi observado plúmulas desenvolvidas e com os primórdios foliares diferenciados. A plúmula nas espécies de Fabaceae podem apresentar-se rudimentar, quando os segmentos não são bem diferenciados, moderadamente desenvolvida quando apresentam segmentos em

desenvolvimento e desenvolvidas quando apresentam os segmentos bem diferenciados em pinas (Barroso *et al.*, 1999; Gunn, 1984).

As sementes em *P. multijuga* e *P. pendula* apresentam embrião com cotilédones crassos, quando desidratado, plúmula diferenciada e bem desenvolvida, corroborando com os resultados apresentados por Barroso *et al.*, (1999). Diferentemente ao descrito para outras Fabaceae, como *Dalbergia cearensis* Ducke, que apresenta sementes caracterizadas como exalbuminosas, forma oblonga achatada, embrião curto e curvo, cotilédones crassos elipsóides (Nogueira *et al.*, 2010).

Os resultados da caracterização da semente, do hilo, micrópila, embrião e plúmula obtidos para a espécie Amazônica *P. pendula*, corroboram e complementam os resultados relatados por Camara *et al.*, (2008) para sementes da mesma espécie obtidas de árvores da Mata Atlântica.

Embora a morfologia das plântulas de *Indigofera anil*, *I. suffrutcosa* e *I. truxillensis* (Fabaceae) seja bastante semelhante, caracteres morfológicos externos e internos das sementes apresentam valor diagnóstico para distinção taxonômica das espécies de anileira (Paulino *et al.*, 2010). Reforçando a importância de se pesquisar um conjunto amplo de caracteres que possam fornecer subsídios para a distinção taxonômica de espécies vegetais.

No presente estudo as sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* podem ser classificadas como exendospermica ou exalbuminosas, pois não apresentam endosperma como tecido de reserva, o qual foi consumido totalmente pelo embrião durante seu desenvolvimento. Neste caso os materiais de reserva podem acumular-se nos cotilédones, no eixo hipocótilo-radícula ou em ambos (Beltrati & Paoli, 2006).

### 3.2. Biometria e grau de umidade das sementes

Na caracterização morfológica das sementes, observa-se que, mesmo pertencendo à mesma família, gênero e subfamília, as espécies apresentam distinção morfológica, biométrica e no conteúdo de água da semente.

Em relação às medidas biométricas, verifica-se que, a espécie *P. multijuga* mesmo apresentando a semente com aproximadamente cinco vezes maior no comprimento, duas vezes e meia na largura e três vezes na espessura, em relação a *P. pendula*, a mesma apresenta-se com menor grau de hidratação, quando as sementes são analisadas inteiras. Entretanto, quando essas sementes são cortadas ao meio, conforme procedimentos sugeridos

nas Regras de Análises de Sementes (Brasil, 2009), elas apresentam maior capacidade de perda de água, exibindo melhor o grau de hidratação dos seus tecidos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características biométricas e grau de umidade de duas espécies florestais pertencentes à família Leguminosae (n=100).

Espécie	Medidas (cm)			Grau de Umidade (%)
	Comprimento	Largura	Espessura	
<i>Parkia multijuga</i>	4,78 ± 0,44	1,44 ± 0,17	1,09 ± 0,11	5,10 ± 1,38 *9,20 ± 1,12
<i>Parkia pendula</i>	0,96 ± 0,06	0,54 ± 0,04	0,31 ± 0,03	7,42 ± 1,46

Médias ± Desvio Padrão

\*Semente cortada ao meio.

No presente estudo, o grau de umidade das sementes de *P. multijuga*, após exposição dos tecidos internos ao meio ambiente, é semelhante ao relatado em estudos com a mesma espécie, pesquisando-se tratamentos que aumentem o desempenho da germinação (Calvi *et al.*, 2008).

O aumento da área de exposição dos tecidos internos facilita a liberação de água, antes retida pelo tegumento, demonstrando que a presença do tegumento impermeável dificulta a retirada de água dos cotilédones e do eixo embrionário durante a secagem em estufa (Andrade, *et al.*, 2001). O conteúdo de água das sementes representa um dos fatores que mais interferem na manutenção da pura qualidade fisiológica; assim, quanto mais baixo, maior a longevidade das sementes (Popinigis, 1977).

Assim como em sementes de *Dalbergia cearensis* (Nogueira *et al.*, 2010), maior variação no comprimento foi observado em sementes de *P. multijuga*. Sendo as sementes de *P. pendula* mais homogêneas quanto as características biométricas. Resultados similares foram obtidos para comprimento (1,1 cm), largura (0,49 cm) e largura (0,31 cm) em sementes de *P. pendula* oriundas do Nordeste brasileiro (Camara *et al.*, 2008). Entretanto, as sementes oriundas dessa região, apresentaram maior variação biométrica e maior grau de umidade (11,26%), comparada as oriundas da região Amazônica, verificada neste trabalho. Por outro lado, sementes de caatingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) apresentaram média de 9,46% no grau de umidade (Dantas *et al.*, 2008), resultados similares ao obtido para *P. multijuga* e próximo daqueles exibidos por *P. pendula*, nesta pesquisa.

Da mesma forma, características biométricas de sementes de *Platymenia reticulata* (Fabaceae-Mimosoideae), oriunda de um fragmento de Cerrado e *Platymenia foliolosa* (Fabaceae-Mimosoideae), oriunda de um fragmento de Floresta Atlântica, serviram como subsídeos para distinção das espécies (Lopes *et al.*, 2010). Essas espécies apresentaram as características biométricas semelhante às de *P. pendula*.

Na maioria dos habitats, o tamanho de sementes varia de dez ordens de magnitude (Leishman *et al.*, 2000). No presente estudo, a variação no tamanho da semente foi insignificante para *P. pendula* e significativa apenas no comprimento em sementes de *P. multijuga*. Espécies com grandes sementes apresentam maior persistência e estabelecimento sobre ampla faixa de condições ambientais, enquanto espécies com sementes de tamanho pequeno são mais dependentes de perturbação (Burke & Grime 1996).

Por outro lado, sementes pequenas, como é o caso de *P. pendula*, têm maior facilidade em obter água para a germinação do que sementes grandes, como *P. multijuga*, devido à maior razão superfície/volume (Harper *et al.*, 1970). Característica essa, de maior relevância para espécies que habitam regiões com curta estação de disponibilidade de hídrica.

Geralmente, grandes sementes aumentam a sobrevivência de plântulas, porém, para essa relação ser compreendida se faz necessário entender como as reservas da semente são utilizadas durante a germinação e no estabelecimento inicial da plântula (Kitajima & Fenner 2000).

O tamanho da semente pode estar relacionado com a quantidade de reservas e a sua genética, características essas essenciais para a germinação e maior capacidade de sobrevivência em condições desfavoráveis. Este fato pode favorecer o maior número de plântulas germinadas (Ledo *et al.*, 2002). Assim, esses aspectos morfológicos podem auxiliar na seleção de indivíduos vigorosos, para trabalhos de tecnologia de sementes; na identificação das espécies em viveiro, bem como nos estudos da ecologia das mesmas e no planejamento da coleta de sementes, pela seleção daquelas vigorosas, que contribuam efetivamente para o bom estabelecimento das plântulas (Antunes *et al.*, 1998, Ferreira *et al.*, 2001).

### 3.3. Características anatômicas e histoquímicas

#### 3.3.1. Anatomia das estruturas da semente

Nas sementes de *P. multijuga* verificou-se duas camadas de tegumento, uma mais externa e outra mais interna, e podem ser classificadas como sementes testais, pois a principal camada de tecido mecânico está presente na testa, e enquadradas no sub-grupo exotestal,

sendo que, próximo a face adaxial da epiderme do tegumento encontram-se duas camadas de células. Sendo uma camada com paredes espessas, os macrosclereídeos, dispostas em paliçadas no sentido radial, constituindo a exotesta, com 306,7  $\mu\text{m}$  de espessura. Seguida por um feixe de osteosclereídes de 65,7  $\mu\text{m}$  de espessura; alongadas no sentido radial e uma camada de células isodiamétricas espessadas e dispostas compactadamente até a face abaxial da epiderme do tegumento; preenchendo os 1535,2  $\mu\text{m}$  de espessura do parênquima lacunoso. Sendo o primeiro estrato preenchido de forma regular e o segundo de forma irregular (Tabela 2 e Figura 3A).

**Tabela 2.** Espessura das estruturas anatômicas do tegumento de sementes de *Parkia multijuga* e *Parkia pendula* (Fabaceae-Mimosoideae).

Espécie	Estruturas anatômicas ( $\mu\text{m}$ )			
	Parênquima paliçádico	Ostoesclereíde	Parênquima lacunoso	Mesofilo
<i>Parkia multijuga</i>	306,7 $\pm$ 5,8	65,7 $\pm$ 13,1	1535,2 $\pm$ 22,1	1899 $\pm$ 27,6
<i>Parkia pendula</i>	44,9 $\pm$ 5,9	Np	363,2 $\pm$ 17,4	402,3 $\pm$ 17,8

Médias  $\pm$  Desvio Padrão

Np = não presente

Na maioria das Fabaceae o tegumento resistente, possivelmente se restringe à região cônica dos macrosclereídeos, possivelmente o responsável pela impermeabilidade da semente (Melo-Pinna *et al.*, 1999). Essas características também foram observadas no tegumento de sementes de *Senna occidentalis*, espécie pertencente à família Fabaceae-Caesalpinioideae (Bitencour *et al.*, 2008).

O mesofilo do tegumento da semente de *P. multijuga* é ocupado em 80% pelo parênquima lacunoso, 16% pelo parênquima paliçádico e 4% pela camada de osteosclereídes, ao passo que em *P. pendula* 90% da espessura do mesofilo é formada por células do parênquima lacunoso e 10% pelo parênquima paliçádico (Tabela 2 e Figura 3A).

O parênquima paliçádico é encontrado principalmente no mesofilo e constituído de um ou mais estratos celulares, sendo suas células mais altas que largas. Ao passo que o parênquima esponjoso, também conhecido como lacunoso, apresentando células de formato irregular, delimitando espaços intercelulares, sendo que as células deste parênquima conectam-se com as células do parênquima paliçádico (Scatena & Scremin-Dias 2006).

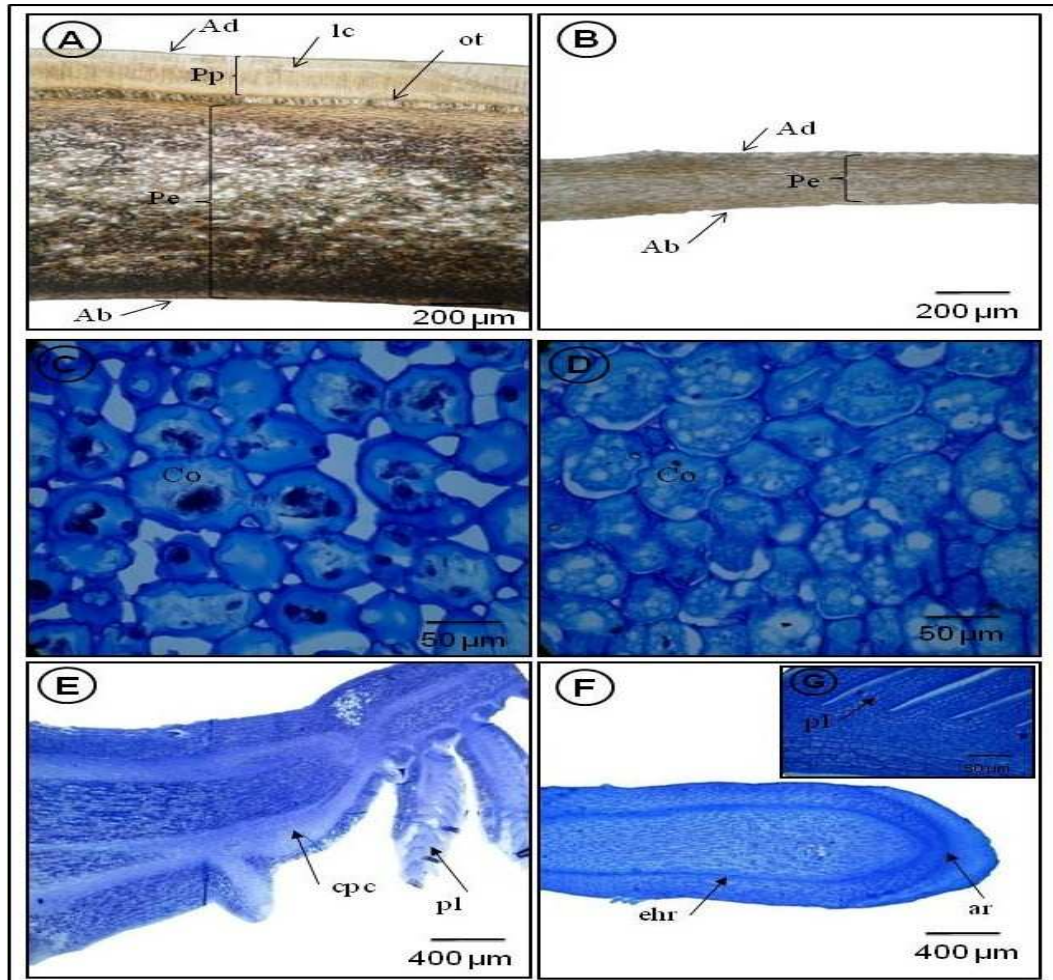


Sementes de *P. multijuga* apresentam a linha lúcida, linha refrativa que percorre transversalmente os macroclereídes em toda a extensão do tegumento, localizada próxima a face adaxial da epiderme (Figura 3A). No tegumento de sementes de *P. pendula*, não foi observado feixe de osteosclereídes, somente uma camada de células em forma mais tubulares do que paliçádicas, com espessura de 44,9  $\mu\text{m}$ , sendo esta espessura aproximadamente sete vezes menor que a de *P. multijuga* (Tabela 2 e Figura 3B). As células podem crescer uniformemente ou sofrer alongamento unidirecional no sentido radial, formando uma camada paliçádica de células prismáticas, quando no sentido tangencial, formando células tubulares (Beltrati & Paoli 2006). Características essas que podem estar intimamente relacionadas à dureza, ao menor grau de umidade quando integra e a barreira na absorção de água pelas sementes.

As características micromorfométricas das estruturas anatômicas do tegumento evidenciam que *P. multijuga* apresenta parênquima paliçádico, parênquima lacunoso e mesófilo, sete, quatro e cinco vezes maior, respectivamente, que *P. pendula* (Tabela 2). Entretanto, as células parenquimáticas dos cotilédones, presentes no mesófilo são isodiamétricas com formato globular e com conteúdo intracelular denso, assemelhando-se a um parênquima de reserva. Sendo que, as células do mesófilo cotiledonar de *P. multijuga* apresenta maiores espaços intercelulares que *P. pendula* (Figura 3C-D).

Durante a formação do tecido parenquimático ocorre a dissolução da lamela média, formando os espaços intercelulares esquizógenos, que podem diferir no tamanho, conforme a localização e a função do tecido. Os espaços intercelulares, característicos do parênquima, podem também ocorrer a partir da lise das células, que desintegra algumas delas e, em consequência, forma os espaços lisógenos (Scatena & Scremin-Dias, 2006).

Semelhanças nas características anatômicas do embrião foram observadas, ambas apresentam estruturas bem diferenciadas, com cordão procâmbial, plúmula, eixo hipocótilo radícula bem formados (Figura 3E-F-G).



**Figura 3:** Aspectos gerais das características anatômicas dos tegumentos (A e B), cotilédones (C e D) e embriões (E, F e G) de sementes de *P. multijuga* (A, C e E) e *P. pendula* (B, D, F e G). Legenda:, **Ad** – adaxial, **Pp** – parênquima paliçádico, **Ic** – linha lúcida, **ot** – osteosclereíde, **Pe** – parênquima esponjoso ou lacunoso, **Ab** – abaxial, **Co** – cotilédone, **cpc** – cordão procambial, **pl** – plúmula, **ehr** – eixo hipocótilo radícula, **ar** – ápice radicular.

### 3.3.2. Histoquímica dos metabólitos primários

Os testes histoquímicos realizados apresentaram reação positiva para a detecção de proteínas totais no embrião e cotilédones, lipídeos totais nos cotilédones e pectinas nos tegumentos, e reação negativa para o teste de amido em todas as estruturas analisadas das duas espécies estudadas (Tabela 3).

**Tabela 3:** Teste histoquímico aplicado em estruturas das sementes quiescentes de *P. multijuga* e *P. pendula* (+ presença, - ausência; o número de sinais expressa a intensidade da reação).

Composto	Teste	Estrutura		
		Tegumento	Cotilédone	Embrião
Amido	Lugol	-	-	-
Lipídeos totais	Sudan III	-	+	+
	Sudan Black B	-	+	-
Pectinas	Vermelho de rutênio	+++	-	-
Proteínas totais	Xylidine Ponceau	-	++	+++

A constituição pectocelulósica das paredes celulares do tegumento de ambas as espécies em estudo, evidenciada pela cor violeta arroxeadas das pectinas, pelo teste com vermelho de rutênio, podem está fortemente associadas às características de dureza e impermeabilidade a água, necessária para a embebição e, posteriormente, contribuindo para germinação das sementes (Figura 4F e 5F).

Células do mesofilo cotiledonar apresentam-se ricas em proteínas totais e lipídeos totais em menor proporção, com reação positiva para esses dois compostos nos testes utilizados. Os lipídios totais foram evidenciados com os testes Sudan III e Black B, com pequenos corpos oleaginosos, variando em diâmetro, distribuído nas periferias das células do mesofilo cotiledonar, para ambas as espécies (Figura 4F e 5D-E). Apenas na espécie *P. pendula* foi possível visualizar corpos oleaginosos tanto em células do mesofilo cotiledonar quanto em células do embrião (Figura 5D-E)

As proteínas totais foram evidenciadas pelo teste com Xylidine Ponceau, estando presentes em células dos cotilédones e, principalmente, nas células do embrião. Essa compartimentalização de corpos protéicos foi bem mais evidente para *P. multijuga* (Figura 4C-D-E). No entanto, em *P. pendula* os corpos proteicos parecem melhor distribuídos entre as células do cotilédone e do embrião (Figura 5B-C).

Estes compostos de reserva aparecem como estruturas globosas, variando em tamanho, denominada por vários autores como corpos protéicos (Corte *et al.*, 2009). Os corpos protéicos, termo mais aceito por ser generalista, são estruturas vacuolares que acumulam proteínas de reserva, mais que também pode conter outras substâncias em menor proporção

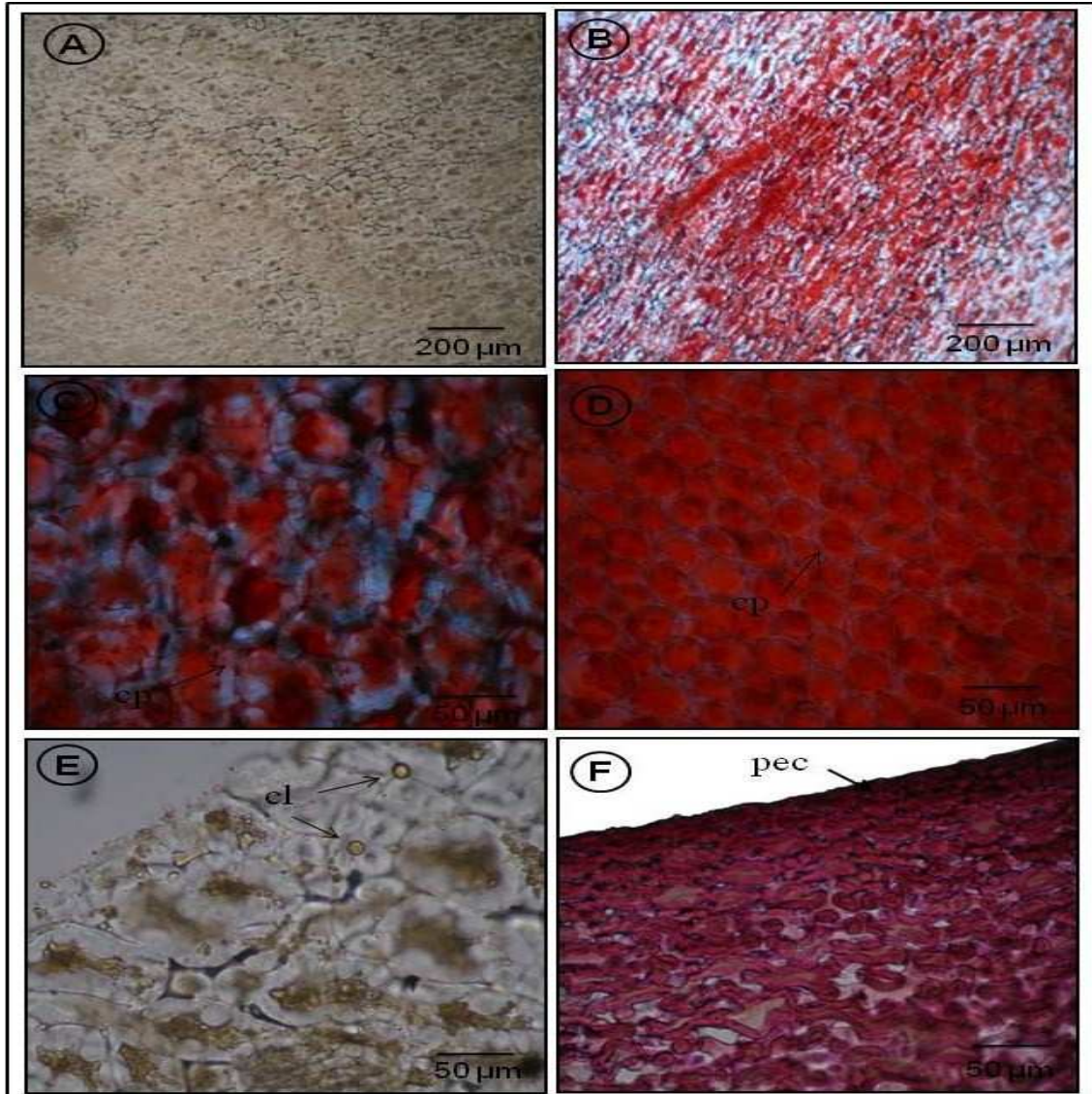
(Trombs 1967; Dalling & Bhalla 1984; Vidal & Pimentel 1985; Guimarães 1999; Muntz *et al.* 2001; Buckeridge *et al.* 2004).

As proteínas foram melhor evidenciadas que os demais compostos de reserva, apresentando-se em maior quantidade e, com ampla distribuição em todo o mesofilo cotiledonar e células do embrião das duas *Parkias*. As proteínas servem como fonte principal de nitrogênio e enxofre, embora não utilizadas como fontes de ATP, fornecem esqueletos carbono que servem de substrato para a síntese de outros compostos (Buckeridge *et al.*, 2004).

Em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae) o mesofilo cotiledonar apresenta-se abundante em proteínas e lipídeos totais. Entretanto, compartimentalizados em locais distintos, com maior concentração de proteínas na face adaxial e predomínio de lipídeos na face abaxial dos cotilédones (Corte *et al.*, 2009). Essa compartimentalização das reservas, pode estar relacionada a um processo ordenado de degradação (Bewley & Black, 1994).

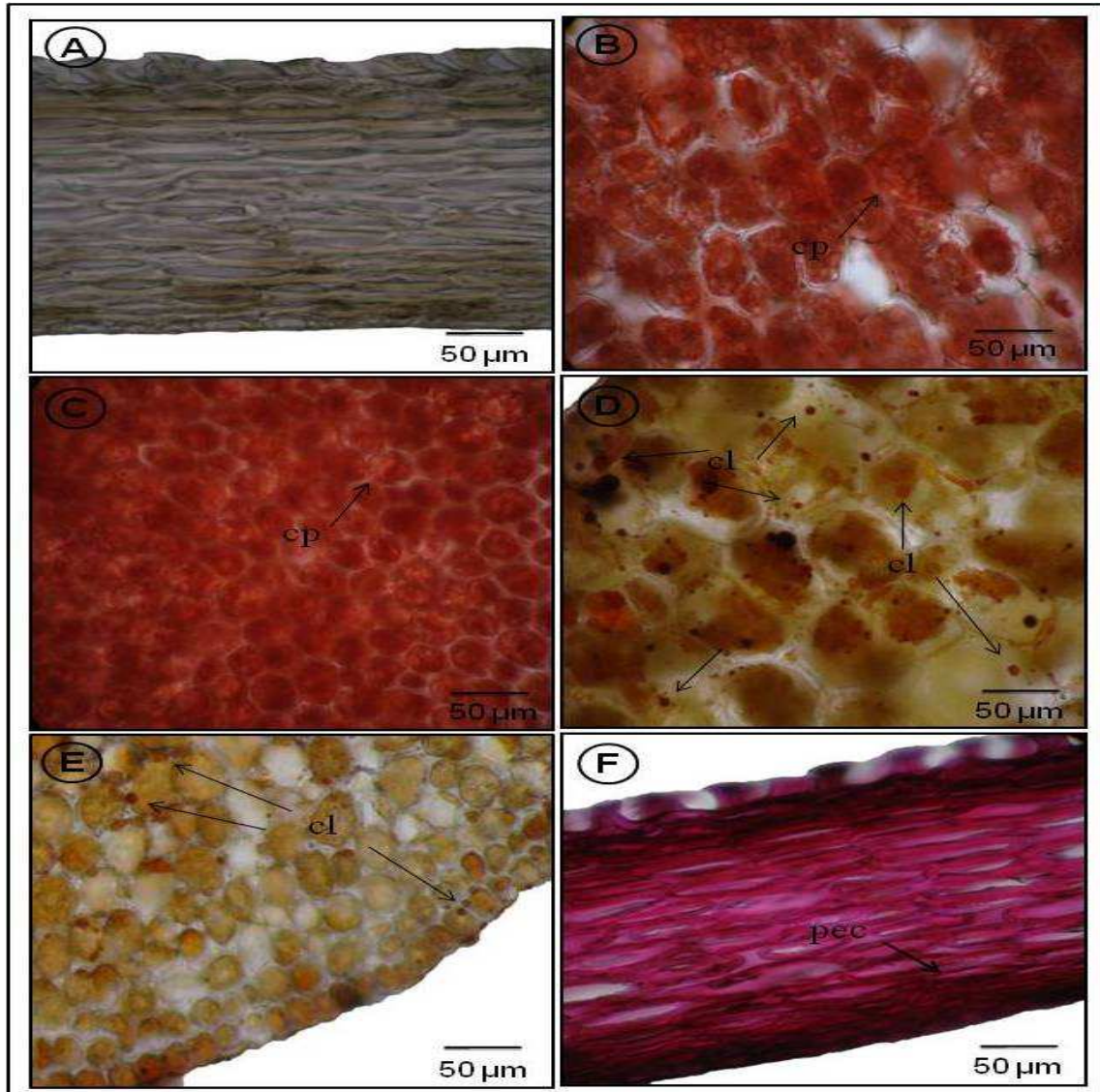
Diferentemente ao obtido para lipídeos e proteínas, o teste histoquímico utilizando-se lugol não foi eficiente para a detecção de amido nas estruturas celulares analisadas, para ambas as espécies (Tabela 3).

A ocorrência de grãos de amido em sementes de espécies Fabaceae pertencentes a sub-família Papilionoideae é considerado abundante, rara em espécies Mimosoidae, e ausente nas Caesalpinioideae conhecidas (Corner, 1976). Entretanto, em cotilédones de *Caesalpinia peltophoroides*, os grãos de amido estão presentes em pequenas quantidades (Corte *et al.*, 2009). Estes resultados de certa forma, também são coerentes com os resultados mostrados para as *Parkias*, uma vez que os grãos de amido não foram detectados pelo teste com lugol, em nenhuma das espécies.



**Figura 4:** Testes histoquímicos em estruturas de sementes de *P. multijuga* submetidas a distintos corantes e reagentes. **A)** Cotilédone: branco (sem corantes ou reagentes); **B)** Cotilédone: Xylidine Ponceau (cor vermelha: vista geral das proteínas totais); **C)** Cotilédone: Xylidine Ponceau (cor vermelha: detalhe dos corpos proteicos), **cp** – corpos proteicos; **D)** Embrião: Xylidine Ponceau (cor vermelha: proteínas totais), **cp** – corpos proteicos; **E)** Cotilédone: Sudan III (cor laranja: lipídeos totais), **cl** - corpos lipídicos; **F)** Tegumento: vermelho de rutênio (cor violeta arroxeadado: pectinas), **pec** – pectina.





**FIGURA 5:** Testes histoquímicos em estruturas de sementes de *P. pendula* submetidas a diferentes corantes e reagentes. **A)** Tegumento: branco (sem corantes ou reagentes); **B)** Cotilédone: Xylidine Ponceau (cor vermelha: proteínas totais), **cp** – corpos protéicos; **C)** Embrião: Xylidine Ponceau (cor vermelha: proteínas totais), **cp** – corpos protéicos; **D)** Cotilédone: Sudan III (cor laranja: lipídeos totais), **cl** - corpos lipídicos; **E)** Embrião: Sudan III (cor laranja: lipídeos totais), **cl** - corpos lipídicos; **F)** Tegumento: vermelho de rutênio (cor violeta arroxeado: pectinas), **pec** – pectina.

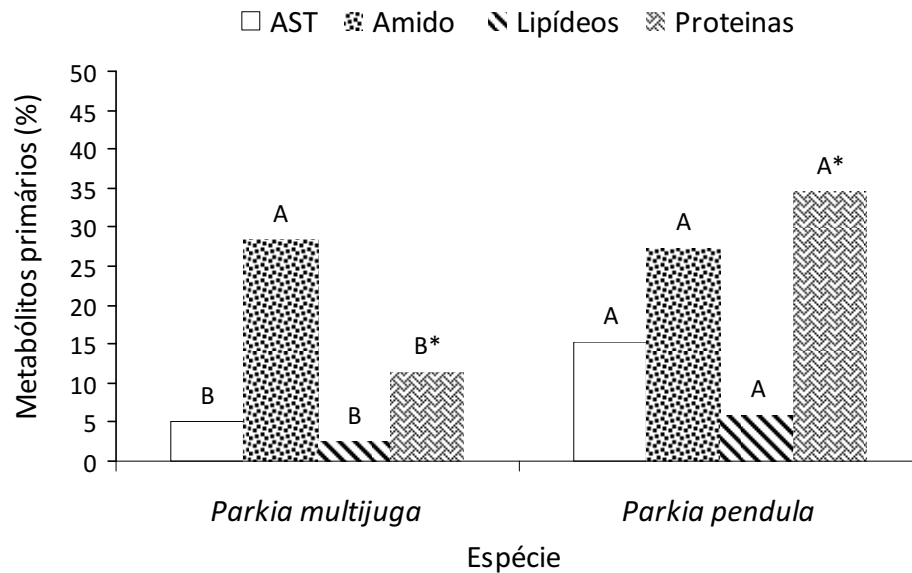
#### 3.4. Análises bioquímicas dos metabólitos primários

Por meio das análises bioquímicas para determinação dos metabólitos primários foi possível observar que mesmo não tendo sido detectado pelo teste histoquímico com uso de lugol, tanto *P. multijuga* quanto *P. pendula* acumulam quantidades elevadas e similares de amido em seus cotilédones, com 28% e 27% deste composto de reserva, respectivamente (Figura 6).

Sendo o amido o composto de reserva encontrado em maior concentração em sementes de *P. multijuga*, ao passo que em *P. pendula* as proteínas são mais abundantes nos cotilédones da semente (Figura 6). Informações estas, que corroboram com os resultados demonstrados pelo teste histoquímico utilizando-se Xylidine Ponceau (Figura 4B).

Do mesmo modo, verificou-se em estudos utilizando-se cotilédones e eixos embrionários isolados de sementes recém dispersas e não dispersas de *Caesalpinia echinata*, que o amido é um importante composto de reserva dessa semente, sendo este polissacarídeo encontrado, principalmente, nos cotilédones, correspondendo a 20%-30% da massa seca (Hellmann *et al.*, 2008). Cotilédones de sementes de *Apuleia leiocarpa* também apresentam amido no interior de suas células (Pontes *et al.*, 2002).

Com exceção ao amido, a concentração de açúcares solúveis totais (AST), a de lipídeos totais e proteínas totais foram significativamente maiores em cotilédones de *P. pendula* (Figura 6). Diferentemente dos resultados obtidos para as Parkias, sementes quiescentes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. apresentam menor teor de amido ( $4,3 \text{ mg g}^{-1}$ ) e maior de açúcares solúveis totais ( $31,0 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Dantas *et al.*, 2008).



**Figura 6:** Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST), amido, lipídeos e proteínas em cotilédones de sementes quiescentes de duas espécies arbóreas da flora amazônica. \*Nitrogênio total x 5,71 = proteínas totais. Letras comparam os metabólitos primários entre as espécies pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim como em sementes da espécie *P. pendula*, altos teores de proteínas, amido e açúcares solúveis totais foram observados em sementes de quiescentes de *Bauhinia variegata* (Leguminosae-Caesalpinoideae), com 29, 20 e 13%, respectivamente (Pinto *et al.*, 2005).

Para *Caesalpinia peltophoroides*, uma leguminosa pertencente à subfamília Caesalpinoideae, foram obtidos teores de 50%, 32,2%, 7,7% e 6,8% para lipídios, carboidratos solúveis, amido e proteínas solúveis, respectivamente (Corte *et al.*, 2006).

Para sementes de leguminosas do Cerrado (*Acosmium subelegans*, *Anadenanthera peregrina* var. *falcata*, *Andira laurifolia*, *Copaifera langsdorfii*, *Crotalaria flavicoma*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa* e *Inga uraguensis*), os teores de AST variaram de 5 a 39%, de amido entre 0,11 a 56%, de proteínas de 9 a 30% e de lipídeos entre 0,24 a 13% (Sasaki, 2008).

No que diz respeito à espécies de leguminosas arbóreas da flora amazônica, as sementes de *Andira parviflora*, *Hymenaea parviflora* e *Parkia pendula*, apresentaram teores de AST que variaram de 1,0 a 14,0%, de amido de 22,0 a 59,0%, de óleos de 1,4 a 28,5% e de proteínas de 12,9 a 35,08% (Gonçalves *et al.*, 2002). Com exceção do conteúdo de lipídeos na semente de *P. pendula*, os demais compostos encontram-se em quantidades similares ao encontrado no presente trabalho.

De maneira mais pontual, diferenças foram observadas entre as duas espécies em estudo no que diz respeito à composição dos lipídeos totais extraídos dos cotilédones.

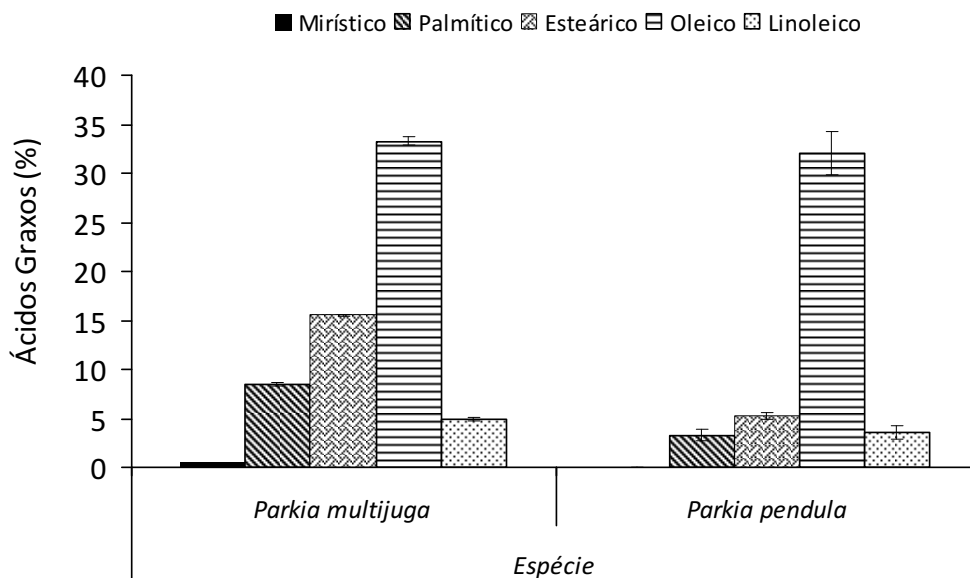
Com o desdobramento da composição dos ácidos graxos constituintes dos lipídeos totais, foi possível observar que o ácido oléico compõe a maior porcentagem lipídica dos cotilédones das sementes, tanto em *P. multijuga* quanto em *P. pendula*, com 33% e 31%, respectivamente (Figura 7). Deste modo, nota-se que ambas as espécies armazenam no citoplasma das células dos cotilédones, predominantemente o ácido graxo insaturado que apresenta apenas uma insaturação em sua cadeia carbônica (C<sub>18:1</sub>).

Do mesmo modo, em sementes de *Bertholletia excelsa*, *Andira parviflora* e *Parkia pendula*, foram obtidos predominantemente ácidos graxos insaturados (Gonçalves *et al.*, 2002). Corroborando com os resultados deste. Por outro lado, diferentemente dos resultados para ácidos graxos saturados, no que concerne os ácidos graxos saturados, autores acima mencionados obtiveram o ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>) como o principal ácido graxo saturado para diferentes espécies da flora amazônica, neste estudo o principal ácido graxo saturado foi o esteárico (C<sub>18:0</sub>) para as duas *Parkias*.



Em outras espécies leguminosas, como por exemplo, em *Bauhinia racemosa* (Mohan & Janadhajan, 1994) e *Bauhinia variegata* (Pinto *et al.*, 2005) os ácidos palmítico e linoléico, respectivamente, compunham a maior porcentagem lipídica das sementes.

Os demais ácidos graxos como esteárico, palmítico, linoléico e mirístico também foram encontrados em quantidades significativas em sementes de *P. multijuga*. Sendo o ácido mirístico, de menor cadeia carbônica, presente exclusivamente na composição dos lipídeos em sementes desta espécie (Figura 7).



**Figura 7:** Conteúdo de ácidos graxos em cotilédones de sementes quiescentes de duas espécies arbóreas da flora amazônica. Barras significam desvio padrão.

As frações protéicas de albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas ácidas e básicas dos cotilédones das duas espécies em estudo estão ilustradas na tabela 4. Sendo que, o conteúdo da fração globulinas foi quantitativamente superior ao das demais frações protéicas, com 4,4% para *P. multijuga* e 15% para *P. pendula*.

Demonstrando ser a fração glubulínica, a classe de proteínas majoritária na composição protéica de cotilédones das sementes de Fabaceae-Mimosoideae em estudo. Esses resultados indicam que a concentração de proteínas varia entre as espécies, confirmando que as concentrações relativas dessas reservas podem variar entre as espécies e até entre espécies pertencentes à mesma família (Corte *et al.*, 2006).

**Tabela 4.** Fracionamento de proteínas de reserva em sementes quiescentes de duas espécies florestais pertencentes à família Fabaceae-Mimosoideae. Letras comparam as médias nas colunas pelo teste t de student a 5% de probabilidade.

Espécie	Classe Protéica (%)					
	Prolaminas	Albuminas	Globulinas	Glut. Básicas	Glut. Ácidas	Prot. Totais
<i>P. multijuga</i>	0,27±0,01 A	2,7±0,1 A	4,4±0,1 B	2,4±0,94 B	0,1±0,06 B	9,9±1,2 B
<i>P. pendula</i>	0,47± 0,01A	1,6±0,1 B	15,0±2,1 A	7,5±0,43 A	0,8±0,14 A	25,6±2,3 A

Médias ± desvio padrão

O conteúdo de proteínas de reserva observados em sementes são bastante variáveis, mesmo para espécies da mesma família (Bewley, 1997). Em sementes de *Caesalpinia pyramidalis*, nos cotilédones de sementes quiescentes verificou-se conteúdos das frações albuminas, glutelinas, globulinas e prolaminas, com aproximadamente 180, 38, 25 e 19 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente (Dantas *et al.*, 2008). Para sementes quiescentes de *Bauhinia variegata* (Fabaceae-Caesalpinioideae) a fração globulinica representou 66% do teor de proteínas da semente (Pinto *et al.*, 2005).

Em relação ao conteúdo de proteínas totais, observa-se que cotilédones de *P. pendula* apresentam concentração significativamente superior, cerca de duas vezes e meia maior que *P. multijuga* (Tabela 4). Os teores de proteínas totais variaram cerca de 2 a 9% e foram mais elevados nos extratos totais de *Sesbania exasperata* e *Ormosia costulata*, com 5,1 e 8,9%, respectivamente, para as espécies pertencentes à sub-família Papilionoideae. Enquanto que, em *Tachigali plumbea* (Caesalpinioideae) o conteúdo protéico foi de 2,4% (Chevreuil *et al.*, 2009).

Sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, Fabaceae pertencente à subfamília Caesalpinioideae, com teores de 6,8% de proteínas solúveis (Corte *et al.*, 2006), apresentou valor próximo ao obtido para *P. multijuga* (9,9%). Essas diferenças interespecíficas podem ser explicadas pela diversidade dos fatores do meio de crescimento das plantas matrizes, estágio de maturação dos frutos e sementes quando colhidos e analisados, assim como pela eficiência na extração das metodologias utilizadas.

### 3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

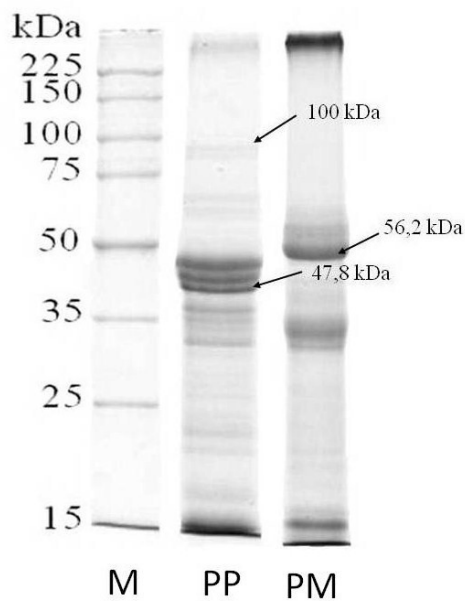
Considerando as globulinas que representam a classe de proteínas majoritária nos cotilédones de ambas as espécies, optou-se pela análise eletroforética apenas desta classe.

O perfil protéico dos extratos da fração globulina revelaram bandas protéicas distintas para as duas espécies. Em sementes quiescentes de *P. pendula* observou-se duas bandas de proteínas com massas moleculares aparentes de 100 kDa e 47,8 kDa, aproximadamente, estando as proteínas com menores massa molecular pouco evidentes (Figura 8-1). Ao passo que, para *P. multijuga* observou-se uma banda de proteínas com massa molecular aparente em torno de 56,2 kDa (Figura 8-2).

Em extratos total de proteínas de sementes de espécies leguminosas arbóreas da Amazônia, o perfil protéico de *Tachigali plúmbea* e *Sesbania exasperata* revelou ocorrência de proteínas com massas moleculares aparentes de 10 kDa a 30 kDa, ao passo que para *Ormosia costulata* observou-se intensa coloração de proteínas com massas moleculares aparentes variando entre 20-25 kDa (Chevreuil *et al.*, 2009).

Em sementes de *Theobroma gradiflorum*, espécie arbórea típica da região Amazônica, em estudos com a classe globulina de proteínas foram observados polipeptídios com massas moleculares aparentes de 14,5, 31 e 47 kDa, e somente globulinas do tipo vicilina (Carvalho *et al.*, 2008). Esses resultados sugerem a presença deste tipo de polipeptídios e globulinas em cotilédones de sementes quiescentes de *P. multijuga* e *P. pendula*, visto a similaridade das massas moleculares.

Na literatura não há registros que em sementes, os vacúolos acumulam corpos protéicos ou proteína e carboidratos solúveis, onde as proteínas mais comuns são globulinas, encontradas nos embriões, e prolaminas, exclusivo para o endosperma dos cereais, e ambas funcionam como reserva de aminoácidos (Marty, 1999).



**Figura 8** – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% das frações globulínicas. M: Marcadores de massa molecular, Promega. PP: Cotilédone de semente quiescente de *Parkia pendula* e PM: Cotilédone de semente quiescente de *Parkia multijuga*.

#### 4. CONCLUSÃO

Do ponto de vista morfoantômico, as sementes da espécie *P. multijuga* são grandes, lanceoladas, esternospérmicas, exotestais, com tegumento ósseo e paredes celulares pectocelulosícas com camada de macrosclereídes de estruturas anatômicas espessas. Ao passo que sementes de *P. pendula* são pequenas, elípticas, esternospérmicas, testais, com tegumento pétreo de paredes celulares pectocelulosícas. Sendo as estruturas anatômicas dos cotilédones e embrião semelhantes, assim como plúmulas bem desenvolvidas com primórdios foliares diferenciados em ambas as espécies.

Considerando o ponto de vista bioquímico, a espécie *P. multijuga* acumula predominantemente carboidrato na forma de amido e *P. pendula* proteínas, como principais compostos de reservas nos cotilédones. Sendo que, a constituição das proteínas e dos lipídeos é semelhante entre as duas espécies.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, A.C.S.; Ramos, F.N.; Souza, A.F.; Loureiro, M.B.; Souza, A.D.O. & Cruz, A.P.M. 2001. Tamanho mínimo e preparo da amostra na determinação do grau de umidade de sementes de *Parkia multijuga* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae). *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.25, n.2, p.203-207.
- Antunes, N.B.; Ribeiro, J.F. & Salomão, A.N. 1998. Caracterização de frutos e sementes de seis espécies vegetais em matas de galeria do Distrito Federal. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.20, n.1, p.112-119.
- Araújo Neto, J.C. et al. 2002a. Caracterização morfológica de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de monjoleiro (*Acacia polyphylla* DC.). *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 24, n. 1, p. 203-211.
- Ascensão, L. 2004. Métodos histoquímicos em vegetais. In: Tópicos especiais em Histoquímica Vegetal. Universidade Federal de Viçosa, 2004. *Apostila*. 22 p.
- Barroso, G.M. 1984. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa. UFV. v.2. 337p.
- Barroso, G.M.; Amorim, M.P.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L.F. 1999. *Frutos e sementes. Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. Viçosa: UFV.
- Beltrati, C. M. 1994. *Morfologia e anatomia de sementes*. Rio Claro: UNESP, 108 p. (Apostila do curso de pós-graduação).
- Beltrati, C.M. & Paoli, A.S. 2006. *Semente*. p. 399-424. In: Appezzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. *Anatomia vegetal*. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV.
- Bewley, J. D. & Black, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. 2<sup>nd</sup>. New York: Plenum.
- Bewley, J.D. & Black, M. 1983. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination*. New York: Springer-Verlag.
- Bewley, J.D. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055-1066.
- Bitencourt, G.A.; Resende, U.M. & Favero, S. 2008. Descrição morfo-anatômica das sementes de *Senna occidentalis* (L.) link. (Fabaceae-Caesalpinioideae) e *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). *Revista de Biologia e Farmácia*. vol. 03, n. 01.
- Black, M.; Corbineau, F.; Grzesik, M; Guy, P. & Côme, D. 1996. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 47, n. 295, p. 161-169.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. San Diego, v 72. P 248-254.
- Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. 2009. *Regras para Análise de Sementes*. Brasília. 398p.
- Braz, M.S.S.; Souza, V.C.; Andrade, L.A.; Bruno, R.L.A.; Oliveira, L.S.B. & Silva, J.M. 2009. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All.ex. Benth) Leguminosae-Papilionoideae. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. v.4, n.1, p.67-71.
- Buckeridge, M.S.; Santos, H.P.; Tiné, M.A. & Aidar, M.P.M. 2004. *Acúmulo de reservas*. In: Ferreira, A.G.; Borguetti, F. (Eds). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p.31-50.
- Bukart, A. 1952. *Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas*. ACNE Agency, Buenos Aires. 560p.
- Burke, M.J.W. & Grime, J.P. 1996. An experimental study of plant community invisibility. *Ecology*, 77: 776-790.
- Calvi, G.P.; Audd, F.F.; Vieira, G. & Ferraz, I.D.K. 2008. Tratamentos de pré-embebição para aumento do desempenhoda germinação de sementes de *Parkia multijuga* Benth. *Revista Forestal Latinoamericana*, 23(2):53-65.
- Camara, C.A.; Neto, J.C.A.; Ferreira, V.M.; Alves, E.U. & Moura, F.B.P. 2008. Caracterização morfométrica de frutos e sementes e efeito da temperatura na germinação de *Parkia pendula* (Willd.) Benth. Ex Walp. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 18, n. 3, p. 281-290.
- Carvalho, A.V.; García, N.H.P. & Farfán, J.A. 2008. Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. Campinas, 28(4): 986-993.
- Chevreuil, L.R.; Gonçalves, J.F.C.; Bariani, A.; Rodrigues, J.V.F.C. & Pando, S.C. 2009. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. *Acta Amazonica*. vol. 39(1): p.199-206.
- Corner, E. J. H. 1976. *The seeds of dicotyledons*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Corte, V.B.; Borges, E.E.de.L.; Pontes, C.A.; Leite, I.T.de.A.; Ventrella, M.C. & Mathias, A. de. A. 2006. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae Caesalpinoideae). Viçosa–MG, *Revista Árvore*, 30 (6): 941-949.

- Corte, V.B.; Ventrella, M.C.; Borges, E.E.L.; Pontes, C.A. & Pinho, D. 2009. Histochemical and ultrastructural study of *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae) seeds. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.33,n.5, p.873-883.
- Dalling, M.J. & Bhalla, P. 1984. Mobilization of nitrogen and phosphorus from endosperm. In: Murray, D.R. *Seed Physiology: Germination and reserve mobilization*. vol. 2, 295 p.
- Dantas, B.F.; Correia, J.S.; Marinho, L.B. & Aragão, C.A. 2008. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.). *Revista Brasileira de sementes*. Vol. 30, n.1, p. 221-227.
- Donadio, N.M.M. & Demattê, M.E.S.P. 2000. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng) Taub.) e jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex Benth.) – Fabaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, 22: 64-73.
- Dubois, M.; Gillews, K.A.; Hamilton, J.K.; Reber, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, Washington, 28 (3): 350-356.
- Ducke, A. 1949. Notas sobre a flora neotropical II. *Bol. Tec. Inst. Agron. Norte*, n. 18, 248p.
- Ducke, A. 1965. Keys for the identification of seedlings of some preeminent wood species in eight forest types in Puerto Rico. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Columbus. 52(3):314-350.
- Embrapa. 1999. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: Embrapa. Solos/Embrapa Informática Agropecuária/Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 370p.
- Ezeagu, I. E.; Petzke, J. K.; Metges, C. C.; Akinsoyinu, A. O. & Ologhobo, A. D. 2002. Seed protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for some uncultivated tropical plant seeds. *Food Chemistry*, 78: 105-109.
- Ferraz, I.D.K.; Filho, Imakawa, A.M.; Varela, V.P. & Piña-Rodrigues, F.C.M. 2004. Características básicas para um agrupamento ecológico preliminar de espécies madeiras da floresta de terra firme da Amazônia Central. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 34, n. 4, p. 621-633.
- Ferreira, R.A.; Davide, A.C.; Tonetti, O.A.O. 2001. Morfologia de sementes e plântulas de pau-terra (*Qualea grandiflora* Mart. – Vochysiaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.23, n.1, p.116-122.



- Figueiredo, A.C.S.; Barroso, J.M.G.; Pedro, L.M.G. & Ascensão, L. 2007. *Histoquímica e Citoquímica em Plantas: princípios e protocolos*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal. 68p.
- Gonçalves, J.F.de.C.; Fernandes, A.V.; Oliveira, A.F.M.; Rodrigues, L.F. & Marengo, R.A. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilia Amazon tree species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14:139-142.
- Guimarães, R.M. 1999. *Fisiologia de sementes – produção e tecnologia de sementes*. Lavras: UFLA/FAEPE, 129p.
- Gunn, C.R. 1972. Seed collecting and identification. In: KOZLOWSKI, T. T. *Seed biology*. New York: Academic Press, v.1. p.1-20.
- Gunn, C.R. 1984. Fruits and seeds of genera in the subfamily Mimosoideae (Fabaceae). Springfield: United States. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. *Technical Bulletin 1681*.
- Gunn, C.R.. 1991. Fruits and seeds of genera in subfamily Caesalpinioideae (Fabaceae). Springfield: United States. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. *Technical Bulletin 1755*.
- Harper, J.L.; Lovel, P.H. & Moore, K.G. 1970. The shapes and sizes of seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 327-356.
- Hellmann, M.E.; Mello, J.I.O.; Barbedo, C.J. & Figueiredo-ribeiro, R.C. L. 2008. variações dos carboidratos de reserva de sementes de caesalpinia echinata (pau-brasil) armazenadas sob diferentes temperaturas. *Hoehnea* 35(2): 255-264.
- Hopkins, H.C. 1983. The taxonomy, reproductive biology and economic potential of *Parkia* (Leguminosae:Mimosoideae) in Africa and Madagascar. *Linnean Society*, 87: 135-167.
- Hopkins, H.C. 1986. *Parkia* (Leguminosae:Mimosoideae). *Flora Neotropica: Monograph n° 1*: 1-123.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. 1999. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland, USA, 464p.
- Kerbaui, G.B. 2004. *Fisiologia vegetal*. Universidade de São Paulo. p.386-408.
- Kitajima, K. & Fenner, M. 2000. *Ecology of seedling regeneration*. Pp. 331-359. In: Fenner, M (ed.). *Seeds - the ecology of regeneration in plant communities*. Wallingford, CAB International.

- Kuniyoshi, Y.S. 1983. Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária. Curitiba, 233p. (Dissertação de mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Ledo, A.S.; Filho, S.M.; Ledo, F.J.S. & Araújo, E.C. 2002. Efeito do tamanho da semente, do substrato e do pré-tratamento na germinação de sementes de pupunha. *Ciência Agrônômica*, Fortaleza, v.33, n.1, p.29-32.
- Leishman, M.R.; Wright, I.J.; Moles, A.T. & Westoby, M. 2000. *The evolutionary ecology of seed size*. Pp. 31-57. In: Fenner, M (ed.). *Seeds – the ecology of regeneration in plant communities*. Wallingford, CAB International.
- Lewis, G.P. 1987. Legumes of Bahia. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Lima, H.C.; Correia, C.M.B. & Farias, D.S. 1994. *Leguminosae*. In: Lima, M.P.M. & Guedes-Bruni, R.R. (eds). Reserva Ecológica de Macaé de Cima: Nova Friburgo-RJ: Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares. Jard. Bot. Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p.167-228.
- Lopes, R.M.F.; Freitas, V.L.O. & Lemos Filho, J.P. 2010. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Plathymenia reticulata* Benth. e *Plathymenia foliolosa* Benth. (Fabaceae - Mimosoideae). *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.34, n.5, p.797-805.
- Lorenzi, H. 1992. Árvores brasileiras : manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, v.1. 352 p.
- Lorenzi, H. 2000. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultura de espécies arbóreas do Brasil. 3.ed. Nova Odessa: Plantarum, v.1. 368p.
- Loureiro, A.A. 2000. et al. Essências madeireiras da Amazônia. Manaus: MCT/INPA-CPPF, v.4. 191p.
- Luizão, F.J. & Vasconcelos, H.L. 2005. Floresta tropical úmida (Manaus). Site 1. INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Depto. Ecologia.
- Marty, F. 1999. Plant vacuoles. *Plant Cell*, v.11, n.4, p.587-599.
- Melo, Z.L. DE O.; Gonçalves, J.F. DE C.; Mazzafera, P. & Santos, D.Y.A.C. DOS. 2009. Mobilization of seed reserves durin germination of tropical species of the Amazon Rainforest. *Seed Sci. & Technol.*, 37, 597-607.
- Melo-Pinna, G.F.A., Neiva, M.S.M. & Barbosa, D.C.A. 1999. Estrutura do tegumento seminal de quatro espécies de Leguminosae (Caesalpinioideae), ocorrentes numa área de caatinga (PE – Brasil). São Paulo: *Revista Brasileira de Botânica*, v.22.

- Mohan, V.R. & Janadhajan, K. 1994. Chemical and nutritional evaluation of two permoplasts of the tribal pulse, *Bauhinia racemosa* Lamk. *Plant Foods for Human Nutrition*, Spring, v.46, n.4, p.367-374.
- Müntz, K.; Belozersky, M.A.; Dunaevsky, Y.E.; Schlereth, A. & Tiedemann, J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, v.52, n.362, p.1741-1752.
- Muniz, G.I.B. 1986. Descrição da estrutura e ultraestrutura da madeira de cinco espécies de *Prosopis* da Argentina e análises a metodologia. Dissertação de Mestrado. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 192p.
- Nogueira, F.C.B.; Filho, S.M. & Gallão, M.I. 2010. Caracterização da germinação e morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Dalbergia cearensis* Ducke (pau-violeta) – Fabaceae. *Acta bot. bras.* 24(4): 978-985.
- O'brien, T.P. & Mccully, M.E. 1981. *The study of plant structure. Principles and selected methods*. Melbourne: Termarcaphipty.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59(2): 368-373.
- Osborne, T.B. 1924. *The vegetable proteins*. 2.ed. London: Longmans Green and company, p.154.
- Paulino, J.V.; Pessine, E. & Teixeira, S. P. 2010. Estudos morfoanatômicos da semente e da plântula de espécies de Anileiras (*Indigofera* L., Leguminosae). *Acta bot. bras.* 24(1):1-7.
- Pinto, L.S.; Neto, M.A; Bacarin, M.A; Castellón, R.R; Gadelha, T.S.; Gadelha, C.A. & Cavada, B.S. 2005 .Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata* L. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. V.9, n.3, p.385-390.
- Pontes, C.A.; Borges, E.E.L.; Borges, R.C.G. & Soares, C.P.B. 2002. Mobilização de reserva em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. *Revista Árvore*, Viçosa, v.26, n.5, p.593-601.
- Popinigis, F. 1977. *Qualidade fisiológica de sementes*. Sementes, v.1, n.1, p.65-80.
- Ramos, M.B.P. & Ferraz, I.D.K. 2008. Estudos morfológicos de frutos, sementes e plântulas de *Enterolobium schomburgkii* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae). *Revista Brasileira de Botânica* 31: 227-235.

- Rosseto, J.; Albuquerque, M.C.F.; Neto, R.M.R. & Silva, I.C.O. 2009. Germinação de sementes de *Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp. (Fabaceae) em diferentes temperaturas. *R. Árvore*, Viçosa-MG, v.33, n.1, p.47-55.
- Sasaki, M. 2008. Lipídios, carboidratos e proteínas de sementes de leguminosas do cerrado. Dissertação de Mestrado - São Paulo. 75p.
- Scatena, V.L. & Scremin-Dias, E. 2006. *Parênquima, Colênquima e Esclerênquima*. p. 109-119. IN: Appezzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. *Anatomia vegetal*. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV.
- Silva, D.J. 1990. Análise de alimentos-métodos químicos e biológicos. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 165p.
- Simpson, M.G. 2006. *Plant Systematics*. Amsterdam, Elsevier-Academic Press.
- Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson, A.; Stevenson, D.W. & Heald, S.V. 2004. *Flowering Plants of the Neotropics*. New York, New York Botanical Garden, Princeton University Press. p. 151-156.
- Souza, L.A. & Oliveira, J.H.G. 2004. Morfologia e anatomia das plântulas de *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb e *T. chrysotricha* (Mart. ex Dc.) Standl. (Bignoniaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v.26, n.2, p.217-226.
- Souza, L.A. & Paoli, A.A.S. 2009. *Estrutura da semente*. In: *Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação*. Ponta Grossa, PR: TODAPALAVRA, p.17-87.
- Souza, M.H.; Magliano, M.M.; Camargos, J.A.A. 1997. *Madeiras tropicais brasileiras*. Brasília: IBAMA/LPF, 157p.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2005. *Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa, Instituto Plantarum. p. 291-328.
- Stearn, W.T. 1983. *Descriptive terminology*. In: *Botanical Latin*: Hafner Publishing Company. p.311-357.
- Trombs, M.P. 1967. Protein bodies of the soybean. *Plant Physiology*, n.42, p.797-813.
- Vidal, B.C. & Pimentel, E.R. 1985. Caracterização bioquímica, topográfica e estrutural dos corpos protéicos do feijão macuco ou jacatupé (*Pachyrhizus tuberosus* (Lam) Spreng). *Revista Brasileira de botânica*, n.8, p.223-229.

## CAPÍTULO II

### CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Parkia multijuga* Benth. E *Parkia pendula* (Willd.) Benth. SOB NÍVEIS CRESCENTES DE TEMPERATURA

**RESUMO** - Características morfológicas e fisiológicas da germinação de sementes de *Parkia multijuga* Benth. e *Parkia pendula* (Willd.) Benth. sob níveis crescentes de temperatura. As sementes podem apresentar comportamento variável em função da temperatura de germinação, não havendo uma ótima para todas as espécies, podendo estar associada às características ecológicas de cada espécie. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar o comportamento germinativo das espécies florestais *Parkia multijuga* e *Parkia pendula*, sob temperaturas crescentes. As sementes foram semeadas em caixas plásticas do tipo gerbox utilizando-se papel germitest como substrato e acondicionadas em câmara de germinação com temperaturas constantes de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C, com fotoperíodo de 12 horas. A germinação foi avaliada diariamente, sendo posteriormente determinados a porcentagem, índice de velocidade e o tempo médio de germinação. Assim como as características morfológicas da germinação e desenvolvimento inicial da plântula. Sementes de espécie *P. multijuga* apresentam maior porcentagem de germinação, com maior índice de velocidade e menor intervalo de tempo sob temperaturas de 30 a 35°C, ao passo que para *P. pendula* os melhores resultados foram obtidos sob as temperaturas de 25 a 30°C. Para *P. multijuga* a protrusão da raiz primária ocorreu a partir do sétimo dia e para *P. pendula* a partir do terceiro dia após a semeadura, sendo que para a primeira, a germinação foi classificada como hipógea-criptocotiledonar e para a segunda, epígea-fanerocotiledonar.

**Palavras-chave:** Fisiologia da germinação, morfologia, sementes florestais, Fabaceae.

## 1. INTRODUÇÃO

Como consequência da destruição e degradação dos ecossistemas brasileiros, com consequente preocupação da restauração ecológica dos mesmos, houve a intensificação dos estudos e projetos neste sentido (Rodrigues *et al.*, 2007; Wuethrich, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009), o qual tem aumentado a demanda por mudas de espécies arbóreas nativas (Viani & Rodrigues, 2007), seja visando a obtenção de informações que expressem a qualidade fisiológica das sementes, tanto para sua preservação como para a utilização dessas espécies vegetais com os mais variados interesses (Mondo *et al.*, 2008).

No que se refere à produção de mudas, essa demanda tem estimulado a comercialização de sementes de diversas espécies arbóreas, embora não haja, atualmente, garantia de um padrão mínimo de germinação, como ocorre para as sementes de espécies agrônômicas (Brancalion *et al.*, 2010).

O principal atributo da qualidade a ser considerado é a capacidade germinativa das sementes, pois, sem ela, a semente não tem valor para a semeadura, e dela também depende a qualidade das mudas e o sucesso dos plantios (Valadares & Paula, 2008). Neste sentido, o teste de germinação representa o principal parâmetro de avaliação da qualidade fisiológica das sementes (Martins *et al.*, 2008). Paralelamente, a germinação a descrição morfológica de plântulas auxiliam estudos ligados à germinação e suas ilustrações fornecem subsídios para padronizar testes de germinação em laboratório (Silva *et al.*, 1995). Ademais, todas estas atividades técnicas podem contribuir para adequado diagnóstico das sementes para fins comerciais (Oliveira, 1993).

Biologicamente, para que ocorra a germinação das sementes, é necessário que uma série de fatores intrínsecos a semente e inerentes ao meio externo sejam favoráveis. Dentre os fatores do meio que exercem influência sobre a germinação, a temperatura atua sobre a velocidade de absorção de água e também sobre as reações bioquímicas que determinam todo o processo germinativo e, em consequência, afeta tanto a velocidade quanto a uniformidade de germinação, como a germinação total (Carvalho & Nakagawa, 2000).

As sementes apresentam comportamento variável em função da temperatura, não havendo uma temperatura ótima para todas as espécies, podendo estar associada às características ecológicas de cada espécie (Borges & Rena, 1993; Sousa-Silva *et al.*, 2001). Sendo consideradas ideais, a temperatura ou faixas de temperaturas, em que as sementes expressem seu máximo potencial genético, obtendo-se o máximo de germinação no menor espaço de tempo possível (Carvalho & Nakagawa, 2000). Considera-se temperatura ótima

aquela que possibilita a combinação mais eficiente entre a porcentagem e a velocidade de germinação (Marcos Filho, 2005).

Espécies florestais subtropicais e tropicais brasileiras estudadas sob tratamentos de diferentes temperaturas com ótima de germinação exibidas entre faixa de 20 e 30°C, uma vez que estas são temperaturas encontradas em suas regiões de origem, durante a época propícia para a germinação natural das sementes (Borges & Rena, 1993).

Em estudo com base em levantamento bibliográfico sobre a temperatura ótima para germinação de sementes de 272 espécies arbóreas brasileiras, pertencentes aos biomas Cerrado, Mata Atlântica e Amazônia, verificou-se que os testes de germinação podem ser conduzidos mediante o uso de temperatura constante de 25°C para sementes dos biomas Cerrado e Mata Atlântica e sob temperatura de 30°C para espécies da Amazônia (Brancalion *et al.*, 2010).

Partindo do princípio de que a temperatura ótima para a germinação é resultado da adaptação fisiológica das sementes às condições ambientais dos locais de ocorrência ou de cultivo da espécie, o presente estudo tem como objetivo investigar o comportamento germinativo de duas espécies florestais da Amazônia, coletadas no mesmo sítio de ocorrência, pertencentes ao mesmo gênero, família e subfamília: *Parkia multijuga* Benth. e *Parkia pendula* (Willd) Benth. sob temperaturas crescentes, visando monitorar variáveis germinativas que identifiquem mais precisamente o melhor desempenho do processo.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Procedência do material biológico

Para realização dos experimentos foram utilizadas sementes das espécies florestais *Parkia multijuga* Benth. e *Parkia pendula* (Willd.) Benth., pertencentes a família Fabaceae e subfamília Mimosoideae, oriundas da Reserva Florestal Adolpho Ducke (26 km ao Norte de Manaus, Brasil - 03°08' S e 59°52' W).

Após a coleta os frutos foram acondicionados em sacos de polietileno e transportados para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (MCTINPA), local onde foi realizado o beneficiamento das sementes e instalação dos experimentos.

### 2.2. Instalação do experimento

#### 2.2.1. Teste de germinação

As sementes passaram por processo de assepsia em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante 10 minutos e lavagens sucessivas com água destilada, posteriormente tiveram sua dormência tegumentar quebrada com desponte ao lado oposto a emissão da radícula e submetidas a embebição em água destilada durante 24 horas. Depois, foram semeadas em caixas plásticas do tipo gerbox (11x11x3,5 cm) utilizando papel germitest como substrato e acondicionadas em câmara de germinação (ELETROlab, modelo EL 202) com temperaturas constantes de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C providas de lâmpadas fluorescentes de luz branca com fotoperíodo de 12:12 horas (luz:escuro).

A avaliação da germinação foi realizada diariamente, sendo consideradas sementes germinadas as que apresentaram emissão de radícula com 5 mm de comprimento. Ao final do teste, que teve duração de 20 dias, foram determinados porcentagem de germinação (Laboriau, 1983), índice de velocidade de germinação (IVG), de acordo com metodologia descrita por Maguire (1962) e tempo médio de germinação (TMG), conforme Edmond & Drapalla (1958), segundo as aplicação das formulas abaixo. As plântulas foram consideradas normais quando alcançaram o estágio em que todas as estruturas essenciais foram precisamente verificadas. Por outro lado, plântulas consideradas anormais apresentaram cotilédones escuros e sem o sistema radicular desenvolvido ou com raiz primária deteriorada.



$$\% \text{ de Germinação} = (\Sigma n_i \cdot N^1) \cdot 100$$

**Onde:**

$\Sigma n_i$  = Número total de sementes germinadas

$N$  = Número de sementes colocadas para germinar

$$TM = (N_1G_1 + N_2G_2 + \dots + N_nG_n) / (G_1 + G_2 + \dots + G_n)$$

**Onde:**

$G_1, G_2, \dots, G_n$  = Números de sementes germinadas no dia da observação

$N_1, N_2, \dots, N_n$  = Número de dias após a semeadura

$$IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$$

**Onde:**

$G_1, G_2, \dots, G_n$  = Número de sementes germinadas

$N_1, N_2, \dots, N_n$  = Número de dias após a semeadura

### 2.2.2. Morfologia da germinação

A fim de descrever a morfologia da germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas, sementes de ambas as espécies foram semeadas tanto em caixas tipo gerbox usando papel germitest como substrato, como semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita como substrato e acondicionadas em câmara de germinação com temperatura constante de 30°C. Para as descrições morfológicas e ilustrações dos caracteres, foram utilizadas as plântulas que se apresentavam mais vigorosas. Entendendo-se como vigorosas aquelas plântulas com todas as suas estruturas essenciais bem desenvolvidas, completas e

proporcionais. Os elementos vegetativos descritos e ilustrados foram raízes primárias e secundárias, colo, hipocótilo, cotilédones, epicótilo e protófilos. As ilustrações foram realizadas manualmente com auxílio de lupa de mesa e microscópio binocular a partir do material fresco.

### 2.3. Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi implantado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x5 (duas espécies e cinco temperaturas: 20, 25, 30, 35 e 40°C), sendo cada tratamento composto por quatro repetições de 25 sementes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. Os dados de porcentagem de germinação (% G), Tempo Médio de Germinação (TMG) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) em função da temperatura, foram submetidos a análises de regressão com posterior ajuste de equações.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Teste de germinação

Os maiores percentuais de germinação para a espécie *P. multijuga* foram verificados sob as temperaturas de 30 e 35°C, com 78 e 81%, respectivamente, ao passo que para *P. pendula* os maiores percentuais foram obtidos sob as temperaturas de 25 e 30°C, com 83 e 87% (Tabela 1). Teoricamente era de se esperar que as duas espécies de *Parkia* não apresentassem diferenças no percentual de germinação, tendo em vista que ocorrem no mesmo local e, portanto, sofrem as mesmas influências abientais. Por outro lado não se pode esquecer que são espécies distintas.

As sementes de *Parkia pendula* apresentaram maiores porcentagens de germinação (100%), de formação de plântulas normais (99%), maiores comprimentos de raiz (4 cm) e de parte aérea (8,5 cm) na temperatura de 30°C (Rosseto *et al.*, 2009).

O processo germinativo foi comparativamente mais rápido para *P. pendula* quando comparado com *P. multijuga*, iniciando-se após o terceiro dia e atingindo o melhor índice de velocidade no quarto dia após semeadura, sob a temperatura de 30°C (Tabela 1).

Para *P. multijuga* verificou-se que, assim como o percentual de germinação, o tempo médio de germinação foi favorecido pelas temperaturas de 30 e 35°C. Entretanto, os melhores índices de velocidade de germinação foram obtidos na faixa de temperatura de 25 a 35°C (Tabela 1). Dessa forma, supõe-se que as temperaturas mais elevadas tenham proporcionado maior atividade metabólica, de forma a acelerar e uniformizar o processo germinativo desta espécie.

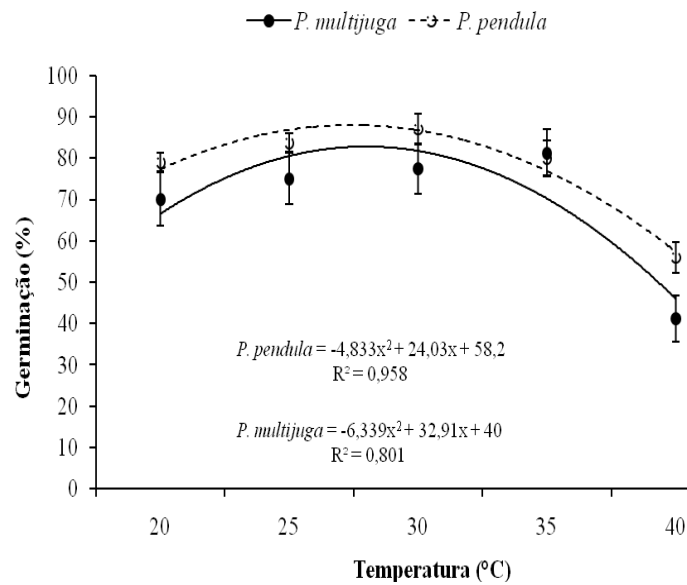
**Tabela 1** – Características germinativas de duas espécies arbóreas Fabaceae-Mimosoideae submetidas a diferentes temperaturas. Germinação (G%), tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG).

Espécie	Temperatura (°C)	Variáveis analisadas		
		G (%)	TMG (dia)	IVG
<i>Parkia multijuga</i>	20	70 c	9,33 d	0,42 b
	25	75 b	7,35 b	0,64 a
	30	78 a	6,34 a	0,71 a
	35	81 a	6,24 a	0,83 a
	40	41 d	8,35 c	0,30 b
<i>Parkia pendula</i>	20	79 b	6,24 e	3,30 c
	25	83 a	4,36 c	5,19 b
	30	86 a	4,06 a	5,70 a
	35	79 b	4,24 b	5,00 b
	40	55 c	5,26 d	3,27 c

Letras comparam as médias nas colunas para cada espécie, a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-knott.

Na figura 1 pode-se observar que as espécies estudadas apresentam comportamento similar quando submetidas a temperaturas crescentes de germinação. Ambas apresentaram bom ajuste de equação frente às temperaturas estudadas, ambas com modelo quadrático negativo, ou seja, a porcentagem de germinação foi influenciada negativamente nos extremos de temperatura (20°C e 40°C) e positivamente nas temperaturas centrais (25 a 35°C), com decréscimos mais acentuados para *P. multijuga*.

Houve redução de 36% na germinação das sementes de *P. multijuga* da temperatura de 30°C para 40°C, ao passo que para *P. pendula* a redução foi de 31%. Esses resultados evidenciam que apesar de apresentarem tendência semelhante, a espécie *P. pendula* ajusta-se melhor a temperaturas mais elevadas.



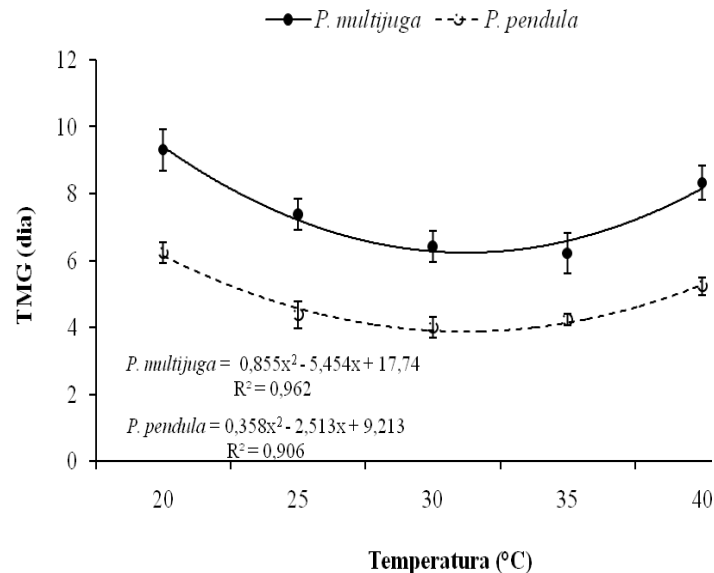
**Figura 1** – Porcentagem de germinação de sementes de *Parkia multijuga* e *Parkia pendula* (Fabaceae-Mimosoideae) submetidas a diferentes temperaturas.

Embora nos extremos de temperaturas (20 e 40°C) tenha sido obtido valores consideráveis de germinação, nestas temperaturas a germinação se deu em um maior intervalo de tempo, enquanto as temperaturas de 25 a 35°C proporcionaram germinação das sementes em menor intervalo de tempo (Figura 2) e maior velocidade de germinação (Figura 3), havendo declínio de ambas as características a partir de 35°C e menor velocidade de germinação em 20°C. Em temperaturas mais baixas, o metabolismo da semente é reduzido, podendo germinar em período mais longo (Amaral & Paulilo, 1992).

Os resultados obtidos para as Parkias neste estudo, são semelhantes aos obtidos para outras espécies Fabaceae-Mimosoideae, como por exemplo, em angico vermelho (*Parapiptadenia rígida*) as maiores percentagens e os maiores índices de velocidade de germinação foram obtidos no intervalo entre 23,7°C e 32,4°C, sob temperaturas constantes (Mondo *et al.*, 2008). Para *Poecilanthe parviflora* (Fabaceae-Faboideae) a temperatura constante de 25°C proporcionou maiores valores de porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e de plântulas normais (Valadadres & Paula, 2008).

Em estudos com espécies do gênero *Dalbergia* (Fabaceae), resultados semelhantes foram obtidos para sementes de *Dalbergia nigra*, que germinaram aos três dias, contudo atingiram os 15 dias com 80% de germinação (Braz *et al.*, 2009), para *Dalbergia brasiliensis* um poder germinativo variável, de 13% a 86%, com início entre 11 a 60 dias após a semeadura

(Carvalho, 2004) e para *Dalbergia cearensis* que atingiu percentual médio de germinação de 70% aos 14 dias (Nogueira *et al.*, 2010).

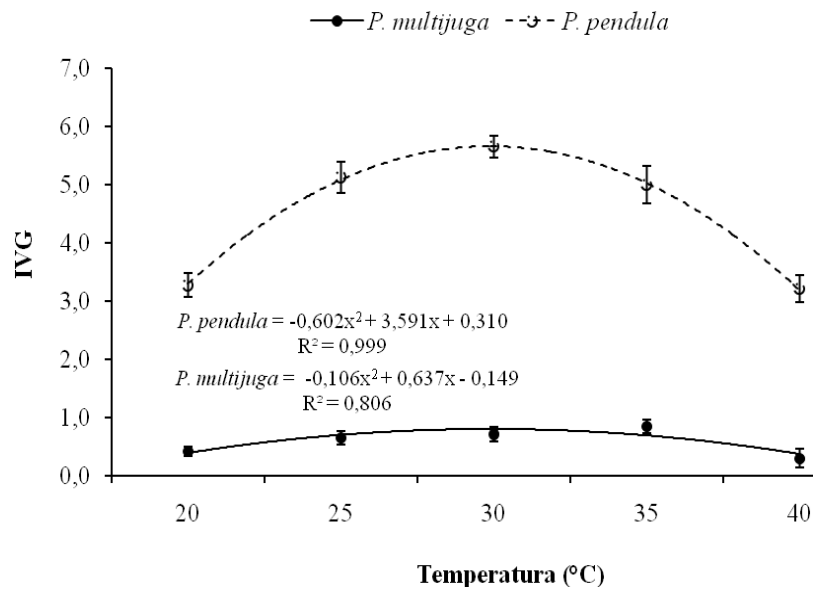


**Figura 2** – Tempo médio de germinação (TMG) de sementes de *Parkia multijuga* e *Parkia pendula* (Fabaceae-Mimosoideae) submetidas a diferentes temperaturas.

Neste estudo é importante observar que, embora as espécies tenham apresentado comportamentos similares e relação às temperaturas, nota-se que há diferença considerável entre elas para o tempo médio de germinação e a velocidade com que a germinação acontece, em todas as temperaturas estudadas (Figuras 1, 2 e 3).

Devido as condições climáticas brasileiras, podem ser encontradas espécies nativas brasileiras com grande plasticidade para temperaturas de germinação. Dentre os fatores limitantes da distribuição geográfica de muitas espécies, pode estar à capacidade das sementes em germinar nas condições climáticas predominantes, ou ainda, as temperaturas experimentadas pela planta-mãe parecem estar entre os determinantes das características de germinação da progênie (Borghetti, 2005).

A variabilidade na germinação pode indicar uma estratégia adaptativa em que a espécie procura distribuir seu período germinativo para aproveitar condições ambientais favoráveis (Oliveira *et al.*, 2006).



**Figura 3** – Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Parkia multijuga* e *Parkia pendula* (Fabaceae-Mimosoideae) submetidas a diferentes temperaturas.

O efeito da temperatura sobre a germinação tem especial importância para a ecologia de populações. Para as sementes serem capazes de germinar, suas temperaturas cardiais devem corresponder às condições externas que asseguram um desenvolvimento suficientemente rápido para as plantas jovens (Larcher, 2000).

Assim como o obtido para *P. pendula*, a faixa de 20 a 30 °C mostra-se adequada para a germinação de grande número de espécies subtropicais e tropicais (Borges & Rena, 1993; Schmidt, 2000). Para as espécies florestais nativas, a temperatura ótima de germinação situa-se entre 15°C e 30°C, a qual está relacionada, normalmente, às temperaturas da região de origem da espécie na época favorável para a germinação (Andrade *et al.*, 2000). A temperatura ótima para a germinação de sementes está diretamente associada às características ecológicas da espécie (Probert, 1992). Para algumas sementes de espécies arbóreas como *Ceiba pentrandia* foi obtido melhor desempenho germinativo sob temperatura de 30°C (Varela *et al.*, 1999), de *Parkia platycephala* (Nascimento *et al.*, 2003), de *Tabebuia impetiginosa* (Oliveira *et al.*, 2005) e de *Caesalpinia ferrea* (Lima *et al.*, 2006). Da mesma forma que para *P. multijuga*, em sementes de *Borojoa sorbilis*, verificou-se que não ocorreram diferenças significativas na germinação nas temperaturas de 30 e 35°C (Braga *et al.*, 1999).

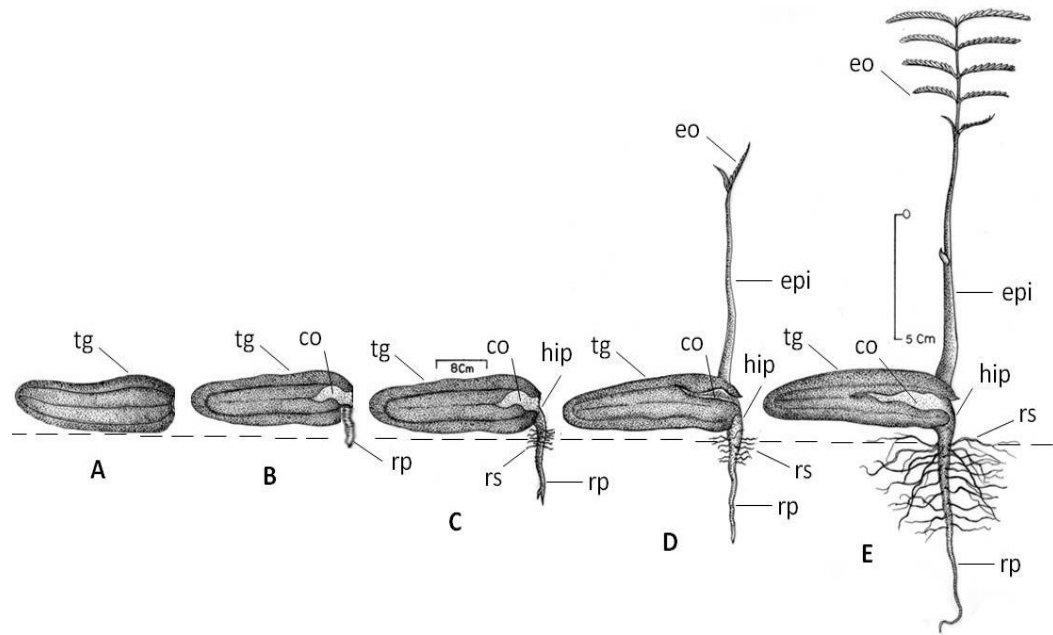
Espécies florestais amazônicas tendem a requerer temperaturas superiores a 20°C para germinação, pois a temperatura média anual nessa região está em torno de 24 a 26°C (Rosseto *et al.* 2009).

### 3.2. Aspectos morfológicos da germinação

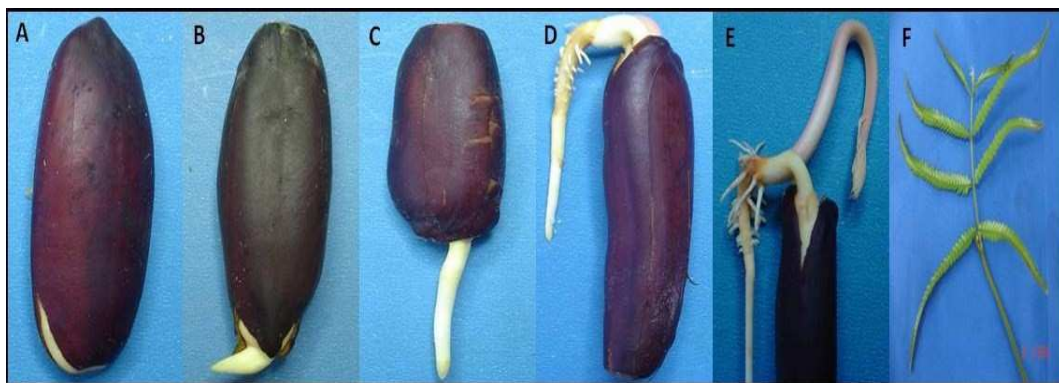
A germinação das sementes de *P. multijuga* foi classificada como hipógea, criptocotiledonar. A germinação hipógea é aquela na qual os cotilédones permanecem no interior do solo (Brasil, 2009; Carvalho & Nakagawa, 2000; Marcos Filho, 2005; Souza, 2003) ou aquela em que os cotilédones ficam ao nível do solo, permanecendo cobertos pelo tegumento (Camargo *et al.*, 2008).

A protrusão da raiz primária ocorreu a partir do sétimo dia após a semeadura, com o rompimento do tegumento e surgimento da radícula do lado oposto ao hilo (Figura 4B e 5B). Durante o processo de germinação, o início do desenvolvimento da plântula é marcado pela protrusão da radícula (Souza, 2003). Inicialmente, a raiz primária apresentava-se na coloração branca leitosa (Figura 5C), após seu alongamento e surgimento das raízes secundárias, se apresentou ferrugínea, com vários primórdios de raízes laterais (Figura 4C e 5D). Observou-se hipocótilo pouco alongado, de coloração branco-amarelado a amarelo-claro, fase esta caracterizada pelo surgimento de um “gancho” espesso de coloração rosada e surgimento das primeiras folhas (eófilos) (Figuras 4D e 5E). Posteriormente, a este estágio, ocorreu o alongamento progressivo do epicótilo, que se apresentava inicialmente curvado e rosado, passando a ser ereto e verde (Figuras 4E). Os cotilédones eram do tipo carnoso (com reservas), permaneceram cobertos pelo tegumento, sendo visível apenas a região próxima ao pecíolo, os mesmos persistem na plântula por um período acima dos 25 dias, período de experimentação (Figura 4B-E e 5A-B-E). Dezesesseis dias após a semeadura, a plântula de *P. multijuga* encontrava-se completamente formada, apresentando folha composta e bipinada (Figuras 4E e 5F).





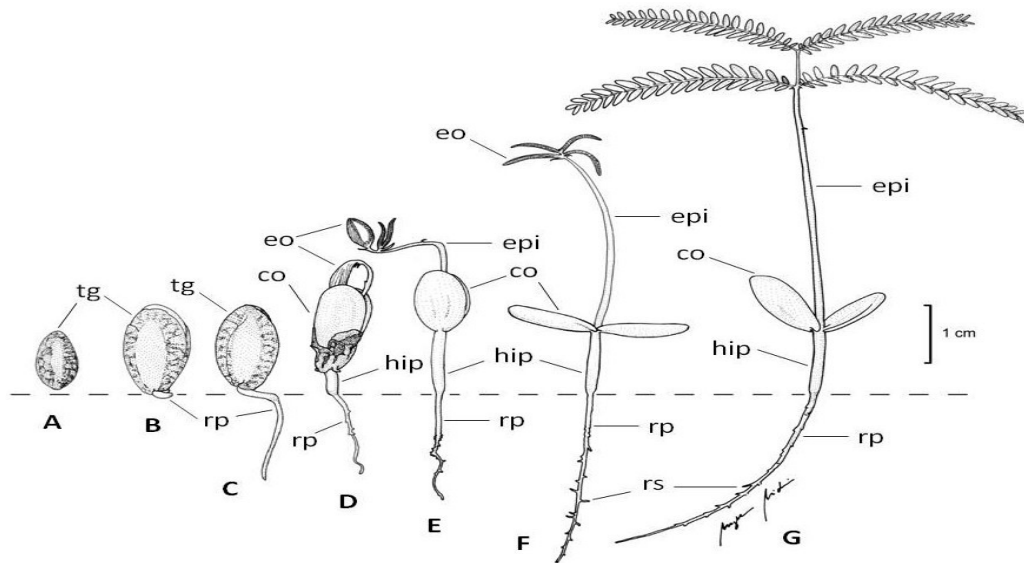
**Figura 4** – Aspectos morfológicos da germinação de sementes de *Parkia multijuga* Benth (Fabaceae-Mimosoideae). **A** – semente quiescente, **B** – Protrusão da raiz (7 dias), **C** – Alongamento radicular (9 dias), **D** – Alongamento do epicótilo e expansão das primeiras folhas (12 dias), **E** – Plântula completamente formada (16 dias). Legenda: tg – tegumento, eo – eófilo, epi – epicótilo, co – cotilédones, hip – hipocótilo, rp – raiz primária, rs – raiz secundária.



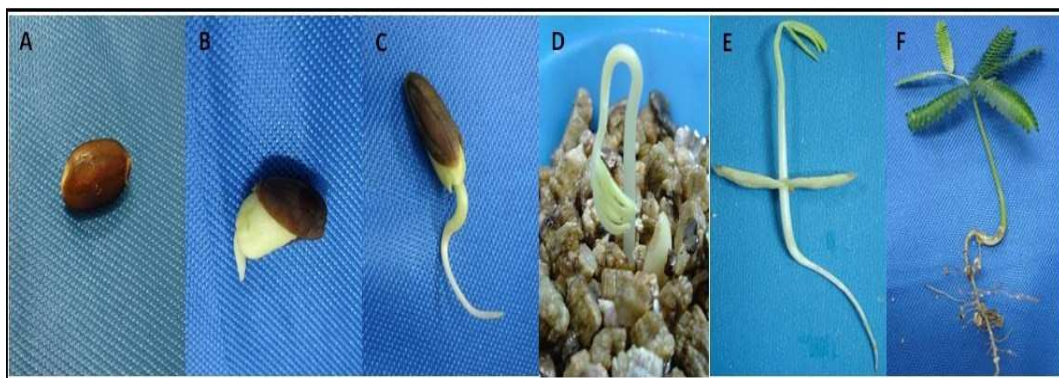
**Figura 5** – Estádios de desenvolvimento de plântulas de *Parkia multijuga* Benth (Fabaceae-Mimosoideae), germinadas em bandeja plástica contendo vermiculita como substrato e incubadas sob temperatura de 30°C durante 25 dias. **A** – semente quiescente embebida, **B** – Protrusão da raiz (7 dias), **C** – Alongamento radicular (9 dias), **D** – Surgimento de raízes secundárias (10 dias), **E** – Alongamento do epicótilo e expansão das primeiras folhas (12 dias), **F** – Plântula completamente formada (16 dias).

Ao contrário do observado para de *P. multijuga*, a germinação das sementes da espécie *P. pendula* iniciou ao terceiro dia após sementeira e, foi classificada como epígea, fanerocotiledonar. Para esta espécie, observou-se claramente que os cotilédones foram elevados acima do nível do solo, pelo alongamento do hipocótilo. Resultados estes que discordam as observações feitas por Camargo *et al.*, (2008), onde classificaram a germinação desta espécie como hipógea fanerocotiledonar.

A germinação do tipo epígea é a forma mais comum de germinação encontrada na maioria das leguminosas, conforme Duke & Polhill (1981). A radícula rompe o tegumento na base apresentando-se curta, glabra, de cor branca e ápice pontiagudo (Figuras 6B e 7B). A raiz primária apresenta rápido desenvolvimento, inicialmente grossa, passando a fina com dilatação na base; cilíndrica, tenra, esbranquiçada e com coifa amarelada (Figuras 6C e 7C). O hipocótilo é inicialmente curvado (“gancho”) até tornar-se reto (a partir do sexto dia de sementeira), curto, entretanto, bem mais evidente que em *P. multijuga*, cilíndrico, tenro, glabro, de coloração verde clara (Figuras 6D e 7D). As primeiras raízes secundárias nascem imediatamente abaixo do colo, que é bem evidenciado pelo maior diâmetro do hipocótilo (Figura 6F). Cotilédones de reserva persistem por 9 a 12 dias na plântula, iguais, ligeiramente côncavos, branco-amarelados, opostos, glabros e sésseis, de consistência carnosa (Figuras 6F-G e 7F). Epicótilo tenro, cilíndrico, verde-claro, alongado, eretos, glabro e em seu ápice acha-se a plúmula no início de seu desenvolvimento (Figuras 7E). No estágio final do desenvolvimento, o epicótilo adquire a coloração verde a marrom, apresentando folhas compostas e bipinadas (Figura 7F).



**Figura 6** – Aspectos morfológicos da germinação de sementes de *Parkia pendula* (Willd.). Benth. (Fabaceae-Mimosoideae): **A** – semente quiescente, **B** – Protrusão da raiz (3 dias), **C** – Alongamento radicular (5 dias), **D** – Gancho plumular (6 dias), **E** – Alongamento do hipocótilo (7 dias), **F** – Abertura dos cotilédones (8 dias), **G** – Plântula completamente formada (9 dias). Legenda: tg – tegumento, eo – eófilo, epi – epicótilo, co – cotilédones, hip – hipocótilo, rp – raiz primária, rs – raiz secundária.



**Figura 7** – Estádios de desenvolvimento de plântulas de *Parkia pendula* (Willd.). Benth (Fabaceae-Mimosoideae), germinadas em bandeja plástica contendo vermiculita como substrato e incubadas sob temperatura de 30°C durante 25 dias. **A** – semente quiescente embebida, **B** – Protrusão da raiz (3 dias), **C** – Alongamento radicular (5 dias), **D** – Gancho plumular (6 dias), **E** – Abertura dos cotilédones com alongamento do hipocótilo (7 dias), **F** – Plântula completamente formada (9 dias).

#### 4. CONCLUSÃO

✓ A germinação da semente de *P. multijuga* é hipógea-criptocotiledonar, sendo a máxima germinabilidade das sementes obtidas nas temperaturas constantes entre 30 e 35°C; proporcionaram os maiores valores de porcentagem e velocidade de germinação.

✓ Para a espécie *P. pendula* a germinação de sementes é epígea-fanerocotiledonar, com melhor desempenho no processo germinativo sob temperaturas constantes entre 25 a 30°C.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, L.I.V. & Paulilo, M.T.F. 1992. Efeito da luz, temperatura, regulador de crescimento e nitrato de potássio na germinação de *Miconia cinnamomifolia* (DC.) Naudim. *Insula*, n.21, p.59-86.
- Andrade, A.C.S. 2000. Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.3, p.609-615.
- Borges, E.E.L.; Rena, A.B. 1993. Germinação de sementes. In: Aguiar, I.B.; Piña-Rodrigues, F.C.M.; Figliolia, M.B. (Coords.). Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES, p.83-136.
- Borghetti, F. 2005. *Temperaturas extremas e a germinação das sementes*. In: Nogueira, R.J.M.C. et al. (Eds.) Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. Recife: UFRPE, 499 p.
- Braga, L.F. Souza, M.P.; Braga, J.F.; Sá, M.E. de.. 1999. Efeito da temperatura na germinação de sementes de purui (*Borojoa sorbilis* (Ducke) Cuartre. – Rubiaceae): morfologia das sementes e das plântulas. *Revista Brasileira de Sementes*, v.21, n.2, p.47-52.
- Brançalion, P.H.S.; Novembre, A.D.L.C. & Rodrigues, R.R. 2010. Temperatura ótima de germinação de sementes de espécies arbóreas brasileiras. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 32, nº 4 p. 015 – 021.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 399p.
- Braz, M.S.S.; Souza, V.C.; Andrade, L.A.; Bruno, R.L.A.; Oliveira, L.S.B. & Silva, J.M. 2009. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All.ex. Benth) Leguminosae-Papilionoideae. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 4: 67-71.
- Camargo, J.L.C.; Ferraz, I.D.K.; Mesquita, M.R.; Santos, B.A. & Brum. H.D. 2008. *Guia de propágulos & Plântulas da Amazônia*. Manaus: INPA. 168p.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J. 2000. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 588 p.
- Carvalho, P.E.R. 2004. Jacarandá – *Dalbergia brasiliensis*. Curitiba, *Circular Técnica* nº 98, Embrapa.

- Duke, J.A. & Polhill, R.M. 1981. Seedlings of Leguminosae. Pp. 941-949. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (ed.). *Advances in legume systematic, part 2. Kew, Royal Botanical Gardens.*
- Edmond, J. B. Drapalla, W. J. 1958. The effects of temperature, sand and soil and acetone on germination of okra seed. *Proceedings of the American society for Horticultural Science*, 71, 428-443.
- Laboriau, L.G. 1983. A germinação das sementes. Washington: Organização dos Estados Americanos, *Monografias científicas*, p. 170.
- Larcher, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Paulo: Rima, 2000. 535 p.
- Lima, J.D.; Almeida, C.C.; Dantas, V.A.V.; Silva, B.M.da S. & Moraes, W.da S. 2006. Efeito da temperatura e do substrato na germinação de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (Leguminosae, Caesalpinoideae). *Revista Árvore*, v.30, n.4, p.513-518.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, Madison, v.2, n.1, p.176-177.
- Marcos filho, J. 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ, 495p.
- Martins, C.C.; Machado, C.G. & Nakagawa, J. 2008. Temperatura e substrato para o teste de germinação de sementes de barbatimão ((*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae)). *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.32, n.4, p.633-639.
- Mondo, V.H.V.; Brancalion, P.H.S.; Cicero, S.M.; Novembre, A.D.L.C. & Neto, D.D. 2008. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan (Fabaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 30, nº 2, p.177-183.
- Nascimento, W.M.O. do; Ramos, N.P.; Carpi, V.A.F.; Scarpere filho, J.A. & Cruz, E.D. 2003. Temperatura e substrato para germinação de sementes de *Parkia platycephala* Benth. (Leguminosae- Caesalpinoideae). *Revista de Agricultura Tropical*, Cuiabá, v. 7, n. 1, p. 119-129.
- Nogueira, F.C.B.; Filho, S.M. & Gallão, M.I. 2010. Caracterização da germinação e morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Dalbergia cearensis* Ducke (pau-violeta) – Fabaceae. *Acta bot. bras.* 24(4): 978-985.
- Oliveira, A.K.M.; Schleder, E.D. & Favero, S. 2006. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. e Hook. F. ex. S. Moore. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 25-32.

- Oliveira, E.C. 1993. *Morfologia de plântulas florestais*. In: Aguiar, I. B.; Piña-Rodrigues, F. C. M.; Figliolia, M. B. (Coords.). *Sementes florestais tropicais*. Brasília, DF: ABRATES, p. 175-214.
- Oliveira, L.M.; Carvalho, M.L.M. de; Silva, T.T.de A. & Borges, D.I. 2005. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A.P. de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich. – Bignoniaceae. *Ciência e Agrotecnologia*, v.29, n.3, p.642-648.
- Probert, R.J. 1992. *The role of temperature in germination ecophysiology*. In: Fenner, M. *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. Wallingford: CABI, p.285-325.
- Rodrigues, R.R.; Lima, R.A.F.; Gandolfi, S. & Nave, A.G. 2009. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experiences in the Brazilian Atlantic forest. *biological conservation*, v.142, n.6, p.1242-1251.
- Rodrigues, R.R.; Martins, S.V. & Gandolfi, S. 2007.(Ed.). *High diversity forest restoration in degraded areas: methods and projects in Brazil*. new York: *nova Science Publishers*, 273p.
- Rosseto, J.; Albuquerque, M.C.F.; Rondon Neto, R.M. & Silva, I.C.O. 2009. Germinação de sementes de *Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp. (Fabaceae) em diferentes temperaturas. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.33, n.1, p.47-55.
- Schimdt, L. 2000. *Guide to handling of tropical and subtropical forest seed*. Denmark: Danida *Forest Seed Centre*. 511p.
- Silva, L.M.M.; Matos, V.P.; Pereira, D.D. & Lima, A.A. 1995. Morfologia de frutos, sementes, e plântulas de *Luetzelburgia auriculata* Ducke (pau-serrote) e *Pterogyne nitens* Tul. (madeira-nova-do-brejo) – Leguminosae. *Revista Brasileira de Sementes* 17: 154-159.
- Sousa-Silva, J.C.; Ribeiro, J.F.; Fonseca, C.E.L.da; Antunes, N.B. 2001. Germinação de sementes e emergência de plântulas de espécies arbóreas e arbustivas que ocorrem em matas de galeria. In: Ribeiro, J.F.; Fonseca, C.E. L.; Sousa-Silva, J.C. (Eds). *Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria*. Planaltina: *Embrapa Cerrados*, p.379-422.
- Souza, L.A. 2003. *Morfologia e anatomia vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântula*. Ponta Grossa: UEPG, 259 p.

- Valadares, J. & Paula, R.C. 2008. Temperaturas para germinação de sementes de *Poecilanthe parviflora* Bentham (Fabaceae-Faboideae). *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 30, nº 2, p.164-170.
- Varela, V.P.; Ferraz, I.D.K. & Carneiro, N.B. 1999. Efeito da temperatura na germinação de sementes de sumaúma (*Ceiba pentandra* (L.) Gaertn.– Bombacaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, v.21, n.2, p.170-174.
- Viani, R.A.G. & Rodrigues, R.R. 2007. Sobrevivência em viveiro de mudas de espécies nativas retiradas da regeneração natural de remanescente florestal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.8, p.1067-1075.
- Wuethrich, B. 2007. Biodiversity: reconstructing Brazil's Atlantic Rainforest. *Science*, v.315, p.1070-1072.



### CAPÍTULO III

#### **MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE *Parkia multijuga* BENTH E *Parkia pendula* SUBMETIDAS A DIFERENTES REGIMES DE TEMPERATURA**

**Resumo** – Mobilização de reservas durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* submetidas a diferentes regimes de temperatura. As plantas apresentam diferentes estratégias de adaptação às alterações dos fatores bióticos e abióticos no meio em que habitam e o acúmulo de compostos de reserva em sementes representa parte importante do processo. Estas substâncias são utilizadas durante a germinação e, posteriormente, metabolizadas para o crescimento e desenvolvimento das plântulas. Neste contexto, o presente estudo como objetivo investigar a influência da temperatura sobre as alterações no conteúdo de carboidratos, lipídeos, proteínas e seus respectivos desdobramentos, durante a germinação de sementes e estádios iniciais de desenvolvimento das plântulas de *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* (Willd.) Benth. Sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* foram semeadas em caixas do tipo gerbox contendo papel germitest como substrato e acondicionadas em câmara de germinação com temperaturas constantes de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C e, fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, obedecendo o esquema fatorial 5x2 (temperaturas x espécies) com 20 repetições por tratamento. A quantificação dos metabólitos primários foi realizada em cotilédones de sementes quiescentes e em cotilédones coletados a cada cinco dias a partir da semeadura, durante o período de vinte dias. Amostras de cotilédones secos e pulverizados foram utilizadas para extração e quantificação dos metabólitos primários e seus respectivos desdobramentos. Sendo os lipídeos totais extraídos usando-se éter de petróleo, os carboidratos com etanol 80% e as proteínas conforme sua solubilidade. No que concerne ao comportamento das espécies frente aos fatores estudados, em *P. pendula* os açúcares solúveis totais são mobilizados durante os estádios iniciais de germinação e desenvolvimento da plântula, ao passo que para *P. multijuga* apresentou acréscimo durante o desenvolvimento da plântula, associado ao aumento de temperatura. A espécie *P. multijuga* apresenta comportamento conservador na utilização de amido, por outro lado, em *P. pendula*, este carboidrato é mobilizado durante o desenvolvimento da plântula, associado às temperaturas de 25, 30 e 35°C. Em *P. multijuga* os lipídeos totais foram mobilizados durante o desenvolvimento da planta, associado às temperaturas crescentes,

entretanto, para *P. pendula*, o mesmo apresentou aumento crescente durante o processo germinativo. Os ácidos graxos são mobilizados durante o processo germinativo em *P. multijuga* e, durante o desenvolvimento da plântula em *P. pendula*, independente da temperatura de germinação. As proteínas são mobilizadas durante o processo germinativo de sementes de *P. pendula*, principalmente nas temperaturas de 25, 30 e 35°C. Já para *P. multijuga* a concentração de proteínas aumenta nos primeiro 10 dias, associada às temperaturas de até 35°C. As globulinas representam a maior fração de proteínas em cotilédones de sementes das Parkias em estudo. Sendo que, essa classe de proteína exhibe bandas protéicas com massa molecular menor, quando sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* germinam sob temperatura de 25°C, comparada as sementes quiescentes e, ausência dessas bandas protéicas quando germinadas sob 40°C. Diante dos resultados, conclui-se que as espécies, mesmo pertencendo a mesma família e sub-família, apresentam comportamento e estratégias distintas de alocação dos metabólitos primários durante o processo germinativo.

**Palavras-chave:** Sementes florestais, metabólitos primários, ácidos graxos e classes protéicas.

## 1. INTRODUÇÃO

Durante a fase de maturação das sementes ocorre a expansão celular e a alocação de substâncias de reserva no endosperma ou cotilédone. Essas reservas constituem de compostos oriundos do metabolismo primário, considerados essenciais para a sobrevivência dos organismos (Kerbaudy, 2004; Buckridge *et al.*, 2004). Desta forma, à medida que a semente vai se desenvolvendo há uma diminuição na quantidade destas substâncias mais simples e, ao mesmo tempo, um acúmulo de moléculas maiores e mais complexas como as proteínas, amido, lipídios, celulose, etc. (Guimarães, 1999).

Há uma enorme variação na composição química das sementes, no entanto as substâncias armazenadas em maior quantidade constituem-se de carboidratos, proteínas e lipídeos, sendo que esta proporção pode variar de espécie para espécie e até mesmo entre espécies da mesma família (Borges & Rena, 1993). A composição química das sementes bem como as alterações no conteúdo de carboidratos, lipídeos e proteínas durante a germinação, crescimento inicial e desenvolvimento de plântulas tem suas concentrações alteradas, desde o período prégerminativo até a total senescência e abscisão dos cotilédones (Suda & Giorgini, 2000; Corte *et al.*, 2006).

Neste sentido, os carboidratos e os lipídeos atuam como fontes de energia e de carbono para a germinação, crescimento e desenvolvimento das plântulas, ao passo que as proteínas armazenam, principalmente, nitrogênio e enxofre, elementos essenciais para a síntese de novas proteínas, ácidos nucleicos e compostos secundários para a plântula (Buckeridge *et al.*, 2000).

O sucesso no estabelecimento de uma espécie deve-se ao fato de suas sementes germinarem de forma rápida e uniforme, vencendo a concorrência com as demais ou tendo a capacidade de se manter viável por longos períodos até que as condições tornem-se favoráveis à germinação e ao desenvolvimento das plântulas (Borges, 2003). Desta forma, entende-se que a fonte de energia para os processos vitais e para a formação de novos tecidos é resultante da mobilização de reservas contidas nas sementes (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989; Buckeridge *et al.*, 2000). Estes mecanismos funcionais mantêm o desenvolvimento do embrião até a formação do organismo autotrófico (Buckeridge *et al.*, 2004).

As plantas apresentam diferentes estratégias de adaptação às alterações dos fatores bióticos e abióticos no meio em que habitam e o acúmulo de compostos de reserva em sementes representa parte importante do processo. Estas substâncias são utilizadas durante a germinação e, posteriormente, metabolizadas para o crescimento e desenvolvimento das

plântulas (Buckridge *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2009).

Seguindo esta linha de raciocínio, informações científicas sobre a composição química de sementes tropicais são úteis para a compreensão de sua fisiologia e obtenção de novos produtos a partir de reservas estocadas, como as proteínas em sementes de espécies leguminosas (Vitale & Bollini, 1995). Deste modo, torna-se relevante conhecer aspectos bioquímicos e fisiológicos da composição das reservas em sementes quiescentes e, sua mobilização durante o processo germinativo em espécies arbóreas da Amazônia.

Neste contexto, o presente estudo como objetivo investigar a influência da temperatura sobre o conteúdo de carboidratos, lipídeos, proteínas e seus respectivos desdobramentos durante a germinação de sementes e estádios iniciais de desenvolvimento das plântulas de *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* (Willd.) Benth.

## 5. Materiais e Métodos

### 2.1. Procedência do material biológico

Para realização dos experimentos foram utilizadas sementes das espécies florestais *Parkia multijuga* Benth e *Parkia pendula* (Willd.) Benth, pertencentes a As plantas apresentam diferentes estratégias de adaptação às alterações dos fatores bióticos e abióticos no meio em que habitam e o acúmulo de compostos de reserva em sementes representa parte importante do processo. Estas substâncias são utilizadas durante a germinação e, posteriormente, metabolizadas para o crescimento e desenvolvimento das plântulas. família Fabaceae e subfamília Mimosoideae, oriundas da Reserva Florestal Adolpho Ducke (26 km ao norte de Manaus, Brasil - 03°08' S e 59°52' W).

Após a coleta os frutos foram acondicionados em sacos de polietileno e transportados para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV-INPA), local onde foi realizado o beneficiamentos das sementes e instalação dos experimentos.

### 2.2. Instalação do experimento

Após beneficiamento as sementes passaram por assepsia em solução de hipoclorito a 2% durante 10 minutos e lavagens sucessivas em água destilada, posteriormente tiveram a dormência tegumentar quebrada por desponte ao lado oposto a emissão da radícula para *P. multijuga* e escarificação química com ácido sulfúrico para *P. pendula* e então, embebidas por 24 horas em água destilada. Após essas etapas, coletou-se amostras de cotilédones servindo como controle (tempo zero) para extração e quantificação dos metabólitos primário, para posterior comparação com os demais tempos de coleta. Depois, foram colocadas em caixas do tipo gerbox (11x11x3,5 cm) contendo papel germitest como substrato e acondicionadas em câmara de germinação (ELETROlab, modelo EL 202) e submetidas às temperaturas constantes de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C, providas de lâmpadas fluorescentes de luz branca, programadas para fotoperíodo de 12:12 horas (luz:escuro), com acompanhamento diário. O papel foi umedecido sempre que necessário.

### 2.3. Análises dos compostos do metabolismo primário

A extração de lipídeos totais, ácidos graxos, açúcares solúveis totais e amido foram realizadas no Laboratório de Análises de Sementes Florestais da Universidade Federal de Viçosa em Minas Gerais, ao passo que, a extração e fracionamento de proteínas e eletroforese

em SDS-PAGE foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

A quantificação dos metabólitos primários (lipídios, carboidratos e proteínas totais) foi realizada em cotilédones de sementes quiescentes (T0) e em cotilédones coletados a cada cinco dias a partir da sementeira, durante o período de vinte dias. Assim, os tempos de coleta e análises compreenderam: sementes quiescentes (controle), 5, 10, 15 e 20 dias de germinação (T0, T1, T2, T3 e T4), sob as temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40°C. Após a coleta, o material biológico foi seco em estufa a 45°C durante 72 horas, pulverizado e armazenado em freezer (-30°C) conforme metodologia descrita por Corte *et. al.*, (2006), até a extração e quantificação de lipídeos e ácidos graxos, carboidratos, proteínas totais, fracionamento de proteínas e eletroforese em SDS-PAGE.

### 2.3.1. Extração de lipídeos

Os lipídeos totais foram extraídos segundo a metodologia descrita por Silva (1990). Amostras dos cotilédones finamente moídas, contemplando todos os tratamentos foram colocadas em cartuchos de papel e acondicionadas em aparelho tipo soxhlet, sendo mantidas em refluxo durante seis horas, utilizando-se éter de petróleo como extrator. Ao final da extração, os cartuchos foram retirados, secos e pesados. O teor de lipídeo foi estimado pela diferença de peso da amostra seca inicial e final. O material desengordurado resultante foi utilizado para análise de carboidratos e proteínas.

### 2.3.2. Quantificação de Ácidos Graxos

Após extração dos lipídeos totais, utilizou-se 20 mg, o qual passou por processo de esterificação para posteriormente 1 µL de amostra ser injetado em cromatógrafo gasoso (CHIMADZU GC - 14A) para detecção dos ácidos graxos. O cromatógrafo foi calibrado com a temperatura da coluna de 190 – 220°C a 2°C por minuto, temperatura do injetor a 250°C e temperatura do detector a 275°C. Utilizou-se Coluna capilar Shimadzu 50 m CBP10 – M50 Recheio Carbowax, utilizando-se hidrogênio como gás de arraste, com fluxo de 0,5 kg/cm<sup>2</sup>.

### 2.3.3. Extração de carboidratos

Os carboidratos foram extraídos conforme metodologia descrita por Black *et al.* (1996), com modificações. Amostras de 200 mg de material desengordurado foram homogeneizadas em 1 mL de álcool 80% e, posteriormente, mantidas em banhomaria a 75°C durante 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm durante cinco minutos,

repetindo-se esse processo por mais três vezes. Os sobrenadantes foram misturados em uma única amostra e posteriormente seca em estufa a 50°C até total evaporação do álcool; ressuspensos em 1 mL de água ultrapura, o qual foi utilizada para as análises de açúcares solúveis totais. Os precipitados, após secos em estufa, foram utilizados para extração e quantificação de amido.

#### 2.3.3.1. Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e amido

A quantificação de açúcares solúveis foi realizada a partir da diluição de 20 µl da amostra da extração de carboidratos e adicionando-se 80 µl de água ultrapura. Dessa diluição original retirou-se 20 µl e adicionou-se 980µl de água ultrapura, 500 µl de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico (Passos, 1996).

A extração de amido foi realizada a partir de 20 mg da amostra do precipitado de onde foram extraídos os açúcares solúveis totais, o qual foi colocado em eppendorf e adicionado 1,0 mL de ácido perclórico 35%, agitado em vortex e deixando digerir o amido durante 15 minutos. Após a digestão as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga a 10.000 rpm, durante cinco minutos. A quantificação do amido foi realizada em alíquotas de 20 µL do sobrenadante, adicionadas à 980 µL de água destilada, 500µL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico absoluto.

Tanto os açúcares solúveis totais quanto o amido foram quantificados por espectrofotométrica com leitura a 490 nm, utilizando-se glicose (Sigma) como padrão, conforme metodologia descrita por Dubois *et. al.*, (1956).

#### 2.3.4. Determinação do nitrogênio total

A quantificação do nitrogênio total foi realizada pelo método de Kjeldahl, utilizando procedimentos descritos no Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes da EMBRAPA (1999), após secagem em estufa à 65°C durante 72 horas. Amostras de 100 mg do material desengordurado foram colocadas em tubo de ensaio juntamente com 5,0 mL de solução digestora. A digestão da amostra foi realizada em bloco digestor a 350 °C até o material apresentar-se incolor. Em seguida, realizou-se a destilação adicionando-se 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 40% após mistura da amostra em 20 mL de água destilada. O destilado foi coletado em becker contendo 10 mL de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) solução receptora.

A destilação se completou quando o volume do becker chegou a 60 mL de uma solução com coloração verde menta, indicando a presença de nitrogênio na amostra. A

titulação foi realizada utilizando ácido sulfúrico a 0,01 N. O teor de proteínas totais foi estimado utilizando o fator de correção 5,71 (Ezeagu, *et. al.*, 2002).

#### 2.3.5. Fracionamento de proteínas

O fracionamento proteico foi obtido conforme a solubilidade das proteínas, em globulinas, prolaminas, albuminas, glutelinas ácidas e básicas (Osborne, 1924). Inicialmente 5 g de amostra desengordurada (sem lipídeos) foi homogeneizada em 50 mL de solução salina (NaCl 0,5 M), sob agitação constante por quatro horas. Posteriormente, foi centrifugado a 9000 rpm durante 10 minutos à 4°C e filtrado em papel filtro. O sobrenadante foi submetido à diálise em água destilada durante 48 horas e centrifugado nas condições descritas anteriormente, sendo que o novo sobrenadante corresponde a fração albumina e o precipitado, ressuspenso em 15 mL de NaCl 0,5 M, constituindo a fração globulinas, conforme metodologia descrita por Pinto *et al.* (2005).

O resíduo da extração anterior foi homogeneizado em solução de etanol 70% durante 1 hora e posteriormente centrifugado, onde o sobrenadante correspondeu a fração prolaminas e o precipitado submetido a homogeneização em solução de HCl 0,1 M por 1 hora e após filtrado, o sobrenadante foi dialisado por 48 horas para obtenção das globulinas ácidas.

O último resíduo foi submetido à extração em solução de NaOH 0,1 M por 1 hora e centrifugado nas mesmas condições anteriores para obtenção das glutelinas básicas.

A concentração relativa de proteínas dos extratos foi estimada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando a BSA (albumina sérica bovina) como padrão. As absorvâncias foram obtidas em espectrofotômetro com leitura a 595 nm.

#### 2.3.6. Eletroforese em SDS-PAGE

A análise do perfil protéico foi realizada apenas para as proteínas da classe das globulinas, encontradas em maior quantidade nos cotilédones das espécies em estudo. Utilizou-se o método descrito por Laemmli (1970), com modificações. O gel foi preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% e de N-N'-metileno bis-acrilamida 0,8%. Para o gel de concentração a 5%, foi utilizado tampão Tris-HCl 0,125M, pH 6,8, e para o gel de separação 12,5%, tampão Tris-HCl 1M, pH 8,8, sendo acrescentado em ambos SDS 20%, sendo a polimerização conseguida pela adição de TEMED e PSA 10%.



As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,08 M, pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,1% de azul de bromofenol. Como agente redutor foi utilizado o ditioneitol (DTT) a de 0,1M.

O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue em ácido acético 0,1%, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v/v) e descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v/v).

#### 2.4. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), obedecendo o esquema fatorial 5x2 (temperaturas x espécies) com 20 repetições por tratamento (de oito sementes por gerbox par *P. multijuga* e 30 sementes para *P. pendula*). A quantificação de lipídeos, açúcares solúveis, amido e proteínas totais foram realizadas utilizando-se três repetições feitas em triplicatas. Os dados obtidos foram submetidos à análises de variância e de regressão. A comparação das médias foi realizada pelo teste t para dados qualitativos e ajuste de equações de regressão para dados quantitativos, utilizando o programa Statistica versão 7.0.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Açúcares Solúveis Totais (AST)

A concentração de açúcares solúveis totais (AST) encontrada nas sementes quiescentes de *P.pendula* foi de 15% e durante os 10 dias após a semeadura e condições de temperatura de 20, 30 e 35°C, esse teor reduziu significativamente (Figura 1A e 1B).

No intervalo entre 10 e 20 dias após a semeadura, houve retomada na concentração de AST, com aumento, principalmente nas temperaturas em que ocorreu maior germinação (Figura 1C e 1D). Este comportamento, possivelmente, está associado ao fato de que sementes de *P. pendula* germinarem rapidamente, utilizando AST nos estádios iniciais de germinação e desenvolvimento e ao nono dia já apresentarem plântulas completamente formadas, onde as mesmas podem contribuir na produção de reservas orgânicas por meio da fotossíntese.

Por outro lado, as sementes quiescentes de *P. multijuga* apresentaram valores bem menores, na ordem de 5%, e durante os 10 dias após a semeadura e condições variadas de temperatura, não apresentavam um padrão na mobilização nem modelos que explicassem alterações no conteúdo de AST, com redução discreta deste metabólito nas temperaturas de 20 e 30°C (Figura 1 A e 1B). No entanto, observou-se aumento significativo de AST com o aumento da temperatura de germinação, do terceiro ao quarto período de avaliação (10 a 20 dias), com incremento no conteúdo de AST e tendência de redução após os 20 dias (Figura 1 C e 1D).

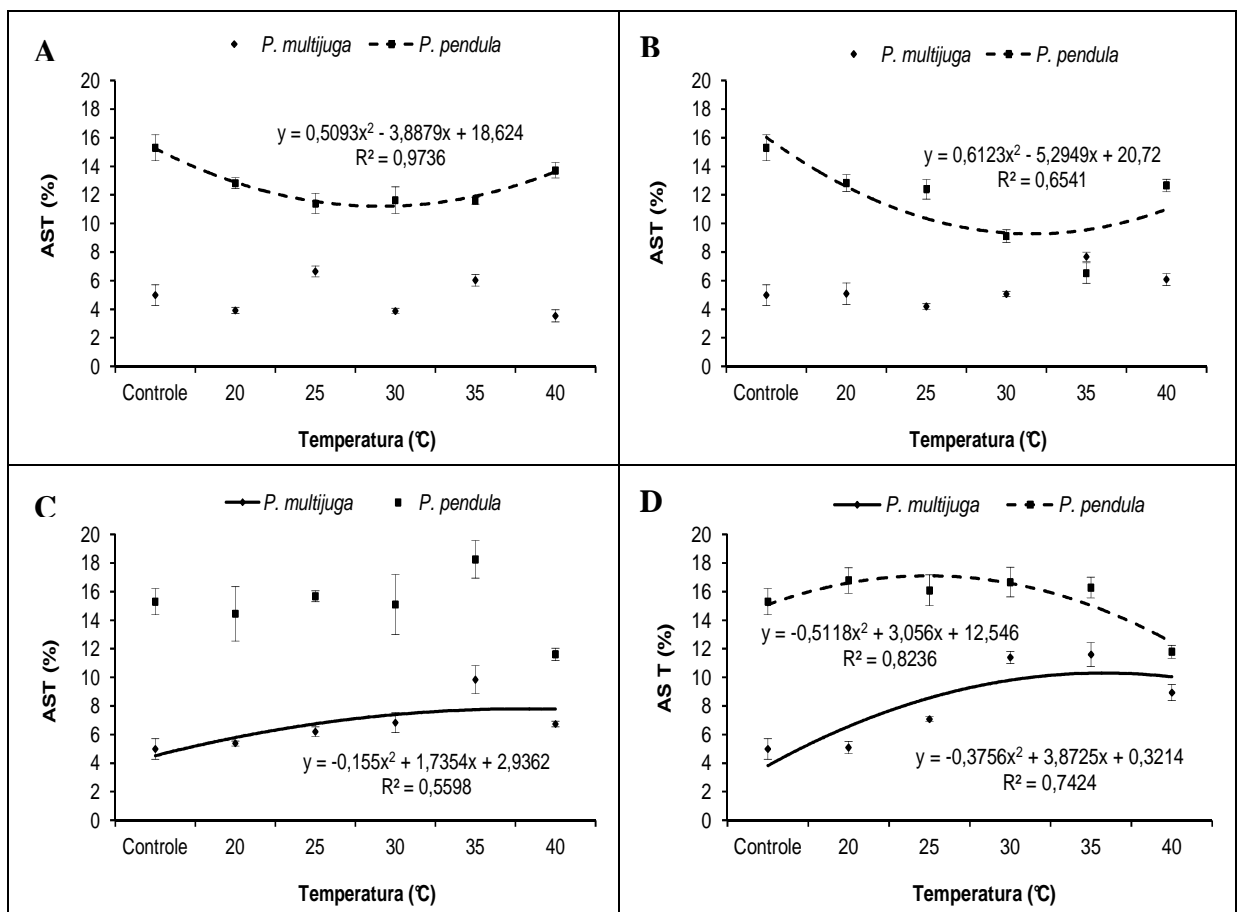
Teores de carboidratos solúveis reduziram-se continuamente em cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Fabaceae), durante todo o período observado. Sendo que o conteúdo de carboidratos apresentou queda mais acentuada após o 10º dia (Corte *et. al.*, 2006). Resultados semelhantes foram observados em sementes de *Copaifera langsdorfii* Desf., cujo conteúdo de açúcares solúveis reduziu durante e após a germinação (Buckeridge *et al.* 1992). Ao contrário, sementes de *Brassica oleracea* L. e *Euphorbia heterophylla* L., tiveram o conteúdo de carboidratos solúveis inalterados até 48 e 72 h, respectivamente (Qouta *et al.*, 1991; Suda & Giorgini, 2000).

Semelhante ao incremento de AST observado em sementes de *P. multijuga* após 10 dias de semeadura, comportamento semelhante foi obtido para sementes de *Eutrype oleracea* Mart. em condições de normoxia e anoxia (Gonçalves *et al.*, 2010). Esses resultados concordam com os observados em cotilédones de *Myrciaria dúbia*, *Eugenia stipitata*,

*Hymenaea coubaril* em diferentes estádios de germinação e discordam com os obtidos para *Dipteryx odorata* (Melo *et al.*, 2009).

Os açúcares solúveis são as primeiras reservas a serem utilizadas após a embebição das sementes e, pela ação de várias enzimas, verifica-se que substâncias complexas como amido são desdobrados em moléculas menores e solúveis que fornecerão energia e/ou ajudarão na formação de estruturas da nova plântula (Ziegler, 1995).

Esses resultados demonstram que as espécies podem apresentar comportamentos e/ou estratégias distintas no que diz respeito à utilização de carboidratos solúveis, durante a germinação de sementes.



**Figura 1:** Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) em cotilédones de sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação (dia). Controle: semente quiescente; A: 5 dias após semeadura (DAS); B: 10 DAS; C: 15 DAS e D: 20 DAS.

### 3.3. Amido

Sementes quiescentes de *P. multijuga* e *P. pendula* acumulam quantidades similares de amido em seus cotilédones, com 28% e 27% deste composto de reserva, respectivamente (Figura 2). Entretanto, durante os 20 dias de germinação em regimes crescentes de temperatura esses teores sofreram alterações expressivas.

Em relação às sementes quiescentes, foi observado um aumento entre 2 e 4,5% no conteúdo de amido quando as sementes de *P. multijuga* foram submetidas a temperaturas crescentes de germinação, associadas ao primeiro e segundo tempo de avaliação (5 e 10 dias). Por outro lado, em sementes de *P. pendula*, neste mesmo intervalo de tempo foi observado um decréscimo no teor de amido, nas temperaturas entre 25 e 35°C (Figura 2A). Essa redução foi bem mais expressiva nos intervalos entre 10 e 20 dias após sementeira (DAS) associadas as temperaturas de 25, 30 e 35°C (Figura 2B, 2C e 2D).

Na temperatura de 40°C a concentração de amido permaneceu praticamente inalterada em todos os intervalos de avaliação de *P. multijuga* e somente no intervalo de 20 dias após sementeira apresentou decréscimo acentuado em sementes de *P. pendula* (Figura 2 D).

Comparando o comportamento de *P. multijuga* com o de *P. pendula* na mobilização de amido, pode-se afirmar que a primeira espécie apresenta comportamento bem mais conservador no consumo de amido durante a germinação e crescimento inicial da plântula, compreendendo os intervalos de avaliação aqui estudados. É possível que estas reservas sejam usadas posteriormente durante o desenvolvimento da plântula, visto que esta espécie apresenta sementes grandes, podendo armazenar uma quantidade maior de reservas, associada à germinação tardia e ao desenvolvimento lento.

As reservas de amido apresentaram pequenas concentrações em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Corte *et al.*, 2006), semelhante ao que ocorreu em outras leguminosas (Silva *et al.*, 1998; Suda & Giorgini, 2000), tendo apresentado pequeno consumo durante o período germinativo e de crescimento das plântulas (Corte *et al.*, 2006).

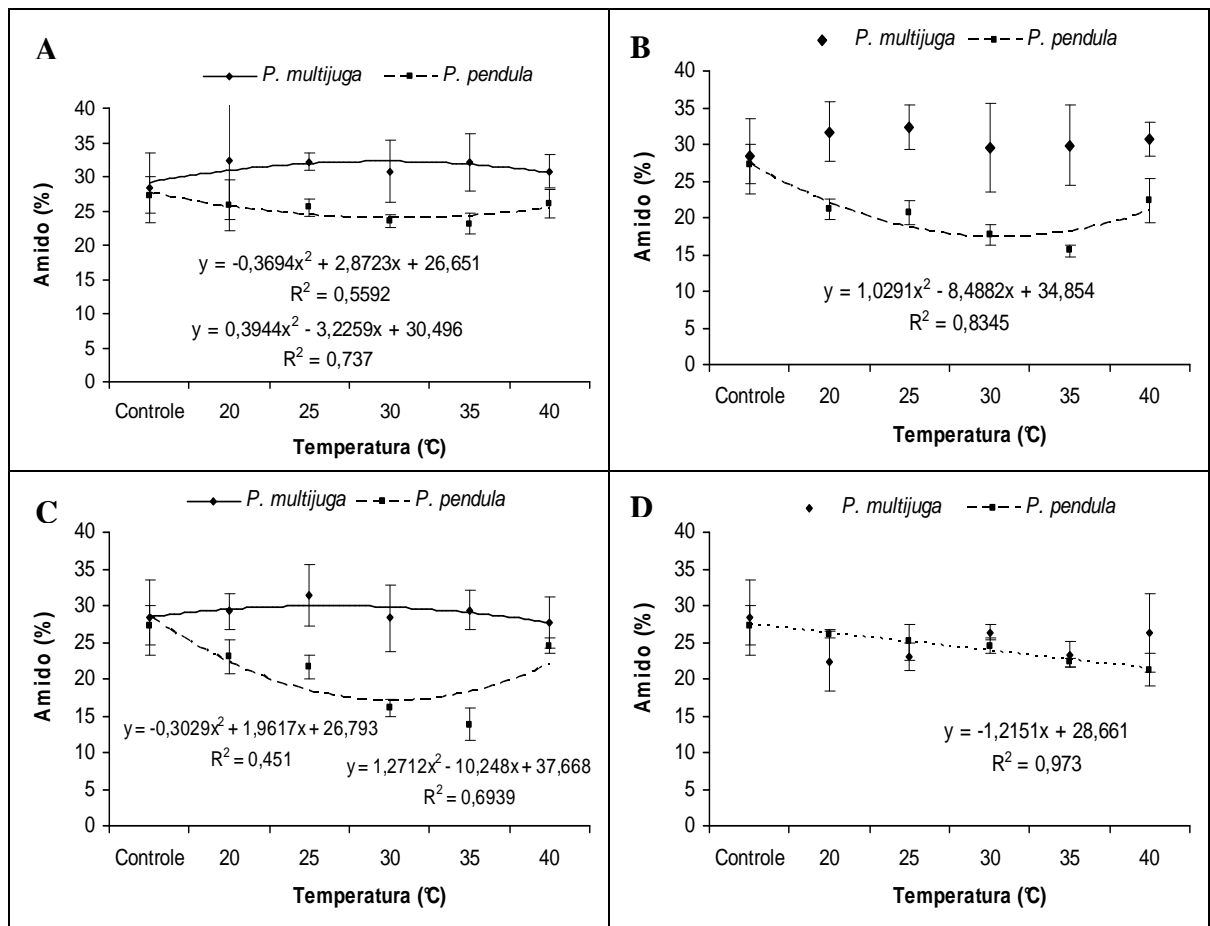
Ao contrário do observado neste estudo, cotilédones de sementes de *Myrciaria dubia*, *Eugenia stipitata*, *Dipteryx odorata* apresentam altos teores de amido, com 66,2%; 71,1% e 40,2%, respectivamente. Em todas essas espécies ocorreu mobilização significativa dessa reserva ao longo do período germinativo (Melo, 2005; Melo *et al.*, 2009).

Concordando com o observado para as espécies neste estudo, *Hymenaea coubaril* apresentou teor de amido de 24%, com acréscimo e estabilização nos estádios 1, 2 e 3 de

germinação, mantendo-se praticamente estáveis e somente no estágio 4 foi observado decréscimo dessa reserva (Melo, 2005; Melo *et al.*, 2009). Sementes de *Apuleia leiocarpa* apresentam aumento no teor de amido nos cotilédones durante o período de embebição das sementes (Pontes *et al.*, 2002).

Segundo Otegui *et al.*, (1999) grãos de amido são acumulados nos plastídeos durante o desenvolvimento do endosperma inicial de *Myrsine laetevirens* e desaparecem gradualmente enquanto os corpos protéicos e lipídicos são formados.

A hidrólise do amido em açúcares solúveis contribui com a maior parte desse composto para desenvolvimento do embrião e/ou eixo embrionário durante o desenvolvimento da plântula (Bewley & Black, 1994; Buckeridge *et al.*, 2004).



**Figura 2:** Conteúdo de amido em cotilédones de sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação (dia). Controle: semente quiescente; A: 5 dias após semeadura (DAS); B: 10 DAS; C: 15 DAS e D: 20 DAS.

### 3.4. Lipídeos totais

O teor de lipídeos encontrado nas sementes quiescentes de *P. multijuga* foi de 2,5%. Em contrapartida, as sementes de *P. pendula* apresentaram 5% de lipídeos em seus cotilédones. Assim, nas sementes quiescentes, durante os 20 dias de análise da germinação e sob regimes crescentes de temperatura, as espécies em questão apresentaram comportamento distinto quanto o teor deste metabólito.

Na figura 3A (5 DAS) pode-se observar que a diferença na concentração de lipídeos entre as duas espécies é relativamente pequena em todas as temperaturas estudadas e que apenas *P. multijuga* apresenta equação mostrando aumento no teor de lipídeos com tendência de decréscimo com o aumento de temperatura de germinação.

Observou-se que 5 dias após a sementeira, houve um aumento significativo e exponencial na concentração de lipídeos conforme se aumentava a temperatura de germinação das sementes de *P. pendula*, até o final do tempo de germinação (Figura 3B, 3C e 3D). Portanto, apesar de concentrar maior percentual de lipídeos em relação a *P. multijuga*, essa espécie não mobiliza esse tipo de reserva durante o período de germinação de suas sementes, parecendo sintetizar e estocar reservas mais energéticas para o desenvolvimento da plântula.

No entanto, observa-se que um decréscimo expressivo no teor de lipídeos em sementes de *P. multijuga* nos intervalos partindo de 15 a 20 dias após a sementeira, associada a temperatura crescente, período esse em que a plântula apresentava-se em pleno desenvolvimento (Figura 3C e 3D). Esse decréscimo de lipídeos nos cotilédones provavelmente justifique o fato de não se ter percebido uma mobilização acentuada dos carboidratos de reserva, visto que concomitante ao uso dos açúcares, pode estar ocorrendo reposição destes pela conversão dos lipídeos a carboidratos. Fato semelhante foi observado por Suda & Giorgini (2000), estudando a mobilização das reservas orgânicas em sementes de *Euphorbia heterophylla*.

Resultados semelhantes foram obtidos em sementes de *Dipteryx odorata*, mostrando que os valores de lipídeos nos cotilédones praticamente mantiveram-se em todos os estádios estudados (Melo *et al.*, 2009). Pontes *et al.*, (2002) estudando a germinação de *Apuleia leiocarpa*, encontraram resultados parecidos, ou seja, a espécie exibiu baixa mobilização de lipídeos nos cotilédones.

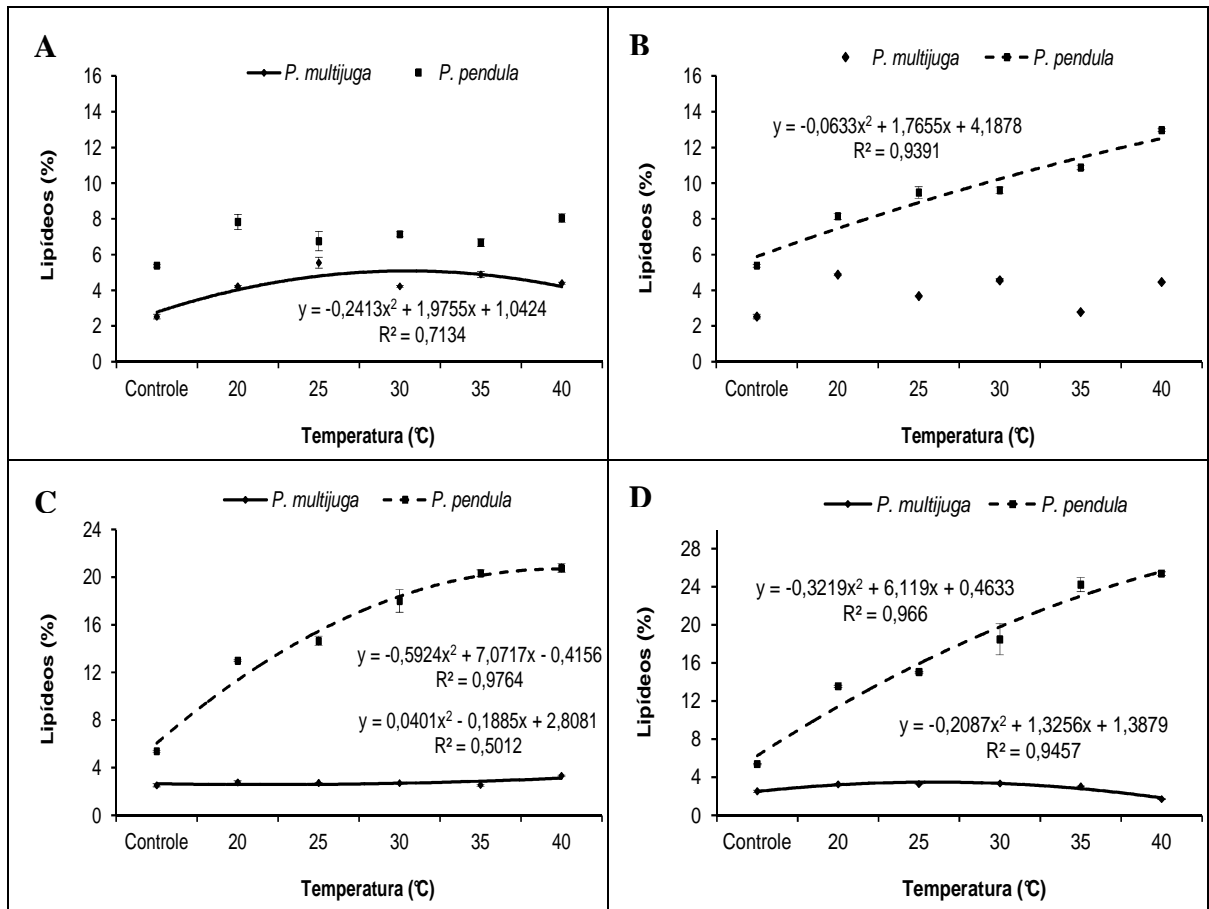
Sementes quiescentes de *Caesalpinia peltophoroides* apresentaram cerca de 50% de lipídios. Esses lipídios apresentam forte queda entre T0 e 10 dias após sementeira, sendo esta mais suave a até os 35 dias após sementeira (Corte *et al.*, 2006). Em sementes de *Euphorbia*

*heterophylla* L., a degradação dos lipídios se iniciou logo após a embebição, atingindo cerca de 70% entre três e quatro dias após a embebição (Suda e Giorgini, 2000).

Em *Cucumis sativus* a degradação dos lipídios inicia no segundo dia após a germinação, só restando 3% do total inicial aos seis dias. Essa rápida degradação se inicia com o aparecimento da radícula e termina com a completa expansão dos cotilédones (Matsui *et al.*, 1999).

A mobilização de reservas lipídicas em sementes de *Elphorbia heterophylla* durante a germinação, apresenta uma possível relação com a manutenção dos níveis de açúcares solúveis no embrião, sugerindo a formação de carboidratos a partir dos lipídeos, de forma a garantir o aporte energético para a germinação das sementes desta espécie (Suda & Giorgini, 2000).

De modo geral, é comum verificar que durante a germinação de sementes oleaginosas, os lipídeos armazenados são metabolizados à carboidratos em uma série de reações de uma seqüência metabólica conhecida como ciclo do glioxilato, onde o carbono gerado pela quebra dos lipídeos é convertido à carboidrato através da gliconeogênese para serem translocados dos cotilédones para os tecidos em desenvolvimento da nova plântula (Graham, 2008).



**Figura 3:** Conteúdo de lipídeos em cotilédones de sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação (dia). Controle: semente quiescente; A: 5 dias após semeadura (DAS); B: 10 DAS; C: 15 DAS e D: 20 DAS.

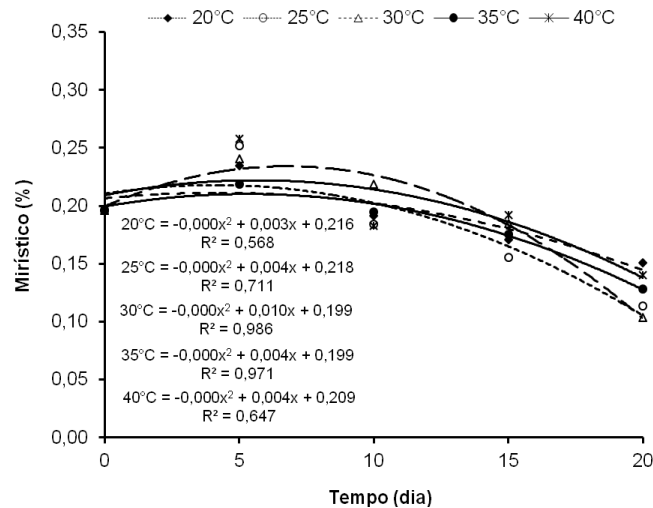
### 3.4. Ácidos graxos

Os resultados da identificação dos ácidos graxos que compõe os lipídeos totais das sementes das duas espécies estudadas revelam a presença de cinco ácidos graxos diferentes, independentemente do grau de saturação. Os ácidos graxos obtidos neste estudo apresentaram concentrações e comportamento variados, frente aos intervalos e temperaturas de germinação.

Na figura 4 pode-se observar a presença do ácido mirístico somente nos cotilédones de sementes de *P. multijuga*, mesmo que em baixas concentrações (0,2%) esse ácido apresentou decréscimo ao longo do período de desenvolvimento da plântula. O decréscimo apresentou-se mais intenso na associação dos intervalos entre 10 e 20 dias com as temperaturas de 25, 30 e 35°C.



Este resultado sugere que o ácido mirístico seja utilizado pela espécie *P. multijuga* em estádios pós-germinação e que na espécie *P. pendula* este ácido tenha sido mobilizado integralmente durante a germinação, visto que a coleta de cotilédones desta espécie ocorreu somente no quinto dia, sendo que a emissão da radícula se deu no terceiro dia após a semeadura.



**Figura 4:** Conteúdo de ácido mirístico em cotilédones de sementes de *P. multijuga* submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação.

Apesar de sementes quiescentes da espécie *P. multijuga* ter apresentado uma menor concentração de lipídeos totais, os ácidos graxos que o compõe apresentaram-se em maior concentração, em relação a *P. pendula* (Figuras 5 e 6).

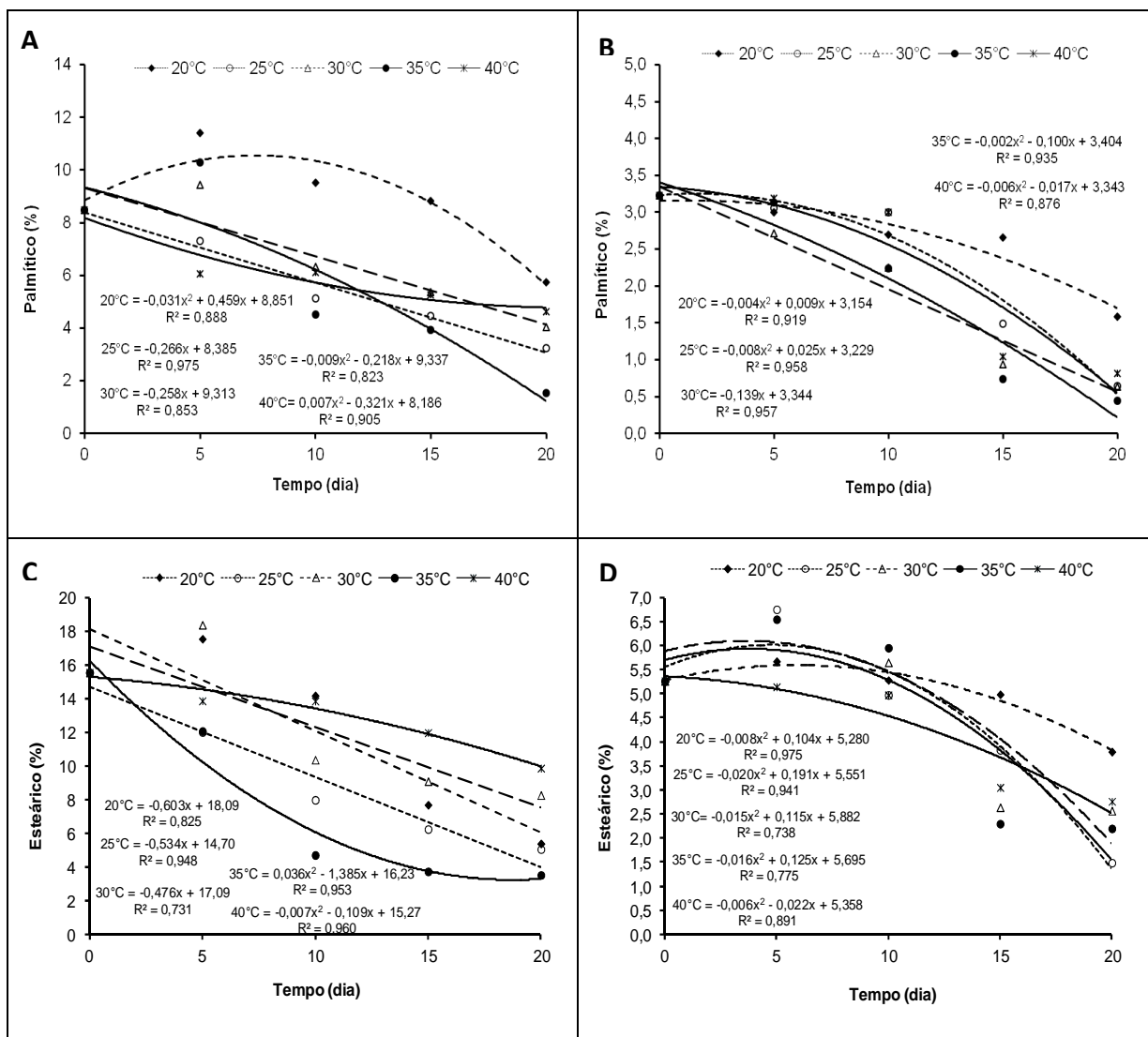
Dentre os ácidos graxos, foi possível observar que o ácido oléico compõe a maior porcentagem lipídica dos cotilédones das sementes, tanto em *P. multijuga* quanto em *P. pendula*, com 33% e 31%, respectivamente (Figura 6A e 6B). Deste modo, nota-se que ambas as espécies armazenam no citoplasma das células dos cotilédones, predominantemente o ácido graxo insaturado, que apresenta apenas uma insaturação em sua estrutura (C<sub>18:1</sub>).

Com exceção ao ácido oléico em sementes de *P. multijuga*, que apresentou um decréscimo acentuado do tempo zero aos 10 dias (de 33% para uma faixa entre 8 e 14%, dependendo da temperatura) e estabilização daí em diante (Figura 6A).

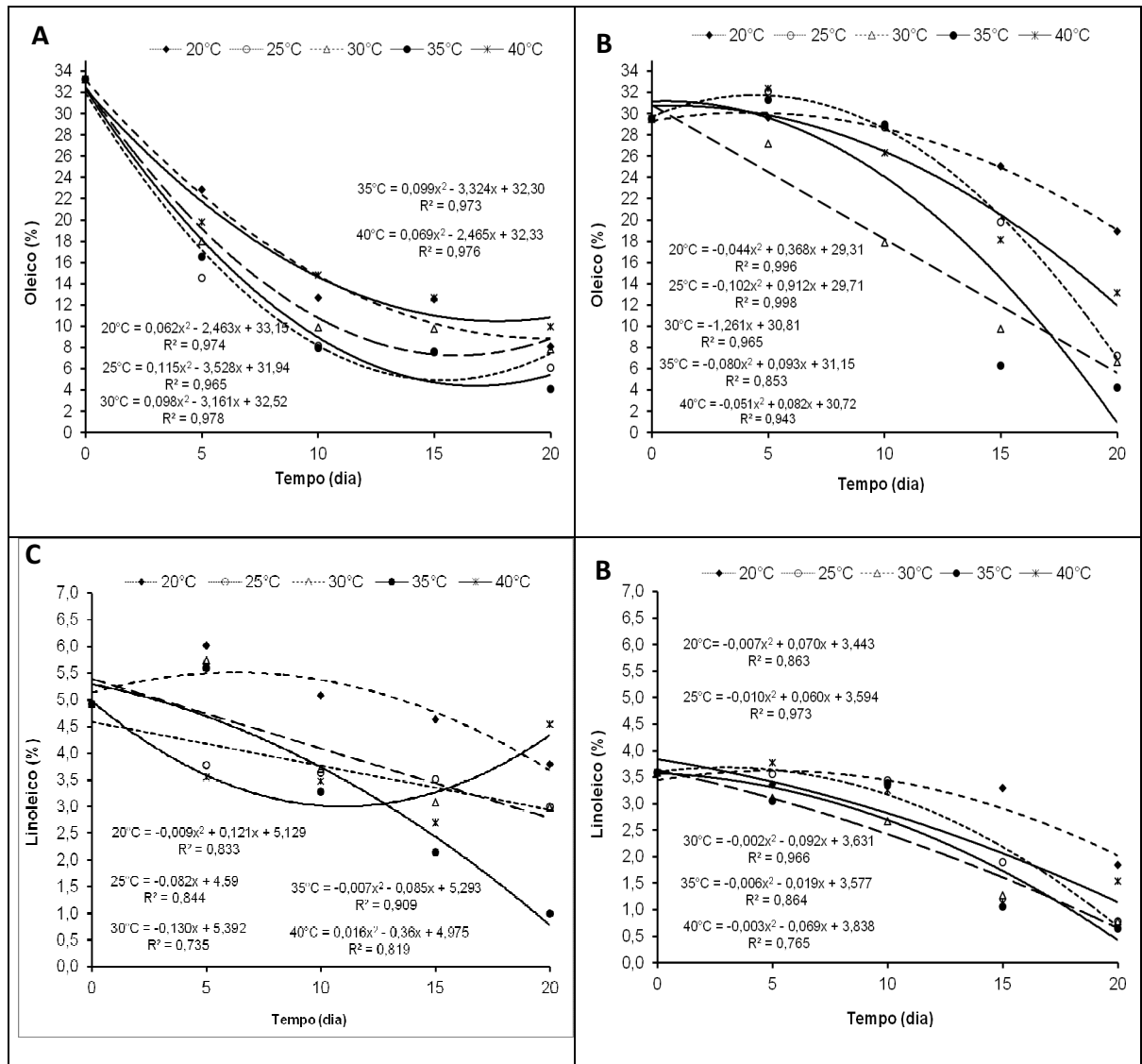
Neste contexto, sugere-se que a espécie *P. multijuga* utilize o ácido oléico de forma majoritária no processo germinativo, em detrimento ao desenvolvimento da plântula,

diferentemente de *P. pendula* que utiliza este ácido graxo somente a partir de 10 dias após a sementeira, durante desenvolvimento da plântula (Figura 6A e 6B).

Para a espécie *P. multijuga* os ácidos mirístico, palmítico, esteárico e linoléico apresentaram decréscimo conforme o aumento do tempo de avaliação, independente da temperatura estudada. Sendo que este comportamento foi mais bem evidenciado na interação das temperaturas de 30 e 35°C com o maior intervalo de germinação avaliado (Figuras 5A, 5C e 6C). Ao passo que os ácidos esteárico e oléico sejam mobilizados em cotilédones de *P. pendula* somente 10 dias após a sementeira (Figuras 5D e 6B).



**Figura 5:** Conteúdo de ácido palmítico e ácido esteárico em cotilédones de sementes de *P. multijuga* (A e C) e *P. pendula* (B e D) submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação (dia).



**Figura 6:** Conteúdo de ácido oleico e ácido linoléico em cotilédones de sementes de *P. multijuga* (A e C) e *P. pendula* (B e D) submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação (dia).

Nas sementes de *Myrciaria dubia* (camu-camu) e *Eugenia stipitata* (araçá-boi), observou-se a predominância de ácidos graxos saturados, enquanto que nas sementes de *Dipteryx odorata* (cumaru) e *Hymenaea coubaril* (jatobá) houve predominância de ácidos graxos insaturados (Melo, 2005; Melo *et al.*, 2009), assim como obtido para as espécies em estudo.

Em estudos de identificação de ácidos graxos que compõe os óleos de sementes das espécies *Aniba parviflora*, *Bertholletia excelsa*, *Helicostylis tomentosa*, *Hymenaea parviflora*

e *Parkia pendula*, revelaram que independente da espécie, houve maior proporção de ácidos graxos insaturados (Gonçalves *et al.*, 2002).

Em estudo com mobilização de reservas em semente de espécies florestais e frutíferas, a maior porcentagem em valores absolutos de ácido oléico (24%) foi encontrada em *Dipteryx odorata* com 48 horas de embebição das sementes (Melo, 2005; Melo *et al.*, 2009). Segundo Buckeridge *et al.*, (2004), embora a composição exata de ácidos graxos varie de espécie para espécie, os ácidos oléico e linoléico, geralmente ocorrem em maior quantidade em algumas sementes oleaginosas, podendo compor até 60% da massa. Essa afirmação justifica o alto percentual de ácido oléico nas sementes de *P. multijuga* e *P. pendula*.

O ácido oléico e linoéico também foram os principais componentes dos óleos das sementes *Dalbergia miscolobium*, espécie com alto teor de óleo em suas sementes (Silva *et al.*, 1998).

### 3.5. Proteínas totais

A porcentagem de nitrogênio total nas sementes de *P. multijuga* e *P. pendula*, obtidos nesta parte do trabalho, foi convertida em teor de proteína bruta multiplicando-se pelo fator 5,71, pois o fator 6,25 comumente utilizado, superestima o conteúdo de nitrogênio total em função de boa parte desse composto ser de origem não protéica, pois vários outros compostos presentes em tecidos vegetais como alcalóides, sais de amônio, aminoácidos livres, etc, contém nitrogênio em sua estrutura, representando assim, fator importante para não generalizar o uso do fator 6,25 (Ezeagu *et al.*, 2002).

Os teores de proteínas totais presente nas sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* apresentaram-se compatíveis com os extraídos pelo método de nitrogênio total. Em sementes quiescentes de *P. multijuga* os teores de proteínas totais apresentaram valores na ordem de 11,5%, ao passo que para as sementes de *P. pendula* foi obtido valor de 34,5%. Esses teores iniciais sofreram alterações em função do tempo de germinação (20 dias), associado ao aumento de temperatura (Figura 7).

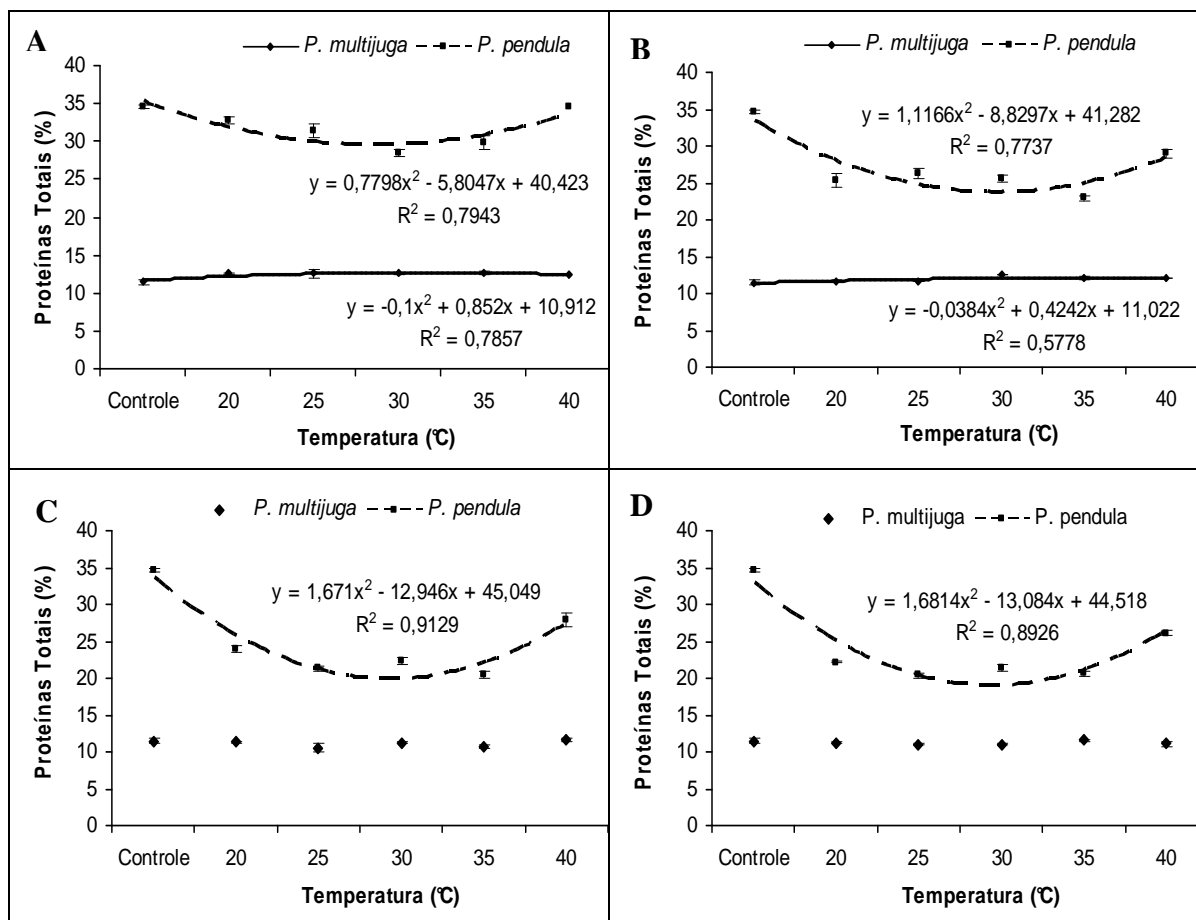
Durante todo o período de avaliação (20 dias), foi observado decréscimo contínuo e acentuado do conteúdo de proteínas totais nos cotilédones de sementes de *P. pendula*, na ordem de 9 a 14%, principalmente nas temperaturas de 25, 30 e 35°C (Figura 7 A-B-C-D), assim como observado para o conteúdo de amido. Este resultado evidenciam a mobilização e/ou utilização de proteínas durante o processo germinativo e desenvolvimento desta espécie.

De modo contrário, foi observado nos primeiros 10 dias de avaliação, um aumento na concentração de proteínas totais em cotilédones de sementes de *P. multijuga*, associado às temperaturas de 20, 25,30 e 35°C. Período este em que foi obtido maior porcentagem de germinação desta espécie. Demonstrando claramente a síntese de proteínas durante o processo germinativo de sementes de *P. multijuga* (Figura 7A e 7B).

Cotilédones de sementes quiescentes de *Dipteryx odorata* (cumarú) apresentaram 12,4% de proteínas totais, sendo observado que a mobilização de reservas protéicas nesta espécie se deu nas primeiras 48 horas de embebição (Melo, 2005; Melo *et al.*, 2009). Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os obtidos por para outras espécies da família Fabaceae, no qual a mobilização do conteúdo de proteínas dos cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* teve início já com a emissão da radícula e apresentou decréscimo até a total senescência dos cotilédones (Corte *et al.*, 2006).

O que concorda com a afirmação de Bewley & Black (1994), de que as proteínas são mobilizadas durante a germinação e subsequente crescimento das plântulas. Esses resultados também concordam com os obtidos por Müntz *et al.*, (2001) de que a mobilização das proteínas armazenadas nos cotilédones só é detectável após a protrusão da radícula (pós-germinação). Em sementes de *Erythrina velutina* Willd., o conteúdo de proteína cotiledonar solúvel decresceu rapidamente durante a germinação e crescimento da plântula (Oliveira *et al.*, 1998), e em sementes de *Euphorbia heterophylla* as proteínas foram continuamente degradadas após o início da embebição (Suda & Giorgini, 2000).

A germinação da semente é iniciada graças às reservas próprias do embrião e depois mantida com o consumo dos componentes dos tecidos de reserva, pela atividade enzimática e pelo fluxo dos componentes solúveis às regiões de crescimento onde há rápido consumo (Carvalho & Nakagawa, 2000). Neste sentido, Buckeridge *et al.* (2004) também evidenciaram a mobilização das reservas de proteínas para a estruturação dos processos que conferem capacidade de absorver nutrientes e realizar fotossíntese.



**Figura 7:** Conteúdo de proteínas totais em cotilédones de sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* submetidas a diferentes temperaturas e tempo de germinação (dia). Nitrogênio total x 5,71 = proteínas totais. Controle: semente quiescente; A: 5 dias após semeadura (DAS); B: 10 DAS; C: 15 DAS e D: 20 DAS.

### 3.6. Fracionamento de proteínas

As frações protéicas prolaminas, albuminas, globulinas, glutelinas ácidas e básicas dos cotilédones das duas espécies em estudo estão ilustradas na tabela 1. Sendo que, o teor da fração globulina foi quantitativamente superior aos das demais frações protéicas, com 4,45% para *P. multijuga* e 15% para *P. pendula* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Fracionamento de proteínas de reserva em sementes quiescentes de duas espécies florestais pertencentes à família Fabaceae-Mimosoideae. Letras comparam as médias nas colunas pelo teste t de student a 5% de probabilidade.

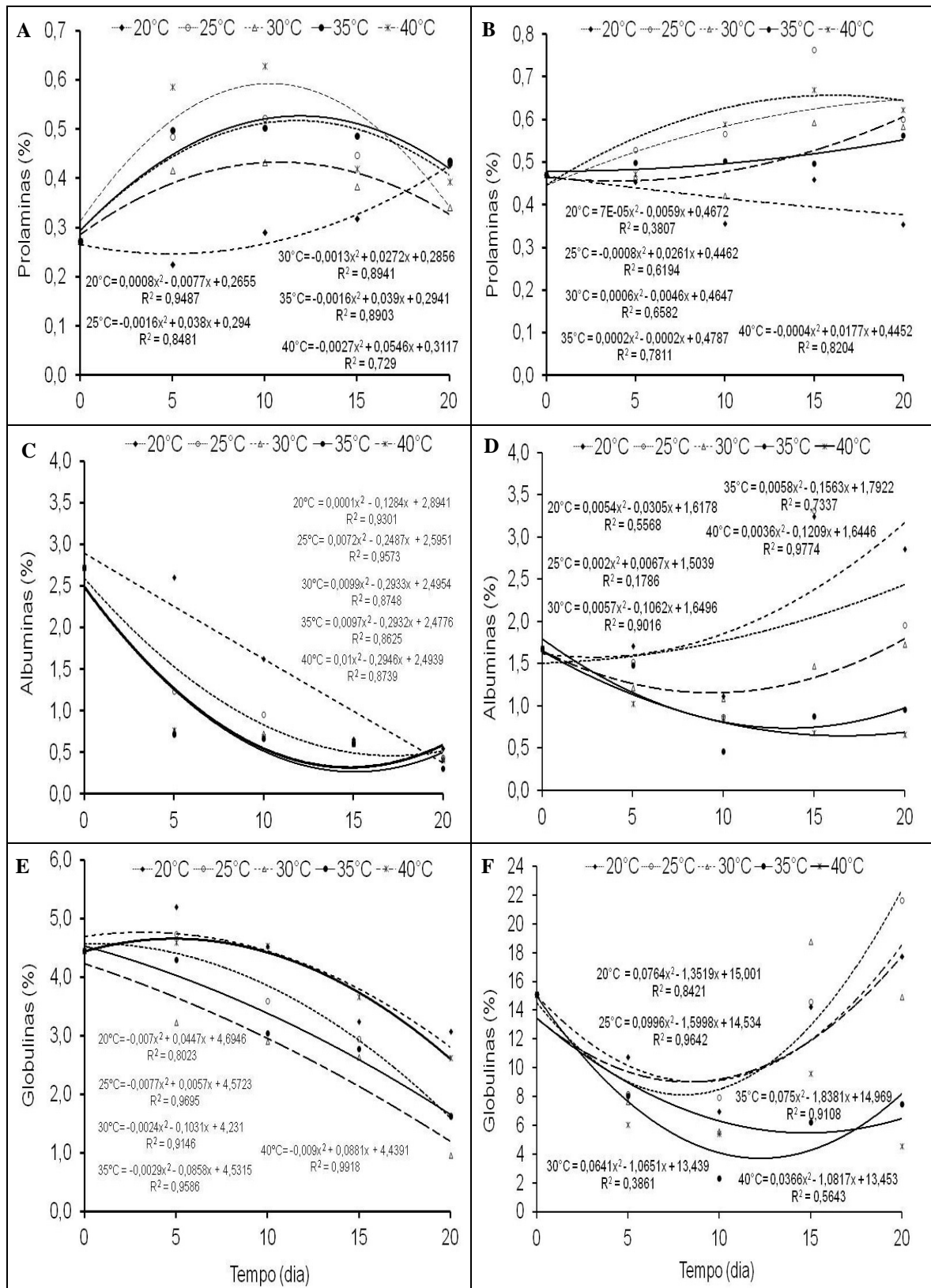
Espécie	Classe Protéica (%)					Prot. Totais
	Prolaminas	Albuminas	Globulinas	Glut. Básicas	Glut. Ácidas	
<i>P. multijuga</i>	0,27±0,01 A	2,72±0,16 A	4,45±0,16 B	2,43±0,94 B	0,10±0,06 B	9,99±1,29 B
<i>P. pendula</i>	0,47±0,01A	1,68±0,08 B	15,07±2,19 A	7,50±0,43 A	0,87±0,14 A	25,60±2,38 A

Demonstrando ser a fração glbulínica, a classe de proteínas majoritária na composição protéica de cotilédones das sementes de Fabaceae-Mimosoideae deste estudo. Esses resultados indicam que a concentração de proteínas varia entre as espécies, entretanto, a composição protéica, onde predominou as globulinas, possa ter uma estreita relação com o gênero *Parkia* ou mesmo com a subfamília Mimosoideae.

No que se diz respeito ao comportamento das classes protéicas frente aos fatores estudados, podemos observar que ocorreu um aumento na concentração das proteínas da classe das prolaminas na espécie *P. multijuga* de zero a 10 dias após semeadura (DAS), a partir de então houve decréscimo da concentração em todas as temperaturas, com exceção a de 20°C (Figura 8A). O mesmo não foi observado para *P. pendula*, a qual apresentou aumento destas proteínas até 15 DAS, com tendência de estabilização e decréscimo 20 DAS (Figura 8B).

Proteínas da classe albuminas apresentaram decréscimo acentuado até o tempo de 10 DAS, estabilizando e com tendência de acréscimo a partir de então, para ambas as espécies (Figura 8C-D). Entretanto, para as globulinas ocorreu decréscimo contínuo em *P. multijuga*, não sendo observado este comportamento em *P. pendula*, onde nesta espécie, ocorreu decréscimo acentuado até cinco dias após semeadura, aumentando progressivamente logo em seguida (Figura 8E-F). O decréscimo em *P. multijuga* foi mais acentuado sob as temperaturas de 20, 25 e 30°C.

Estes resultados demonstram que na espécie *P. multijuga* as globulinas são mobilizadas durante o processo de germinação e desenvolvimento da plântula, ao passo que em *P. pendula*, esta classe de proteínas é mobilizada prioritariamente durante o processo inicial de germinação.

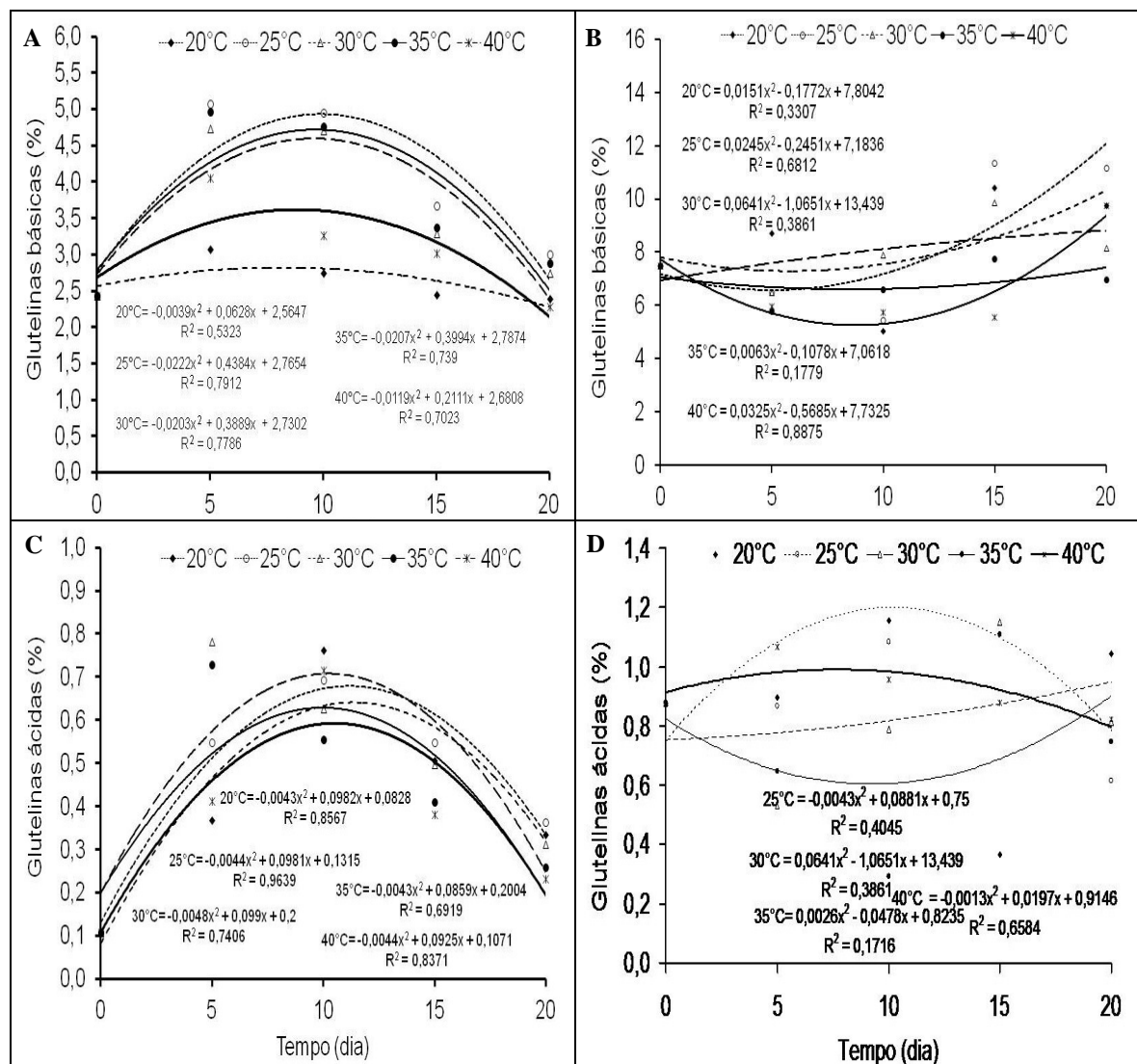


**Figura 8:** Fracionamento de proteínas de reserva em sementes quiescentes e submetidas a diferentes temperaturas e tempos de germinação de *P. multijuga* (A, C e E) e *P. pendula* (B, D e F), duas espécies florestais pertencentes à família Fabaceae-Mimosoideae.



As glutelinas ácidas e básicas exibiram comportamento semelhantes frente as temperaturas e tempos de germinação em sementes de *P. multijuga*, onde a concentração destas glutelinas aumentou significativamente até 10 DAS, decrescendo bruscamente até o final da avaliação, em todas as temperaturas estudadas (Figura 9A-C). Em *P. pendula* a concentração das glutelinas básicas apresentava-se estável até 10 DAS, aumentando posteriormente (Figura 9B).

Para *P. pendula* não foi observado padrão de síntese ou mobilização de glutelinas ácidas (Figura 9D).



**Figura 9:** Fracionamento de proteínas de reserva em sementes quiescentes e submetidas a diferentes temperaturas e tempos de germinação de *P. multijuga* (A e C) e *P. pendula* (B e D), duas espécies florestais pertencentes à família Fabaceae-Mimosoideae.

As proteínas, a exemplo dos demais compostos de reserva, iniciam a sua mobilização no período de desenvolvimento do embrião, normalmente suportando o crescimento da plântula e mantendo os processos que conferem capacidade de absorver nutrientes e realização de fotossíntese (Buckeridge *et al.* 2004).

Segundo Pontes *et al.*, (2002), as diferenças nos resultados entre os autores se devem, possivelmente, aos diferentes padrões de degradação de diferentes frações de proteínas de reserva, não sendo perceptível muitas vezes aumento ou decréscimo destes teores.

Os teores de proteínas totais variaram cerca de 2 a 9% nas espécies estudadas e foram mais elevados nos extratos totais de *Sesbania exasperata* e *Ormosia costulata*, com 5,1 e 8,9%, respectivamente, para as espécies pertencentes à sub-família Papilionoideae. Enquanto que, em *Tachigali plumbea* (Caesalpinoideae) o conteúdo protéico foi de 2,4% (Chevreuil *et al.*, 2009).

Sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, uma leguminosa pertencente à subfamília Caesalpinoideae, com teores de 6,8% de proteínas solúveis (Corte *et al.*, 2006), apresentou valor próximo ao obtido para *P. multijuga* (9,99%). Essas diferenças interespecíficas podem ser explicadas pela diversidade dos fatores do meio de crescimento das plantas matrizes, estágio de maturação dos frutos e sementes quando colhidos e analisados, assim como pela eficiência na extração das metodologias utilizadas.

Em sementes de *Euphorbia heterophylla* foi observado que, enquanto a globulina solúvel em solução salina foi degradada continuamente ao longo do período germinativo, a da albumina ocorria somente entre 60 e 84 horas de embebição. Para sementes de desta espécie, também foi evidenciado a translocação de aminoácidos provenientes da degradação das proteínas do cotilédone para o embrião (Suda & Giorgini, 2000).

### 3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE

Com os resultados do fracionamento de proteínas, verificou-se que as globulinas foi a classe de proteínas majoritária nos cotilédones de sementes quiescentes de ambas as espécies em estudo. Este foi um fator preponderante na seleção desta classe de proteínas, investigando-se seu comportamento em sementes quiescentes e sementes germinadas sob temperatura de 25°C e 40°C, nas duas espécies de Parkias.

O perfil protéico dos extratos da fração globulina revelaram bandas protéicas distintas para as duas espécies. Em sementes quiescentes de *P. pendula* observou-se duas bandas de proteínas com massas moleculares aparentes de 100 kDa e 47,8 kDa,

aproximadamente, estando as proteínas com menores massa molecular pouco evidentes (Figura 10-1).

Quando essas sementes foram submetidas à temperatura de germinação de 25°C, na análise eletroforética em SDS-PAGE dos cotilédones, foram obtidas duas bandas de proteínas com massas molecular aparente menores (39,8 kDa e 25,7 kDa) que as obtidas em sementes quiescentes (Figura 10-2). Entretanto, essas bandas protéicas não foram evidenciadas quando a germinação das sementes se deu sob temperatura de 40°C (Figura 10-3).

No perfil protéico de sementes quiescentes da espécie *P. multijuga*, observou-se uma banda de proteínas com massa molecular aparente em torno de 56,2 kDa (Figura 10-4), ao passo que em cotilédones de sementes germinadas a 25°C, a massa molecular aparente foi de 43,6 kDa. Não sendo observadas bandas protéicas quando as sementes foram germinadas sob 40°C (Figura 10-6).

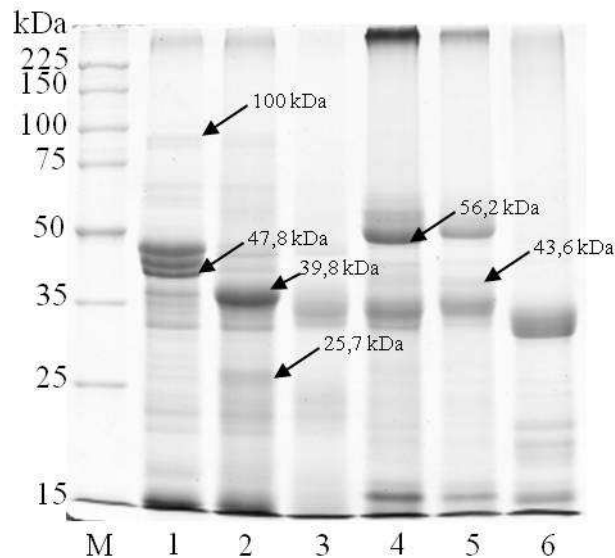
Os resultados sugerem que grande parte das proteínas pertencentes à classe das globulinas, foram mobilizadas durante a germinação sob temperatura de 25°C e possivelmente desnaturadas sob 40°C, em ambas as espécies deste estudo.

Em sementes de outras espécies leguminosas arbóreas da Amazônia, como *Tachigali plúmbea* e *Sesbania exasperata* o perfil protéico revelou ocorrência de proteínas com massas moleculares aparentes de 10 kDa a 30 kDa, ao passo que para *Ormosia costulata* observou-se intensa coloração de proteínas com massas moleculares aparentes variando entre 20-25 kDa (Chevreuil *et al.*, 2009).

A análise eletroforética em SDS-PAGE (10%) revelou grande número de bandas protéicas em sementes quiescentes de *Dipteryx odorata* (cumaru), apresentando grande variação de massa molecular aparente entre 115 e 19 kDa. Ao passo que no estágio correspondente as sementes com emissão de radícula, foram obtidas bandas protéicas com massa molecular aparente de 80 e 88 kDa, aproximadamente. Para *Hymenaea coubaril* (jatobá) foram encontradas menor número de bandas de proteínas que em sementes de *Dipteryx odorata*. A banda de maior massa aparente (95 kDa) foi encontrada em sementes com 20 mm de radícula (Melo, 2005).

Em sementes de *Theobroma gradiflorum*, espécie arbórea típica da região Amazônica, em estudos com a classe das globulinas, foram observados polipeptídios com massas moleculares aparentes de 14,5, 31 e 47 kDa, e somente globulinas do tipo vicilina (Carvalho *et al.*, 2008). Esses resultados sugerem a presença deste tipo de polipeptídios em cotilédones de sementes quiescentes de *P. pendula* e germinadas sob temperatura de 25°C para *P. multijuga*, visto a similaridade das massas moleculares.

Nas sementes, os vacúolos acumulam corpos protéicos ou proteína e carboidratos solúveis, em que as proteínas mais comuns são globulinas, encontradas nos embriões, e prolaminas, exclusivo para o endosperma dos cereais, e ambas funcionam como reserva de aminoácidos (Marty, 1999).



**Figura 11:** Eletroforese em gel de poliácridamida a 12,5% das frações globulínicas em cotilédones de sementes quiescentes e durante a germinação de *Parkia pendula* e *Parkia multijuga*. M: Marcadores de massa molecular, Promega. 1: Semente quiescente de *P. pendula*. 2: Cotilédones de *P. pendula* no estágio de emissão da radícula quando submetidas à germinação a 25°C. 3: Cotilédones de *P. pendula* no estágio de emissão da radícula quando submetidas à germinação a 40°C. 4: Semente quiescente de *P. multijuga*. 5: Cotilédones de *P. multijuga* no estágio de emissão da radícula quando submetidas à germinação a 25°C. 6: Cotilédones de *P. multijuga* no estágio de emissão da radícula quando submetidas à germinação a 40°C.

Diante dos resultados obtidos para os metabólitos analisados nesta investigação, percebe-se que apesar de pertencerem a mesma família e sub-família botânica, *Parkia multijuga* e *Parkia pendula* apresentam estratégias distintas na utilização das reservas orgânicas estocadas em seus cotilédones.

#### 4. Conclusão

✓ Faixas de temperaturas entre 30 a 35°C e 25 a 30°C favorecem maior germinação de sementes de *P. multijuga* e *P. pendula*, respectivamente.

✓ Dentre os metabólitos primários, os carboidratos na forma de amido, correspondem quantitativamente às reservas mais estocadas nos cotilédones de sementes da espécie *P. multijuga*, ao passo que as proteínas são acumuladas em maior quantidade em cotilédones de sementes de *P. pendula*.

✓ Os açúcares solúveis totais (AST) são mobilizados durante os estádios iniciais de germinação e desenvolvimento da plântula (10 dias após semeadura-DAS), sob as melhores temperaturas de germinação de sementes de *P. pendula*. Entretanto, *P. multijuga* não apresentou padrão de mobilização que explicassem as alterações no conteúdo de AST durante a germinação. Por outro lado, o conteúdo de AST apresentou acréscimo durante o desenvolvimento da plântula, associado ao aumento de temperatura.

✓ A espécie *P. multijuga* apresenta comportamento conservador na utilização de amido durante a germinação e desenvolvimento da plântula. Já em *P. pendula*, este carboidrato é mobilizado durante o desenvolvimento da plântula (10 a 20 DAS), associado às temperaturas de 25, 30 e 35°C.

✓ Enquanto em *P. multijuga* os lipídeos totais foram mobilizados no intervalo final de avaliação (15 a 20 DAS) associado às temperaturas crescentes, em *P. pendula*, o mesmo apresentou aumento crescente durante o processo de germinação e desenvolvimento da plântula.

✓ Ambas as espécies acumulam quantitativamente maior porcentagem de ácidos graxos insaturados em seus cotilédones. Sendo que em *P. multijuga* o ácido oléico é mobilizado durante o processo germinativo (0 a 10 DAS), ao passo que os ácidos mirístico, palmítico, esteárico e linoléico são mobilizados durante o processo germinativo e desenvolvimento da plântula (0 a 20 DAS), independente da temperatura de germinação. Diferentemente de *P. pendula*, em que os ácidos estes ácidos graxos são mobilizados durante o desenvolvimento da plântula (10 DAS).

✓ As proteínas são mobilizadas durante o processo germinativo e desenvolvimento da plântula de *P. pendula*, principalmente nas temperaturas de 25, 30 e 35°C. Já para *P. multijuga* a concentração de proteínas aumenta nos primeiro 10 dias, associada as temperaturas de até 35°C.

✓ Proteínas da classe das globulinas representam a maior fração em cotilédones de

sementes de *P. multijuga* e *P. pendula*, sendo que na primeira espécie as globulinas são mobilizadas durante o processo germinativo e desenvolvimento da plântula e na segunda esta classe protéica é mobilizada prioritariamente durante o processo inicial de germinação.

✓ Sementes de *P. multijuga* e *P. pendula* exibem bandas protéicas com massa molecular menores, quando germinadas sob temperatura de 25°C, comparada as sementes quiescentes e, ausência dessas bandas protéicas quando germinadas sob 40°C.

## 5. Referencias bibliográficas

- Bewley, J.D.; Black, M. 1994. *Seeds, physiology of development and germination*. 2 ed. New York: Plenum Press, 445p.
- Black, M.; Corbineau, F.; Grzesik, M; Guy, P. & Côme, D. 1996. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *Journal of Experimental of Botany*, v. 47, n. 295, p. 161-169.
- Borges, E.E.L.; Rena, A.B. 1993. Germinação de sementes. In: Aguiar, I. B.; Pina - Rodrigues, F.C.M.; Figliolia, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, p.83-136.
- Borges, E.E.L. 2003. *Comportamento bioquímico e fisiológico de sementes florestais nativas durante a embebição*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 107 pp.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. San Diego, v 72. P 248-254.
- Buckeridge, M.S.; Rocha, D.C.; Reid, J.S.G.; Dietrich, S.M.C. 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. *Physiologia Plantarum*, v.86, p.145-151.
- Buckeridge, M.S.; Santos, H.P. & Tiné, M.A.S. 2000. Mobilization of storage cell wall polysaccharides in seed. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38:141-156.
- Buckeridge, M.S.; Santos, H.P.; Tiné, M.A. & Aidar, M.P.M. 2004. *Acúmulo de reservas*. In: Ferreira, A.G.; Borguetti, F. (Eds). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p.31-50.
- Carvalho, A.V.; García, N.H.P. & Farfán, J.A. 2008. Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. *Ciênc. Technol. Aliment*. Campinas, 28(4): 986-993.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 588 p.
- Chevreuil, L.R.; Gonçalves, J.F.C.; Bariani, A.; Rodrigues, J.V.F.C. & Pando, S.C. 2009. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. *ACTA AMAZONICA*. vol. 39(1): p.199-206.
- Corte, V.B.; Borges, E.E.de.L.; Pontes, C.A.; Leite, I.T.de.A.; Ventrella, M.C. & Mathias, A. de. A. 2006. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento

- das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae Caesalpinoideae). Viçosa-MG, *Revista Árvore*, 30 (6): 941-949.
- Dubois, M.; Gillews, K.A.; Hamilton, J.K.; Reber, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, Washington, 28 (3): 350-356.
- Embrapa. 1999. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: Embrapa. Solos/Embrapa Informática Agropecuária/Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 370p.
- Ezeagu, I. E.; Petzke, J. K.; Metges, C. C.; Akinsoyinu, A. O. & Ologhobo, A. D. 2002. Seed protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for some uncultivated tropical plant seeds. *Food Chemistry*, 78: 105-109.
- Gonçalves, J.F.C.; Lima, R.B.S.; Fernandes, A.V.; Borges, E.E.L. & Buckeridge, M.S. 2010. Physiological and biochemical characterization of the assai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) during seed germination and seedling growth under aerobic and anaerobic conditions. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.34, n.6, p.1045-1053.
- Gonçalves, J.F.de.C.; Fernandes, A.V.; Oliveira, A.F.M.; Rodrigues, L.F. & Marengo, R.A. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14:139-142.
- Graham, I.A. 2008. Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology*, York, v. 59, n.1, p. 115-142.
- Guimarães, R.M. 1999. *Fisiologia de sementes – produção e tecnologia de sementes*. Lavras: UFLA/FAEPE, 129p.
- Kerbauy, G.B. 2004. *Fisiologia vegetal*. Universidade de São Paulo. p.386-408.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Marty, F. 1999. Plant vacuoles. *Plant Cell*, v.11, n.4, p.587-599.
- Matsui, K. Cucumber Cotyledon Lipoyxygenase during Postgerminative Growth. Its Expression and Action on Lipid Bodies. *Plant Physiology*, v. 119, p. 1279-1287, 1999.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A. 1989. *The germination of seeds*. 4 ed. Pergamon Press, McMillan, New York, 270 p.
- Melo, Z.L. DE O.; Gonçalves, J.F. DE C.; Mazzafera, P. & Santos, D.Y.A.C. DOS. 2009. Mobilization of seed reserves during germination of tropical species of the Amazon Rainforest. *Seed Sci. & Technol.*, 37, 597-607.
- Melo, Z.L.de.O. 2005. *Aspectos fisiológicos e bioquímicos durante a germinação de sementes*



- de espécies da flora amazônica*. Tese de doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 76 p.
- Müntz, K.; Belozersky, M.A.; Dunaevsky, Y.E.; Schlereth, A. & Tiedemann, J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, v.52, n.362, p.1741-1752.
- Oliveira, J.T.A. et al. 1998. Protein and lecitin mobilization during *Erythrina velutina* forma *Aurantiaca* seed germination and seedling growth in the dark. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 10, n. 1, p. 25-30.
- Otegui, M. et al. 1999. Development of the endosperm of *Myrsine laetevirens* (Myrcinaceae). II. Formation of protein and lipid bodies. *International Journal Plant Science*, v.160, n.3, p.501-509.
- Osborne, T.B. 1924. *The vegetable proteins*. 2.ed. London: Longmans Green and company, p.154.
- Passos, L.P. 1996. Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia Vegetal. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 223 p.
- Pinto, L.S.; Neto, M.A.; Bacarin, M.A.; Castellón, R.R.; Gadelha, T.S.; Gadelha, C.A. & Cavada, B.S. 2005. Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata* L. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. V.9, n.3, p.385-390.
- Pontes, C.A.; Borges, E.E.L.; Borges, R.C.G. & Soares, C.P.B. 2002. Mobilização de reserva em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. *Revista Árvore*, Viçosa, v.26, n.5, p.593-601.
- Qouta, L.A. et al. 1991. Changes in seed reserves and cell wall composition of component organs during germination of cabbage (*Brassica oleracea*) seeds. *Journal of Plant Physiology*, v. 138, p. 700-707.
- Silva, D.J. 1990. Análise de alimentos-métodos químicos e biológicos. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 165p.
- Silva, T.R.G.; Cortelazzo, A.L.; Dietrich, S.M.C. 1998. Variations in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 10, n. 2, p. 119-124.
- Suda, C.N.K. & Giorgini, J.F. 2000. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12 (3): 226-245.

- Vitale, A.; Bollini, R. 1995. Legume Storage Proteins. In: Kigel, J.; Galili, G. (Eds). *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York. p. 73-102.
- Ziegler, P. 1995. Carbohydrate degradation during germination. In: Kigel, J & Galili, G. *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, p.447-474.