

**ALGUNS ASPECTOS FISIOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES
E DA ANATOMIA FOLIAR DE *Protium widgrenii*
Engler.**

MARINA SEIFFERT

2003

56903
007920

MARINA SEIFFERT

**ALGUNS ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DA FOLIAR DE *Protium*
widgrenii Engler.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre"

Orientador

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2003

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Seiffert, Marina

Alguns aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes e anatomia foliar de *Protium widgrenii* Engler / Marina Seiffert. -- Lavras : UFLA, 2003.

81 p. : il.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia

1. Germinação. 2. Curva de embebição. 3. Anatomia foliar. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.973324
-583.24

MARINA SEIFFERT

**ALGUNS ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DA ANATOMIA FOLIAR DE
Protium widgrenii Engler**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre"

APROVADA em sexta-feira, 7 de março de 2003

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães

UFLA

Profa. Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula

UNIFENAS



Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Edna e Nilo,

pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida;

À minhas irmãs Carol e Mariana, por serem duas almas maravilhosas;

Ao meu sobrinho Mateus, o amor da minha vida,

OFEREÇO

À minha avó Maria, pelo amor e carinho;

Ao meu grande amigo Zeca, pela sua amizade e incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores do Departamento de Biologia - Setor de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao órgão de fomento à pesquisa CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Amauri Alves Alvarenga, pelo apoio e confiança no meu trabalho.

Aos meus coorientadores, Prof. Renato Mendes Guimarães e Prof. Evaristo Mauro de Castro, pela amizade, paciência e ensinamentos.

Aos funcionários Evaristo, Lena, Tanhã, Odorêncio, Mauro, Izonel e, em especial, ao Joel, pela ajuda durante as coletas.

A Profa. Maria das Graças, por disponibilizar o Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Lavras para a realização das análises químicas.

A Profa. Ana Cardoso C.F.F. de Paula, pelo apoio nas análises químicas e sugestões na realização do trabalho.

Ao Carlos Vinício, pelos cortes anatômicos e amizade.

Às amigas Lílian de Sousa Ribeiro e Claudia Rita de Souza, pelos conselhos, amizades e incentivo.

Aos meus grandes amigos Érico e Marco Antonio, pela ajuda e sugestões durante a realização do trabalho e companheirismo.

Aos amigos Sílvia, Claudinha, Cíntia, Clara, Rúbia, Gustavo, Daniela, Aurélio, Jorge, Kelciane e Morbek, pela amizade e maravilhosa convivência.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	1
1 Introdução geral	1
2 Referencial teórico	3
2.1 Caracterização da espécie	3
2.2 Fisiologia da germinação	4
2.3 Dormência	7
2.4 Tolerância à dessecação	10
2.5 Efeitos do sombreamento sobre a anatomia foliar	12
3 Referências bibliográficas	13
CAPÍTULO 2: Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de <i>Protium widgrenii</i> Engler	17
Resumo	17
Abstract	18
1 Introdução	19
2 Material e métodos	21
2.1 Teor de umidade das sementes	21
2.2 Curva de embebição	22
2.3 Análises bioquímicas	22
2.3.1 Obtenção do extrato bruto	23
2.3.2 Quantificações bioquímicas	23
2.4 Efeito dos extratos de frutos e de sementes de <i>Protium widgrenii</i> Engler sobre a germinação de <i>Lactuca sativa</i> L	24
2.5 Triagem fitoquímica	25
3 Resultados e discussão	27
3.1 Curva de embebição	27
3.2 Análises bioquímicas	29
3.3 Efeito dos extratos de frutos e de sementes de <i>Protium widgrenii</i> Engler sobre a germinação de <i>Lactuca sativa</i> L.	33
3.4 Estudo fitoquímico	38
4 Conclusões	41
5 Referências bibliográficas.....	42
CAPÍTULO 3: Influência da secagem e de diferentes temperaturas e na germinação de sementes de <i>Protium widgrenii</i> Engler	45
Resumo	45
Abstract	46
1 Introdução	47

2 Material e métodos	50
2.1 Considerações gerais	50
2.2 Avaliações realizadas	50
2.2.1 Teor de umidade das sementes	50
2.2.2 Teste de viabilidade	51
2.3 Efeito da secagem e de diferentes temperaturas na germinação de <i>Protium widgrenii</i> Engler	51
3 Resultados e discussão	53
3.1 Avaliações realizadas	53
3.2 Efeito da secagem e de diferentes temperaturas na germinação de <i>Protium widgrenii</i> Engler	54
4 Conclusões	61
5 Referências bibliográficas	62
CAPÍTULO 4: Aspectos comparativos da anatomia foliar em diferentes ambientes de <i>Protium widgrenii</i> Engler	64
Resumo	64
Abstract	65
1 Introdução	66
2 Material e métodos	68
2.1 Análise estatística	69
3 Resultados e discussão	70
4 Conclusões	78
5 Referências bibliográficas	79

RESUMO

SEIFFERT, Marina. **Alguns aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes e anatomia foliar de *Protium widgrenii* Engler.** 2003. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Para o estabelecimento de espécies nativas, independente de sua finalidade, sendo econômica ou ecológica, é necessário o conhecimento prévio de suas características fisiológicas e suas exigências ambientais. Diante disso, os objetivos deste trabalho foram: caracterizar a curva de embebição e a composição química das sementes durante o processo germinativo; verificar a presença de compostos nos extratos de sementes e frutos maduros de *Protium widgrenii* Engler que interferem no processo germinativo de sementes de alface (*Lactuca sativa* L) e o efeito da temperatura e da dessecação sobre a germinação de *Protium widgrenii* Engler e, ainda, alguns aspectos anatômicos foliares de suas mudas, sob diferentes níveis de sombreamento. Os resultados da curva de embebição demonstraram que estas sementes possuem uma fase inicial (fase I) de embebição mais lenta, fase II rápida e a protrusão da radícula é atingida em 72 horas, havendo algumas modificações nos conteúdos de açúcares solúveis totais e proteínas durante estas fases de embebição. Sementes e os frutos de *Protium widgrenii* Engler possuem alguns compostos que possivelmente interferem na germinação de sementes de alface, sendo estes predominantemente fenólicos. Os resultados de germinação demonstraram que as sementes de *Protium widgrenii* Engler apresentaram comportamento de tolerância à dessecação, sendo a melhor temperatura para a germinação em torno de 25° C. Nos experimentos de campo em que foram utilizados diferentes níveis de sombreamento, as mudas apresentaram modificações anatômicas influenciada pela intensidade luminosa, observando que, com o aumento da intensidade luminosa, houve maior espessura do limbo foliar.

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Orientador), Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA (Co-Orientador), Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães–UFLA(Co-Orientador)

ABSTRACT

SEIFFERT, Marina. Some physiological and biochemical aspects of the germination and leaf anatomy of *Protium widgrenii* Engler. 2003. 81 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

For the native species establishment independent of its economical and ecological use it is necessary to know their physiologic characteristics and their environmental demands. The objective of this work was to characterize the soaking curve and the seed chemical composition during the germinative process, to verify the presence of compounds in the seed extracts and *Protium widgrenii* Engler ripe fruits which interfere in the germination of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L) germinative process, the temperature and drying effects about of *Protium widgrenii* Engler germination and some leaf anatomical aspects of their seedlings, under shading levels. The soaking curve results demonstrated that these seeds have soaking initial phase (phase I), a lag phase II and the root protrusion is reached in 72 hours with the existence of some modifications in the total soluble sugars compounds and proteins during these soaking phases. The *Protium widgrenii* Engler seeds and the fruits, possess some compounds predominantly phenolics ones that possibly interfere in the lettuce seeds germination. The germination results demonstrated that *Protium widgrenii* Engler, seeds presented drying tolerance behavior being the best germination temperature around 25°C. In the field experiments were used different shading levels, the presented anatomical modifications influenced by the luminous intensity. It was observed that with the increase in light intensity was correlated with higher leaf limb thickness.

* Comitee - Advisor: Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga - UFLA, Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA, Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado é constituído de uma diversidade de espécies, algumas utilizadas popularmente por suas propriedades medicinais e alimentícias, além de serem fornecedoras de madeiras duráveis, entre outros aspectos.

Por várias décadas o cerrado vem sofrendo devastação pelo modelo exclusivamente extrativista, para expansão da fronteira agrícola e construção de usinas hidrelétricas. Como consequência, o desequilíbrio deste ecossistema afeta a qualidade de vida terrestre e promove a extinção de espécies com potencial comercial e ecológico, o assoreamento de rios, reservatórios hidroelétricos e de outros mananciais.

Para impedir o desaparecimento destas espécies e para a recuperação de áreas degradadas é necessária a implantação e manejo de espécies florestais nativas. Para compreender melhor os mecanismos de regeneração de um ecossistema florestal deve-se dispor de maior número de informações sobre o ciclo biológico da espécie. Por outro lado, pouco é conhecido sobre o comportamento fisiológico, capacidade germinativa e disponibilidade de sementes dificulta a implantação de produção de mudas e o manejo de espécies florestais.

Várias espécies com potencial para revegetação e/ou recuperação foram identificadas, entre elas *Protium widgrenii* Engler, chamada popularmente de almecega-vermelha, porém, pouco se conhece sobre sua fisiologia de propagação (Oliveira Filho et al., 1994).

Diante desta problemática, os objetivos deste trabalho foram estudar o comportamento das sementes de *Protium widgrenii* durante o processo de

embebição, avaliando as alterações de sua composição química. Foram também estudados os efeitos de diferentes temperaturas e secagem na germinação, a presença de possíveis inibidores nas sementes e nos frutos maduros que eventualmente poderiam interferir no processo germinativo e alguns aspectos anatômicos foliares de mudas submetidas a diferentes níveis de sombreamento, com o intuito de obter informações visando à melhoria dos índices de germinação dessas sementes, bem como a produção de mudas de *Protium widgrenii* Engler.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da espécie

A família Burseraceae é constituída por cerca de 21 gêneros e mais de 600 espécies (Zoghbi et al., 1993a). O gênero *Protium* é o que apresenta maior número de indivíduos nas matas, distribuindo-se em diferentes regiões do Brasil como a Amazônia, Bahia, Minas Gerais, Goiás, São Paulo até o Rio Grande do Sul, apresentando desde espécies arbustivas pouco expressivas como produtoras de madeira, até as arbóreas, como o *Protium termifolium* Engler encontrado na Amazônia (Jesus et al., 1998; Klein, 1978).

As espécies de *Protium* habitam preferencialmente no interior de bosque, podendo ocorrer em formações abertas, como no Cerrado do Brasil (Pirani, 1993). De muitas espécies de *Protium*, extrai-se uma resina balsâmica que apresenta aplicações terapêuticas e ensitífugas (Hoehne, 1939 citado por Zoghbi et al., 1993b). Por ser sua resina aromática e inflamável, são chamados popularmente de almecega, breu, pau de mosquito e árvore de incenso.

Segundo Klein (1978), *Protium widgrenii* Engler é uma das espécies mais freqüentes em matas semidecíduas, desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, também ocorrendo com freqüência na mata secundária semidecídua pertencente ao estrato superior da mata situada no Campus da Cidade Universitária de São Paulo (Varanda, 1995).

P. widgrenii Engler é uma espécie florestal encontrada em margens de rios e matas do Cerrado do estado de Minas Gerais. Segundo Oliveira Filho et al. (1994), esta espécie pode ser recomendada para o reflorestamento de áreas degradadas e de preservação permanente em composições mistas.

Em outras espécies da família Burseraceae, como *P. heptaphyllum* March e *P. spruceanum* Engl., sabe-se que as taxas de germinação são muito baixas e a emergência ocorre entre 3-5 semanas (Lorenzi, 1992).

Várias espécies de *Protium* estudadas apresentam frutos obliquamente ovóides globulosos, apresentando 2-4 pirênios, bitriloculares. Nos frutos triloculares, em geral, dois lóculos são férteis e um estéril, sendo este mais ou menos comprido, característica essa, que faz com que a percentagem de germinação seja baixa. O exocarpo coriáceo, de pouca espessura, freqüentemente quebradiço, endurecido, de cor parda a avermelhada, atropúrpura ou quase negra, é sempre deiscente em valvas. O mesocarpo, membrano-carnoso, geralmente branco, cobre a superfície de cada pirênio. Este é ovóide, com textura firme, dificultando a germinação. A semente possui testa membranácea e embrião crasso, com cotilédones plano-convexo e eixo hipocótilo-radicular curto (Barroso et al., 1999). A Figura 1, a seguir, mostra o aspecto geral das sementes e frutos de *Protium widgrenii* Engler.

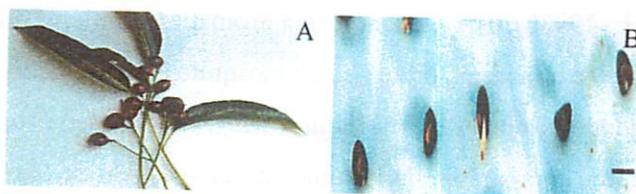


FIGURA 1: Aspectos gerais de frutos (A) e sementes (B) de *Protium widgrenii* Engler. Barra= 6mm . UFLA, Lavras - MG, 2003.

2.2 Fisiologia da germinação

A germinação é considerada um dos mais importantes estádios do biociclo vegetal, caracterizada pela retomada das atividades anabólicas e catabólicas, incluindo a respiração, síntese de proteínas e mobilização das

reservas após a absorção da água, possibilitando o crescimento do eixo embrionário, culminando com a protrusão da radícula. No desenvolvimento vegetal, a germinação é considerada uma fase crítica e está relacionada a aspectos fisiológicos e bioquímicos associados a fatores ambientais (natureza extrínsecas) e da própria semente (natureza intrínsecas) (Bewley & Black, 1994; Desai et al., 1997; Carvalho & Nakagawa, 1980).

O ambiente exerce um papel fundamental na fisiologia da germinação. A sensibilidade à luz, temperatura e a disponibilidade de água, dentre outros, são fatores determinantes na germinação (Bewley & Black, 1994).

Para que ocorra a germinação é necessário que as sementes absorvam água, desencadeando os processos metabólicos. Esta absorção geralmente se dá em três fases, classicamente definidas como fase I, fase II e fase III. A fase I se caracteriza por ser um processo físico, em que a entrada de água ocorre pela diferença de potencial osmótico entre a semente e o substrato, ligado à composição química da semente, da permeabilidade do tegumento à água e da presença da água na forma líquida ou gasosa, no meio de germinação. Esta fase é presente tanto em sementes viáveis quanto nas inviáveis (Bewley & Black, 1983; Desai et al., 1997; Carvalho & Nakagawa, 1980; Kigel & Galili, 1995).

A fase II é caracterizada pela total hidratação das sementes, havendo uma estabilização e equilíbrio na absorção de água pela semente em relação ao meio. A maioria dos eventos metabólicos que fazem parte na preparação da germinação ocorre nesta fase, como a biossíntese de novo e ativação de enzimas, hidrólise de reservas e início da translocação dos produtos da hidrólise, ocorrendo o transporte ativo das substâncias hidrolizadas dos tecidos de reserva para os meristemas. Com a retomada de crescimento do eixo embrionário, inicia-se a fase III, com a protrusão da radícula (Desai et al., 1997; Kigel & Galili, 1995).

Na fase III, observa-se uma retomada e aumento na velocidade de embebição, seguidas por um crescimento visível do eixo embrionário. Alguns aspectos estão envolvidos nesta fase, como o potencial osmótico das células do embrião, propriedades da parede celular embrionária em resposta ao turgor interno e a resistência dos tecidos externos presentes, impedindo a expansão do embrião. Tecidos envolvendo o embrião manifestam-se como forças impedindo a capacidade de seu crescimento. Com o acúmulo de solutos, aumenta o turgor embrionário, enfraquecendo os tecidos externos, podendo alterar o balanço das forças presentes, permitindo assim a expansão do embrião. O início do crescimento embrionário ocorre quando o resultado da absorção da água no turgor celular excede a restrição mecânica da parede celular embrionária e dos tecidos que envolvem o embrião. Cada uma dessas hipóteses podem ocorrer, dependendo da anatomia e fisiologia da semente (Kigel & Galili, 1995; Welbaum et al., 1998).

A duração dessas fases depende das propriedades da semente. As três fases foram descritas em seqüências por razões didáticas, contudo, elas podem ocorrer simultaneamente.

O estudo destas fases é de grande importância, pois, desde que o processo de germinação se inicia, as sementes apresentam gradualmente uma fase de tolerância à dessecação, a partir da fase I. Dessa maneira, a desidratação durante esta etapa não provoca injúrias definitivas ao embrião, de modo que o fornecimento subsequente de água permite a continuidade da germinação. No entanto, a partir da transição entre as fases II e III, os danos provocados pela deficiência hídrica são irreparáveis (Kigel & Galili, 1995).

O efeito da temperatura na germinação está relacionada com as necessidades das enzimas que participam em vários processos metabólicos durante a germinação, os quais afetarão, conseqüentemente, a velocidade e a porcentagem final de germinação. A temperatura ótima para a maioria das

espécies adaptadas ao clima tropical se encontra na faixa entre 15°C e 30°C, sendo definida geneticamente em função das condições fisiológicas da semente (Carvalho & Nakagawa, 1980).

Trabalhando com *Maquira sclerophylla*, espécie pertencente à família Moraceae, Miranda & Ferraz (1999), verificaram que a faixa entre 20°C e 30°C mostrou-se favorável à germinação, com percentagem superior a 60%.

Estudando o efeito entre temperaturas constantes e alternadas na germinação de sementes de *Operculina alata* (Convolvulaceae), França et al. (2002) verificaram que temperaturas constantes de 25°C apresentam maiores percentagens e maior índice de velocidade de germinação.

Recomenda-se que sejam incluídas temperaturas alternadas para pesquisas relacionadas à metodologia de análise de germinação de sementes florestais, uma vez que essas simulariam flutuações de temperaturas que ocorrem em condições naturais (Oliveira et al., 1989; Kebreab & Murdoch, 1999). –

2.3 Dormência

A capacidade das sementes de adiar a sua germinação até que as condições lhe sejam favoráveis é um importante mecanismo de sobrevivência das plantas. Determinadas espécies caracterizam-se por apresentarem sementes viáveis que, ao serem colocadas sob condições ambientais consideradas favoráveis, não germinam, sendo assim estas sementes são consideradas dormentes. Ao contrário, quando apresentam condições internas normais e permanecem em repouso, devido à ausência de condições externas propícias, estas encontram-se em estado de quiescência (Carvalho & Nakagawa, 1980; Bewley & Black, 1994).

Segundo Bewley & Black (1994), a dormência pode ser classificada em três tipos básicos: a) dormência devido à imaturidade do embrião, na qual a semente dispersa contém o embrião que ainda não completou seu desenvolvimento; b) dormência fisiológica, a semente possui o embrião maduro, mas apresenta impedimentos metabólicos à germinação, como hormônios e proteínas inibidoras e c) dormência tegumentar, há o bloqueio da germinação pelos tegumentos que revestem o embrião, podendo ainda ocorrer a combinação entre esses tipos, caracterizando uma dupla dormência.

Já foi relatado que a dormência de sementes é regulada pela interação entre promotores e inibidores de germinação. Destacam-se, como hormônios promotores de crescimento, as giberelinas e as citocininas, sendo sua ação antagônica ao ácido abscísico. Em muitas espécies, a dormência nas sementes é imposta pela presença de fenóis no tegumento que, pela sua oxidação, diminui a disponibilidade de oxigênio para a germinação (Desai et al., 1997).

A prevenção à germinação pelas estruturas de cobertura das sementes pode interferir no ganho da água, nas trocas gasosas e na presença de inibidores químicos. O tegumento da semente pode representar uma barreira para a saída dos inibidores presentes nas sementes, uma restrição mecânica e ainda causar modificações na luz que atinge o embrião (Bewley & Back, 1994).

A dormência de sementes devido à imaturidade do embrião frequentemente é associada à presença de substâncias inibitórias de germinação e de crescimento presentes em diferentes partes das sementes. Este tipo de dormência pode ser quebrado quando as sementes são embebidas a baixas temperaturas. Esta técnica é conhecida como estratificação, que tem como finalidade a lixiviação de substâncias inibitórias presentes na semente e o início da biossíntese de giberelinas pela baixa temperatura (Carvalho & Nakagawa, 1980; Desai et al., 1997; Al-Helal, 1996).

Em sementes de *Lupinus sulphureus* (Kaye & Kukendall, 2001) e em *Briza subaristata* (Ferrari & Lopez, 2000), constatou-se o efeito positivo da estratificação na quebra de dormência aumentando a germinação. Sementes de *Campis radicans* tiveram a percentagem de germinação favorecida pelo pré-tratamento a frio, por um período de duas semanas (Chachalis & Reddy, 2000).

Diversos grupos químicos de inibidores presentes em sementes, frutos e outras unidades dispersoras podem interferir de forma expressiva no processo germinativo. Sua liberação por lixiviação geralmente favorece a germinação dessas sementes (Kigel & Galili, 1995).

Buta & Lusby (1986), trabalhando com sementes do gênero *Lespedeza* (*L. stipulacea*; *L. bicolor* e *L. cuneata*), pertencente à família Fabaceae, evidenciaram que lixiviados destas sementes inibiram a germinação e o crescimento inicial de plântulas de *Lactuca sativa*. Laura et al. (1994) relataram que extratos concentrados de frutos de *Muntingia callabura* (Elalocarpaceae) inibiram também a germinação de sementes de *Lactuca sativa* L.

Os triterpenóides (produtos derivados do metabolismo secundário pela via do melavonato), presentes em algumas sementes ou em outros órgãos vegetais, desempenham diversos papéis, como hormônios de sinalização, fitoalexinas, entre outros (Simões et al., 2000). Foram encontradas classes de triterpenóides em parte aérea de *Essenbeckia yaxhoob* (Rutaceae) atuando como inibidores de germinação e crescimento. Alguns tipos de triterpenóides também inibiram ATP síntase, fosforilação e o fluxo de elétrons (Mata et al., 1998).

Os compostos fenólicos podem ser sintetizados pelo metabolismo secundário possivelmente por duas rotas principais: uma derivada do ácido chiquímico e outra do acetato mevalonato (Simões et al., 2000). São encontrados amplamente na natureza, sendo alguns relatados como inibidores, no caso dos flavonóides encontrados em *Melilotus messanensis* (Fabaceae) que inibiram, principalmente, a germinação de *Allium cepa* (Macías et al., 1999).

Outros compostos fenólicos encontrados em algumas espécies que também influenciam na germinação e no crescimento, são os taninos hidrolisáveis e condensados chamados de catequinas. Trabalhando com sementes do gênero *Lespedeza*, Buta & Lusby (1986) encontraram catequinas e epicatequinas lixiviadas na solução em que estas sementes foram embebidas. Estes compostos isolados inibiram a germinação de sementes de *Lactuca sativa*, verificando que quanto maior a concentração destes compostos maior a inibição na germinação.

2.4 Tolerância à dessecação

De maneira geral, grupos de sementes que são relativamente tolerantes à extrema dessecação e sobrevivem em estado desidratado por um período maior sob condições adequadas de armazenamento, são denominados de ortodoxas. No entanto, as sementes classificadas como recalcitrantes, quando submetidas à dessecação, são danificadas, podendo ser sensíveis a condições de baixas temperaturas e períodos longos de armazenamento. Entretanto, existem sementes que exibem comportamento intermediário entre as recalcitrantes e ortodoxas, sendo, assim, relativamente tolerantes à dessecação; todavia, não resistem à perda de umidade em níveis menores que as ortodoxas (Roberts, 1973, citado por Pammenter & Berjak, 1999).

A classificação quanto a tolerância e a dessecação mencionada anteriormente, baseia-se em sementes de espécies de importância econômica, porém, com limitações de armazenamento.

Muitas vezes, o teor de umidade apresentado pela semente recém-colhida não é adequado para o armazenamento, necessitando de secagem. O alto teor de umidade apresentado pelas sementes constitui uma das principais causas



da perda do seu poder germinativo durante o armazenamento (Carvalho & Nakagawa, 1980).

Vários processos ou mecanismos têm sido sugerido como protetores das conseqüências geradas pela perda de umidade das sementes. Dentre eles, ressaltam-se algumas características físicas intracelulares, como acúmulo e a natureza das reservas insolúveis, grau de redução do vacúolo, conformação do DNA, cromatina e arquitetura nuclear, de-diferenciação intracelular, presença e eficiência de sistemas antioxidantes, o acúmulo de substâncias supostamente protetoras, como, por exemplo, as proteínas LEA, sacarose e certos oligossacarídeos e a presença de sistemas operacionais de reparo dos sistemas de membranas durante a reidratação. A ausência ou a ineficiência de um ou mais desses mecanismos podem determinar o grau de sensibilidade à dessecação para cada espécie (Pammenter & Berjak, 1999).

Trabalhando com o efeito de secagem na germinação de espécies de *Citrus*, Saipari et al. (1998) relataram que duas espécies testadas a *C. karna* e *C. grandis* foram favoravelmente tolerantes à dessecação, reduzindo apenas 10%-15% da germinação. Por outro lado, a *C. jambheri* mostrou-se mais sensível à dessecação em sílica, resultando numa queda de 30% na sua germinação. Para *Poncirus trifoliata* e o híbrido *Troyer citrange*, a dessecação em sílica reduziu consideravelmente a germinação.

Carvalho (2000), avaliando a germinação de sementes de espécies florestais (*Alchornea triplinervea*, *Senna multijuga* e *Cedrela fissilis*) submetidas a diferentes graus de dessecação, relatou que estas mantiveram as percentagens de germinação constantes após a secagem.



2.5 Efeitos do sombreamento sobre anatomia foliar

A luz exerce sobre a anatomia foliar um efeito marcante, tanto nos primeiros estádios de desenvolvimento quanto no estágio adulto, pois a folha é um órgão de elevada plasticidade e sua estrutura interna adapta-se às condições de luz do ambiente. A influência da luz sobre a anatomia foliar pode ser avaliada com base na sua intensidade, qualidade e quantidade (Castro, 2002; Santo & Pugialli, 1998).

Folhas de plantas crescidas sob ambientes ensolarados apresentam-se menores, mais espessas e com mais biomassa acumulada por unidade de área em relação às cultivadas à sombra que, por sua vez, apresentam-se mais delgadas com maiores espaços intracelulares. Este fato se deve, provavelmente, a uma taxa fotossintética mais elevada a pleno sol, em comparação com as plantas crescidas à sombra (Bjorkman, 1981; Carpenter & Smith, 1981; Castro, 2002; Castro et al., 1998).

Para *Fragaria virginiana*, (Rosaceae), uma espécie adaptada à sombra, verificou-se, uma maior quantidade de tecido mesofiliano quando houve um aumento na intensidade de luz, favorecendo o desenvolvimento do tecido paliçádico, os quais elevam significativamente a capacidade fotossintetizante (Chabot, 1979).

Segundo Rizzini (1976), algumas plantas desenvolvem tecidos mecânicos que estão ligados à intensidade luminosa. Almeida (2001), trabalhando com *Cryptocaria aschersoniana* (Lauraceae), relatou a presença de tecidos lignificados envolvendo a extensão da bainha do sistema vascular em plantas submetidas a pleno sol. Castro (2002) constatou a presença de massa esclerenquimática nas nervuras de plantas de *Mikania glomerata* expostas ao sol.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. P. **Germinação, crescimento inicial e anatomia de plantas jovens de *Cryptocaria aschersoniana* MEZ. sob diferentes níveis de radiação.** 2001. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- AL-HELA, A. A. Studies on germination of *Rumex dentatus* L. seeds. **Journal of Arid Environments**, London, v. 33, n. 1, p. 39-37, 1996.
- BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas.** 20. ed. Viçosa, MG: UFV, 1999. 443 p.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology biochemistry of seeds.** New York, 1983. v. 1, 305 p.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BJÖRKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O.; NOBEL, P. S.; OSMONA, C. B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Physiological plant ecology I. response to the physical environment: encyclopedia of plant physiology.** New York: Singer-Verlag, 1981. p. 57-60.
- BUTA, G.; LUSBY, W. R. Catechins germination and growth inhibitors in *Lespedeza* seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 93-95, Jan. 1986.
- CARPENTER, S. B.; SMITH, N. D. A comparative study of leaf thickness among southern Appalachian hardwoods. **Canadian Journal of Botanic**, Ottawa, v. 59, n. 8, p. 1393-1396, Aug. 1981.
- CARVALHO, L. M. de. **Classificação fisiologica de sementes de espécies florestais quanto à capacidade de armazenamento.** 2000. 97 p. Dissertação (Mestrado em Produção Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CARVALHO, N. M. de.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** Campinas: Fundação Cargil, 1980. 429 p.

CASTRO, E. M. Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel (GUACO) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento. 2002. 221 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CASTRO, E. M.; GAVILANES, M. L.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, D. M.; GAVILANES, T. O. T. Aspectos da anatomia foliares de mudas de *Guarea guidoneo* (L.) Sleumer, sob diferentes níveis de sombreamento. *Daphne*, Belo Horizonte, v. 8, n. 4, p. 31-35, out. 1998.

CHABOT, B. F.; JURIK, T. W.; CHABOT, J. F. Influence of instantaneous and integrated light-flux density on leaf anatomy and photosynthesis. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 66, n. 8, p. 1393-1396, Aug. 1979.

CHACHALIS, D.; REDDY, K. N. factors affecting *Campis radicans* seed germination and seedling emergence. *Weed Science*, Lawrence, v. 48, n. 2, p. 212-216, Mar./Apr. 2000.

DESAI, B. B.; KOTECHA, P. M.; SALUNKHE, D. K. *Seeds handbook: biology, production, processing and storage*. New York, 1997. v. 1, 627 p.

FERRARI, L.; LOPEZ, C. Germination conditions for *Briza subaristata*: pretreatments and temperature effects. *Seed Science and Technology*, Zurich v. 28, n. 3, p. 631-639, Jan. 2000.

FRANÇA, E. A. de.; FILHO, S. M.; FREITAS, J. B. S. Avaliação de germinação de sementes de *Operculina alata* em dois substratos e cinco condições ambientais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 2, p. 232-236, mar./abr. 2002

JESUS, M. A.; MORAIS, J. M.; ABREU, L. S. de.; CARDIAS, M. F. Durabilidade natural de 46 espécies de madeira amazônica em contato com o solo em ambiente florestal. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n. 54, p. 81-92, dez. 1998.

KAYE, T. N.; KUYKENDALL, K. Effects of scarification and cold stratification on seed germination of *Lupinus sulphureus* ssp. *Kincaidii*. *Seed Science Technology*, Zurich, v. 29, n. 6, p. 663-668, 2001.

KEBREAB, E.; MURDOCH, A. J. A model of the effects of a wide range of constant and alternating temperatures on seed germination of four *Orabanche* species. *Annals of Botany*, London, v. 84, p. 549-557, June 1999.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York, 1995. 853 p.

KLEIN, R. M. **Contribuição ao conhecimento da flora e da vegetação do Vale do Itajaí - Santa Catarina**. 1978. 112 p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

LAURA, V. A.; ALVARENGA, A. A. de.; ARRIGONI, M. F. de. Effects of growth regulators, temperature, light, storage and other factors on the *Muntingia calabura* L. seed germination. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 2, p. 573-579, 1994.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

MACÍAS, F. A.; SIMONET, A. M.; GALINDO, J. C. G.; CASTELLANO, D. Bioactive phenolics and polar compounds from *Melilotus messanensis*. **Phytochemistry**, Oxford, v 50, n. 1, p. 35-46, Jan. 1999.

MATA, R.; MACÍAS, M. L.; ROJAS, I. S.; LOTINA-HENNSEN, B.; TOSCANO, R. A.; ANAYA, A. L. Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. **Phytochemistry**, Oxford, v 49, n. 2, p. 441-449, Jan. 1998.

MIRANDA, P. R. M. de.; FERRAZ, I. D. K. Efeito da temperatura na germinação de sementes e morfologia da plântula de *Maquira sclerophylla* (Ducke) C. C. Berg. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 303-307, out. 1999. Suplemento.

OLIVEIRA FILHO, A. T.; VILELA, E. A.; GAVILANES, M. L.; CARVALHO, D. A. Effects of flooding and understory bamboos on the physiognomy and tree species composition of a tropical semideciduous forest in Southeastern Brazil. **Vegetatio**, The Hague, v. 113, n. 1, p. 99-124, 1994.

OLIVEIRA, E. C.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. Propostas para a padronização de metodologia em análise de sementes florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 11, n. 1, p. 1-42, 1989.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A Review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-137, Mar. 1999.

PIRANI, J. R. **Flora del Paraguai** – Burseraceae, São Paulo: USP, v. 21,1993. Disponível em: <[http:// felix.ib.usp.br/fitoquim/afr/about.Htm](http://felix.ib.usp.br/fitoquim/afr/about.Htm)>.

Acesso em:

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos**. São Paulo: HUCITEC/EDUSP, 1976. 327 p.

SAIPARI, E.; GOSWAMI, A. M.; DADLANI, M. Effect of seed drying on germination behaviour in citrus. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 73, n. 2/3, p. 185-190, Mar. 1998.

SANTO, A. E. do.; PUGIALLI, H. R. L. Estudo da plasticidade anatômica foliar de *Stromanthe thalia* (Vell.) J. M. A. Braga (Marantaceae) em dois ambientes de mata atlântica. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 76/77, p. 107-122, 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAM, G.; MELLO, J. C. P. de.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. rev. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2000. 821 p.

VARANDA, E. M. Balanço hídrico de espécies de mata secundária semidecídua – II. *Endlicheria paniculata* (Spreng.) Macbride (Lauraceae), *Protium widgrenii* Engler (Burseraceae) e *Sorocea bonplandii* (Baill.) Burger, Lanj. & Boer (Moraceae). **Boletim de Botânica**, São Paulo v. 14, p. 81-89, 1995.

WELBAUM, G. E.; BRADFORD, K. J.; YIM, K.; BOOTH, D. T.; OLUOCH, M. O. Biophysical, physiological and biochemical processes regulating seed germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 161-172, June 1998.

ZOGHBI, M. G. B. da.; CUNHA, E. V. L. da.; FILHO WOLTER, W. Essential oil of *Protium unifoliolatum*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 23, n. 1, p. 15-16, Mar. 1993a

ZOGHBI, M. G. B. da.; SIQUEIRA, J. B. G.; WOLTER, E. L. A.; JÚNIOR, O. L. P. Constituinte químicos de *Protium paniculatum*. **Acta Amazônica**, Manaus v. 23, n. 2-3, p. 187-189, abr./set. 1993b.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Protium widgrenii* Engler.

RESUMO

SEIFFERT, Marina. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de *Protium widgrenii* Engler.** 2003. 28 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Protium widgrenii Engler é uma espécie nativa do cerrado, havendo, dentro deste gênero, algumas espécies utilizadas popularmente por suas propriedades medicinais, alimentícias e fornecedoras de madeiras duráveis. Este trabalho teve como objetivo estudar o comportamento das sementes durante a embebição associada à sua composição bioquímica e à verificação de compostos inibidores de germinação presentes em sementes e frutos maduros de *Protium widgrenii* Engler. No teste de embebição com água, as sementes foram submetidas à pesagens em intervalos de tempo de três horas e, a partir da porcentagem do ganho de peso, traçou-se a curva de embebição, a qual apresentou um modelo trifásico, podendo a protrusão da radícula ser observada após 72 horas de embebição. Durante este processo ocorreram modificações nos teores de açúcares solúveis totais e proteínas, porém, os teores de açúcares redutores e aminoácidos mantiveram-se constantes durante todo o processo de embebição. No estudo de inibidores foram utilizadas diferentes concentrações de extratos de sementes e de polpa de frutos maduros de *Protium widgrenii* Engler para a verificação do efeito destes sob a germinação de sementes de alface. Os resultados demonstraram a interferência dos extratos na velocidade de germinação das sementes. Estes extratos passaram por uma triagem fitoquímica, no qual foi possível identificar diferentes classes de compostos, predominando as de natureza fenólica.

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Orientador), Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-Orientador), Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães – UFLA (Co-Orientador)

ABSTRACT

SEIFFERT, Marina. **Physiological and biochemical aspects of the germination seeds of *Protium widgrenii* Engler.** 2003. 28 p. Dissertation (Master Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Protium widgrenii Engler is a native species of the Cerrado in which gumeum there are some species that are used as hard wood supplies or by their medicinal and nutritive properties by population. This work aimed to study the imbibition curve, the seed biochemical composition during this process and the germination inhibitors compounds of the *Protium widgrenii* Engler seeds and ripe fruits. In the water soaking test the seeds weighed during three hours interval. These data relied to triphase model, the root protrusion can be observed after 72 hours of soaking. During this process occurred modifications in total soluble sugar and proteins contents. However, the reducing sugar contents and amino acids increased during the whole process of soaking. Different *Protium widgrenii* Engler seeds extracts and ripe fruits pulp concentrations were used for the verification of the extracts effect under the germination of lettuce seeds. It was shown the extracts interference in the seeds germination speed. The phytochemical screening of these extracts allowed identify different compounds classes prevailing phenolic ones.

*Comitee - Advisor: Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga - UFLA, Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA, Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Vários gêneros da família Burseraceae, como *Protium widgrenii* Engler, são produtores de resina oleosa, usadas como analgésico, cicatrizantes ou na indústria de verniz. Algumas substâncias presentes nesta resina foram identificadas, como triterpenos, sendo a classe das anidrinas, uma característica do gênero, mono e sesquiterpenóides e flavonóides (Maia et al., 2000; Zoghbi et al., 1993a; Zoghbi et al., 1993b).

Em várias espécies vegetais nota-se a presença destas substâncias em diferentes órgãos, nos quais devem desempenhar diferentes papéis, como o de inibidores de germinação e crescimento, podendo ter efeito autotóxico ou alelopático, dificultando o estabelecimento de plântulas (Nawamaki & Kuroyanagi, 1996; Baruah et al., 1994; Mata et al., 1998; Basile et al., 2000).

Muitos inibidores de origem vegetal são conhecidos como antibióticos, mutagênicos, inseticidas e drogas usadas na medicina, por causa de suas atividades fisiológicas. Estas substâncias causam inibição nos diferentes processos biológicos de plantas e animais (Dionello-Basta & Basta, 1984).

Considerando que a germinação é constituída de uma série de processos metabólicos, ocorrendo de forma programada, qualquer substância que interfira nesta sucessão de fatos irá inibi-la. A localização destas substâncias mostra-se variável de acordo com a espécie, podendo ocorrer no embrião e/ou endosperma, no tegumento ou no pericarpo do fruto. O local de ação dessas substâncias nem sempre é exatamente o local de onde são extraídas (Carvalho & Nakawaga, 1980).

Outro fator de primordial importância para a germinação é o processo de embebição de sementes, que permite a retomada das atividades metabólicas, essencial ao processo de mobilização das reservas das sementes, culminando

com protrusão da radícula, a qual cresce a partir dos produtos translocados e utilizados como fonte de energia e de metabólitos precursores para o crescimento inicial da plântula. A velocidade de embebição é característica própria de cada espécie, dependente, dentre outros fatores, da composição química e da permeabilidade do tegumento. A composição química das sementes é definida geneticamente, podendo ser influenciada até certo ponto pelas condições ambientais (Bewley & Black, 1983).

Dentro deste contexto, este trabalho teve como principais objetivos caracterizar a curva de embebição, bem como o comportamento de alguns componentes bioquímicos durante a embebição das sementes de *P. widgrenii* Engler, proceder a triagem de compostos com provável atividade inibitória na germinação de sementes de alface, presentes em extratos de sementes e de polpa de frutos maduros da espécie em estudo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos de *Protium widgrenii* Engler foram colhidos em plantas matrizes existentes em área de cerrado, localizada no município de Lavras, na região sul do estado de Minas Gerais, a 918 m de altitude, latitude 21°14 S e longitude 45° GRW. No momento da colheita, os frutos encontravam-se, na sua maioria, em fase de maturação com coloração marrom escuro. Na época de instalação dos experimentos, as sementes foram removidas manualmente dos frutos com a retirada do epicarpo e mesocarpo. Em seguida, foram submetidas a uma seleção, sendo utilizadas apenas as sementes que se encontravam em estágio de maturidade fisiológica, as quais possuíam endocarpo de coloração marrom-escuro.

2.1 Teor de umidade das sementes

Após o processamento dos frutos, foi determinada a umidade das sementes pelo método da estufa a 70°C por 72 horas, utilizando-se três amostras contendo 10 sementes cada, acondicionadas em sacos de papel. O valor percentual de umidade foi obtido com base na média das pesagens das amostras. Nessa determinação, utilizou-se uma balança analítica digital com precisão de miligramas, sendo o teor de umidade calculado pela expressão:

$$\text{Teor de umidade (\%)} = \frac{\text{massa fresca} - \text{massa seca}}{\text{massa fresca}} \times 100$$



2.2 Curva de embebição

O teste de embebição foi realizado no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento, Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

As sementes de *P. widgrenii* foram separadas em três repetições de 10 sementes para cada tempo de embebição. Antes de iniciar a embebição, as sementes foram pesadas em balança analítica digital com precisão de miligramas e, posteriormente, colocadas separadamente por tratamento, em béqueres com água destilada por 24 horas na geladeira (5°C) e novamente pesadas 24 horas após. Em seguida foram transferidas para rolo de papel toalha umedecido com água destilada e colocadas em câmara de germinação a 25°C no escuro. Foram realizadas pesagens a cada 3 horas até a protrusão da radícula. Os resultados obtidos pela diferença entre o peso médio embebido a cada tempo e o peso médio inicial (após 24 horas de embebição em geladeira) foram expressos em porcentagem de ganho de peso.

Após cada tempo de pesagem, as sementes foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da realização das análises de quantificação bioquímica.

2.3 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA.

Para essas análises, utilizou-se apenas as sementes dos tempos 0; 12; 24; 36; 48; 60 e 72 horas de embebição. Após o descongelamento, as sementes foram secas em estufa de circulação forçada a 40°C até atingirem massa constante e posteriormente moídas.

2.3.1 Obtenção do extrato bruto

Amostras de 0,1g de matéria seca das sementes de cada repetição dos diversos tempo de embebição foram homogeneizadas em 5 ml de etanol 80%, em seguida submetidas a centrifugação a 10.000 g durante 20 minutos a 5°C, sendo esse procedimento repetido por 4 vezes. Os sobrenadantes de cada lavagem foram reunidos, constituído-se cada amostra e, em seguida, armazenados a -4°C. Alíquotas dos extratos obtidos em etanol 80% foram utilizadas para as quantificações dos açúcares solúveis totais, açúcares redutores, proteínas e aminoácidos.

2.3.2 Quantificações bioquímicas

A partir dos extratos obtidos foram realizadas as quantificações por meio de técnicas colorimétricas, como seguem:

- açúcares solúveis totais: método da Antrona, segundo metodologia proposta por Yemm & Willis (1954);
- açúcares redutores: método do ácido-dinitrossalicílico, segundo metodologia proposta por Miller (1959);
- proteínas: método de Comassie Blue, segundo metodologia proposta por Bradford (1976);
- aminoácidos: método da Ninhidrina, segundo metodologia proposta por Yemm & Cocking (1955).

Para cada quantificação, foi utilizada uma alíquota específica com três repetições para cada amostra, perfazendo-se um total de 63 leituras. Procedidas as análises de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

2.4 Efeito dos extratos de frutos e sementes de *Protium widgrenii* sobre a germinação de sementes de *Lactuca sativa* L

Este estudo foi realizado no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA.

Foram desenvolvidos testes com extratos de sementes e polpa de frutos maduros de *P. widgrenii*, a partir de amostras de 10 gramas de polpa de frutos maduros e 10 gramas de semente, triturados em 100 mL de etanol. Os extratos da polpa foram obtidos triturando-se as amostras em Polytrom e as amostras de sementes trituradas em liqüidificador, utilizando-se o etanol como solvente, seguido de filtragem em papel de filtro. Esses extratos etanólicos foram submetidos à evaporação em evaporador rotativo a 50°C por 10 minutos, sendo o concentrado ressuspenso para um volume de 100 mL de água destilada. Em seguida, os extratos etanólicos foram diluídos em água destilada nas seguintes concentrações: 0,5%, 1,0%, 3,0%, 5,0%, 7,0% e 10%.

Os biotestes foram realizados em placas de petri com papel toalha umedecida com os respectivos extratos em diferentes concentrações, contendo 50 sementes de alface da variedade Grand Rapids por placa. A germinação foi conduzida em câmaras a 25°C sob luz constante. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), em sistema fatorial de 7 x 2, com três repetições, sendo sete concentrações e dois extratos vegetais. A percentagem de germinação foi avaliada em 24, 48 e 72 horas, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

2.5 Triagem fitoquímica

Nos extratos de polpa de frutos e sementes foram realizadas triagens fitoquímicas para testar a presença de possíveis classes de metabólitos que possivelmente poderiam estar relacionados com a inibição da germinação.

Esse estudo foi conduzido no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da UFLA.

Para os procedimentos de prospecção fitoquímica utilizou-se o método descrito por Matos (1988) com modificações. Amostra de 50 gramas de polpa fresca do fruto e outra de 20 gramas de sementes foram extraídas em etanol sob refluxo por 24 horas. Em seguida, cada amostra foi filtrada em funil de Buchner, sendo o filtrado concentrado em evaporador rotativo do tipo R-114 sob pressão reduzida. O extrato foi levado à estufa para completar evaporação do solvente. Posteriormente, realizaram-se 17 testes analíticos específicos para cada classe química de compostos, sendo as frações dos extratos obtidos anteriormente submetidas às reações de precipitação e/ou colorimétrica, utilizando-se os reagentes descritos na Tabela 1.

TABELA 1: Reagentes utilizados na identificação das classes de compostos presentes na polpa e sementes de *P. widigrenii*.

Reagentes utilizados	Especificidade
Reagente de Pascová	Ácidos orgânicos
Reativo de Fehling	Açúcares redutores
Reativo Lugol	Polissacarídeos
Reativo de Molish	Proteínas/aminoácidos
Solução ácida de FeCl ₃ 1%	Taninos
Vanilina 1%/ HCl	Catequinas
Solução acidificada/magnésio	Flavonóides
HONH ₃ ⁺ Cl ⁻ 10% / KOH 10%/ Fe Cl ₃ 1%	Lactonas/sesquiterpenolactonas
Reativo de Kaiser	Azulenos
Ácido trifluoroacético	Carotenóides
Reação de Lieberman – Burchard	Esteróides/triterpenóides
Éter/ metanol/ FeCl ₃ 1%	Depsídeos/depsidonas
Solução etanol 80%	Saponinas
Éter/ NaOH 1N/ luz U.V	Cumarinas
Reativo de Bouchardat	Alcalóides
HCl 6N/ H ₂ O ₂ 30%	Purinas
Reação de Bornträger	Antraquinonas

Fonte: Matos, 1988

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curva de embebição

As sementes de *Protium widgrenii* utilizadas para curva de embebição apresentaram-se em média com 51% de umidade inicial. Observa-se que estas sementes necessitaram de 72 horas para que o processo de germinação fosse completado e ocorresse a protrusão da radícula (Figura 1).

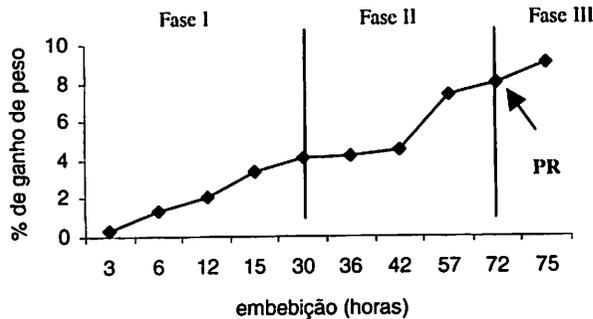


FIGURA 1: Ganho de peso com a embebição de sementes de *Protium widgrenii*, à temperatura de 25°C constante, evidenciando a protrusão da radícula (PR) em 72 horas UFLA, Lavras, MG,2003.

Verifica-se, ainda na Figura 1, que a fase I de embebição, caracterizada por ser um processo físico, permaneceu por um período relativamente longo e crescente por 30 horas, quando comparado com sementes de outras espécies, tais como encontrado em diásporos intactos de *Cryptocaria aschersoniana* (Lauraceae) que apresentaram um rápido ganho inicial de água (Almeida, 2001). Esse fato deve-se, possivelmente, à constituição do endocarpo das sementes de *P. widgrenii*, que é rígido e pouco permeável, sendo, portanto, necessário maior

tempo para que ocorra uma reidratação adequada para o início da hidrólise das substâncias de reserva, que viabilizarão energia e nutrientes necessários à retomada do crescimento do eixo embrionário.

Em adição a outros fatores ligados às sementes, destaca-se a composição química da semente, permeabilidade do tegumento à água e a presença da água na forma líquida ou gasosa, no meio onde o processo está ocorrendo (Carvalho & Nakagawa, 1980; Bewley & Black, 1983).

Considerando ainda a fase I, observar-se na Figura 1, que mesmo as sementes apresentando um teor de umidade inicial elevado (51%), estas obtiveram um ganho bastante significativo de umidade (4%) nas primeiras 30 horas, sendo o restante (5%) distribuído ao longo das outras fases de embebição. Este rápido ganho de peso verificado na fase I em relação às fases II e III, deve-se, provavelmente, à presença de matrizes hidrofílicas, como proteínas. Resultados semelhantes foram encontrados em sementes de *Bixa orellana* (Bixaceae), porém, considerando outros estádios de desenvolvimento das sementes (E4 e E5), em que ocorreram maiores entradas de água em relação aos estádios anteriores de desenvolvimento. Deve-se considerar que nesses estádios citados, essas sementes encontravam-se ainda com níveis de hidratação em torno de 60% e 50%, respectivamente (Amaral et al., 2000).

Em sementes de *Simarouba amara* (Simaroubaceae), foi relatado por Goldman et al. (1987) que a embebição nas primeiras 24 horas foi de aproximadamente 50% de ganho de peso, enquanto que nas 144 horas subsequentes este aumento foi de 79,3%.

Na fase II (fase Lag), notou-se uma estabilização na absorção de água, sendo essa caracterizada como uma fase rápida no período de 30 a 42 horas (Figura 1). Possivelmente, nessa fase, as sementes encontravam-se totalmente hidratadas, havendo mobilização das substâncias, desdobradas na fase I da região de reserva para os tecidos meristemáticos. Essa fase está relacionada com

o turgor e afrouxamento da parede celular do embrião, e com a protrusão radicular (72 horas) que, para a espécie estudada, ocorreu após a retomada da absorção de água.

Está retomada da embebição deve-se, possivelmente, ao aumento de turgor pelo acúmulo de solutos translocados para região embrionária e, como consequência desta absorção de água, há o enfraquecimento das barreiras físicas imposta pelo tegumento, permitindo o crescimento visível do eixo embrionário (Desai et al., 1997; Welbaum et al., 1998). A protrusão da radícula caracteriza o final da fase II e início da fase III que, para a espécie em estudo, foi observada a partir de 72 horas de embebição.

3.2 Análises bioquímicas

3.2.1 Açúcares redutores

Não houve diferenças nos teores de açúcares redutores ao longo do período de embebição (Figura 2). Os teores destes açúcares permaneceram constantes até a protrusão da radícula. Possivelmente, a presença desses açúcares em quantidade constante durante a germinação, deve-se ao fato deste tipo de açúcar ser substrato prontamente disponível para o processo respiratório, sendo, portanto, produzido durante todo o processo da germinação, a partir de carboidratos de maior peso molecular. A manutenção dos teores desses açúcares pode ainda estar relacionada com a proteção de membranas quando submetidas a baixos conteúdos de água, como já relatado para muitas espécies que toleram a dessecação (Oliver et al., 1998).

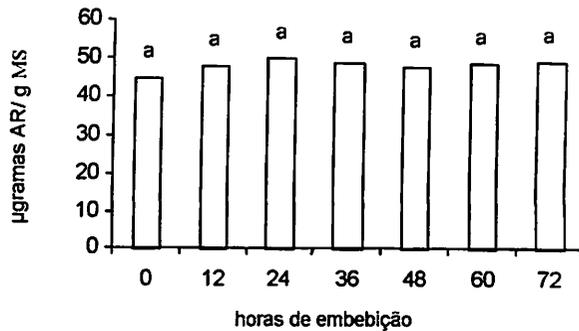


FIGURA 2: Teores de açúcares redutores em sementes de *Protium widgrenii*, submetidas a diferentes tempos de embebição, à temperatura de 25°C. UFLA, Lavras, MG, 2003.

3.2.2 Açúcares solúveis totais

Pela Figura 3, verifica-se que houve diferença no conteúdo desses açúcares entre os tempos 0 e 60 horas de embebição. Inicialmente, os teores de açúcares solúveis totais apresentaram-se mais elevados em relação ao período final de embebição. Os açúcares solúveis totais presentes em sementes não embebidas, possivelmente estão relacionados com a manutenção da viabilidade (Koster et al., 1991). Esses açúcares foram utilizados nas primeiras horas de embebição, porém, formados também em todas as fases, contudo, diminuíram acentuadamente com a protrusão da radícula. Em sementes de *Macrotyloma uniflorum* (Fabaceae) foram encontrados resultados semelhantes, em que os teores de açúcares solúveis totais diminuíram com os dias de germinação (Karunagaran & Rao, 1991).

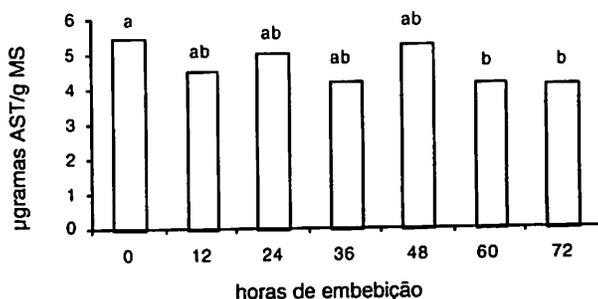


FIGURA 3: Teores de açúcares solúveis totais em sementes de *Protium widgrenii*, submetidas a diferentes tempos de embebição à temperatura de 25°C. UFLA, Lavras, MG, 2003.

3.2.3 Proteínas totais

Nas primeiras horas de embebição, os teores protéicos não se diferenciaram. A partir de 30 horas de embebição (fase II), ocorreu aumento dos teores de proteínas que permaneceram constantes, havendo diferença apenas entre os tempos iniciais e finais de embebição (Figura 4).

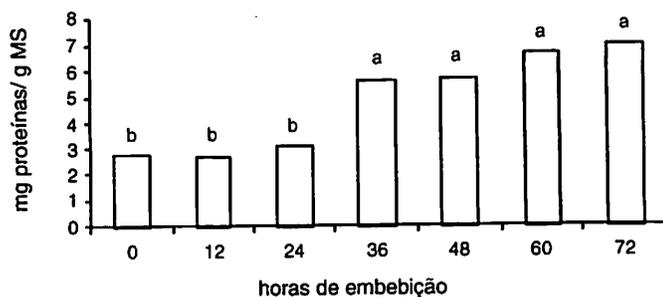


FIGURA 4: Teores de proteínas totais em sementes de *Protium widgrenii*, submetidas a diferentes tempos de embebição à temperatura de 25°C. UFLA, Lavras, MG, 2003.

O aumento da fração protéica após a fase I de embebição possivelmente seja devido à hidratação das sementes que estimula a biossíntese de proteínas. As proteínas funcionais (enzimas) produzidas (síntese de novo) desempenham papéis decisivos na hidrólise de reservas, cujos produtos são mobilizados para os locais de crescimento (Bewley & Black, 1994). Sabe-se, no entanto, que as sementes caracterizam-se por apresentarem uma parte de proteínas metabolicamente ativas (enzimas), de reserva e as estruturais. Resultados semelhantes foram relatados por Reuzeau & Cavalé (1997), em que sementes de *Helianthus annuus* L. tiveram aumento de polipeptídeos nas primeiras 4 horas de embebição.

3.2.4 Aminoácidos

Os teores de aminoácidos permaneceram constantes durante todo o período de embebição (Figura 5). Provavelmente, a reserva de aminoácidos seja suficiente para atividade metabólica nas primeiras horas de embebição das sementes, e para a biossíntese protéica durante o processo de germinação.



FIGURA 5: Teores de aminoácidos em sementes de *Protium widgrenii*, submetidas a diferentes tempos de embebição à temperatura de 25°C. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Ao contrário do que ocorre em outras espécies, como, por exemplo, em *Euphorbia heterophylla*, observou-se um aumento de aminoácidos concomitantemente com a degradação de proteínas após o início da embebição (Suda & Giorgini, 2000).

3.3 Efeito de extratos de frutos e de sementes de *Protium widgrenii* Engler sobre a germinação de sementes de *Lactuca sativa* L.

Analisando-se o efeito dos extratos de sementes de *P. widgrenii* na germinação de sementes de alface, foram observadas alterações na percentagem de germinação quando estas foram submetidas a concentrações mais elevadas de extratos, havendo diferença para as concentrações de 5%, 7% e 10% nas primeiras 24 horas após a aplicação dos tratamentos. Pode-se perceber que sementes de alface tratadas com extrato a 7% e 10% apresentaram menores percentagens de germinação, 32% e 23%, respectivamente (Figura 6A), sendo a germinação retomada após 48 horas, atingindo valores na ordem de 91% e 83%, respectivamente (Figura 6B). O efeito inibitório, bem como as diferenças entre as concentrações, não permaneceram no período compreendido entre 48 e 72 horas (Figura 6C).

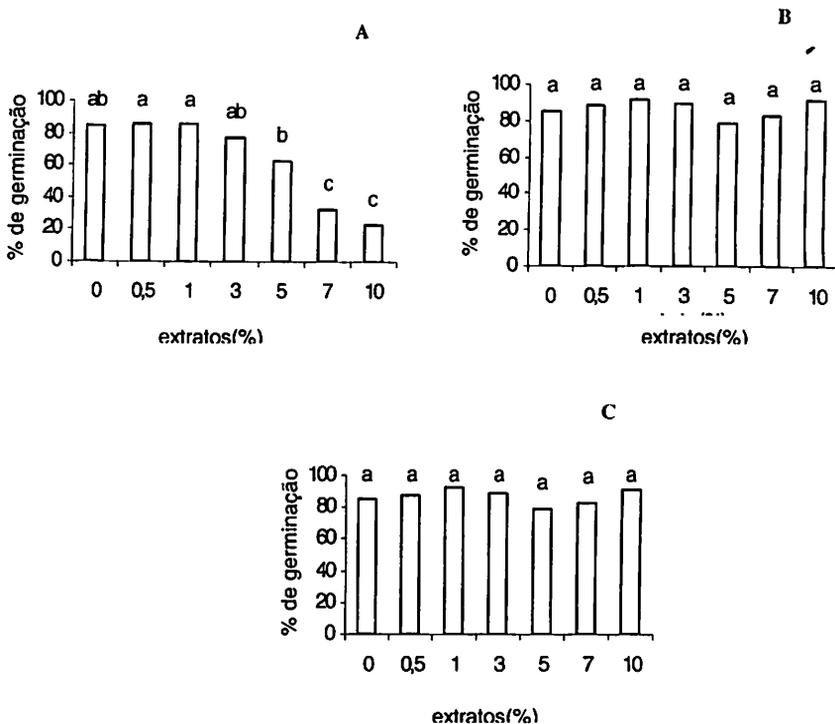


FIGURA 6: Efeito de extratos de sementes de *Protium widgrenii*, na germinação de sementes de alface: A) 24 horas após aplicação, B) 48 horas após aplicação e C) 72 horas após aplicação. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Possivelmente, as sementes de *P. widgrenii* contêm compostos inibitórios que podem afetar a velocidade de germinação em função da sensibilidade da espécie ao inibidor, assim como pela interferência do potencial osmótico do substrato durante o processo de absorção de água. Resultados semelhantes foram encontrados em *Acorus calamus* (Araceae), em que extratos de várias partes das plantas inibiram a germinação das sementes de alface (Nawamaki & Kuroyanagi, 1996). Foi relatado em sementes do gênero *Lespedeza* [*L. bicolor*, *L. cuneata* e *L. stipulacea* (Fabaceae)], a presença de compostos inibitórios que afetaram germinação e o crescimento da radícula destas espécies (Buta & Lusby, 1986).

Os efeitos dos extratos de polpa do fruto maduro de *P. widgrenii* na germinação de sementes de alface mostraram, após 24 horas de exposição, um efeito inibitório dos tratamentos a partir de 3%, proporcionando uma germinação de 34% nesta concentração. Nos extratos com concentrações entre 5% e 10%, a germinação foi reduzida de maneira abrupta, alcançando valores na ordem de 0% (Figura 7A).

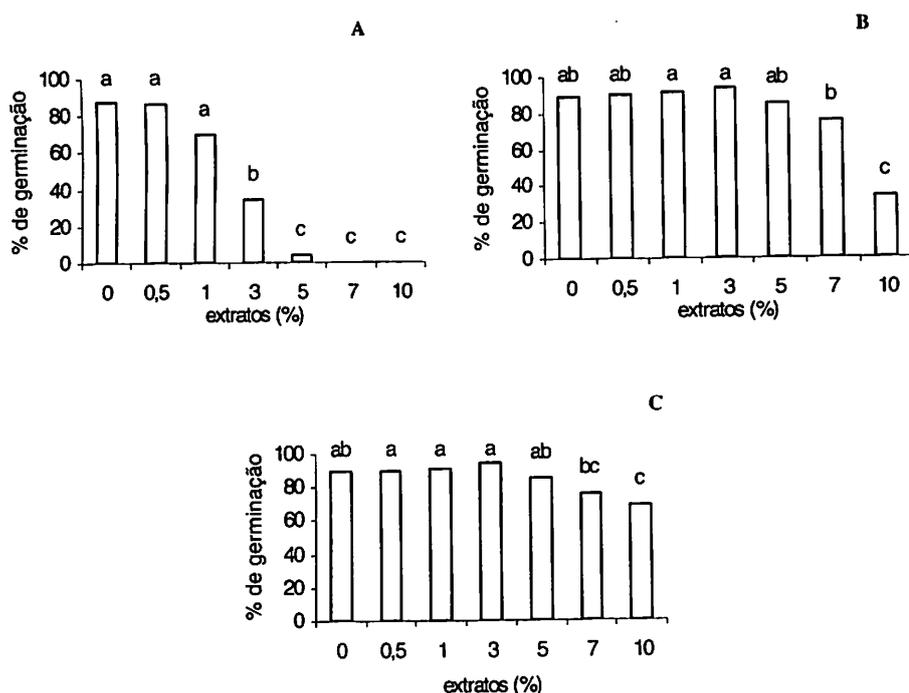


FIGURA 7: Efeito de extratos de frutos maduros de *Protium widgrenii*, na germinação de sementes de alface: A) 24 horas após aplicação, B) 48 horas após aplicação e C) 72 horas após aplicação. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Após 48 e 72 horas de exposição das sementes aos extratos, apenas as concentrações de 7% e 10% mostraram-se inibitórias, havendo diferença entre estas concentrações em 48 horas (Figura 7B/C). Laura et al. (1994), relataram

que extratos concentrados de frutos de *Muntingia calabura* (Elaeocarpaceae) inibiram a germinação de sementes de alface devido à presença de teores significativos de açúcares nos frutos, que reduzem o potencial osmótico da solução e a disponibilidade de água para o processo de germinação.

Comparando-se o efeito inibitório de extratos de sementes e de frutos maduros de *P. widgrenii*, verificou-se que os extratos provenientes da polpa desses frutos inibem em maior intensidade que os oriundos de sementes. A diferença entre estes tratamentos ocorreram a partir de 1% de concentração nas primeiras 24 horas de germinação. Em ambos os extratos, ocorreram reduções na velocidade de germinação à medida que houve aumento nas concentrações (Figura 8A).

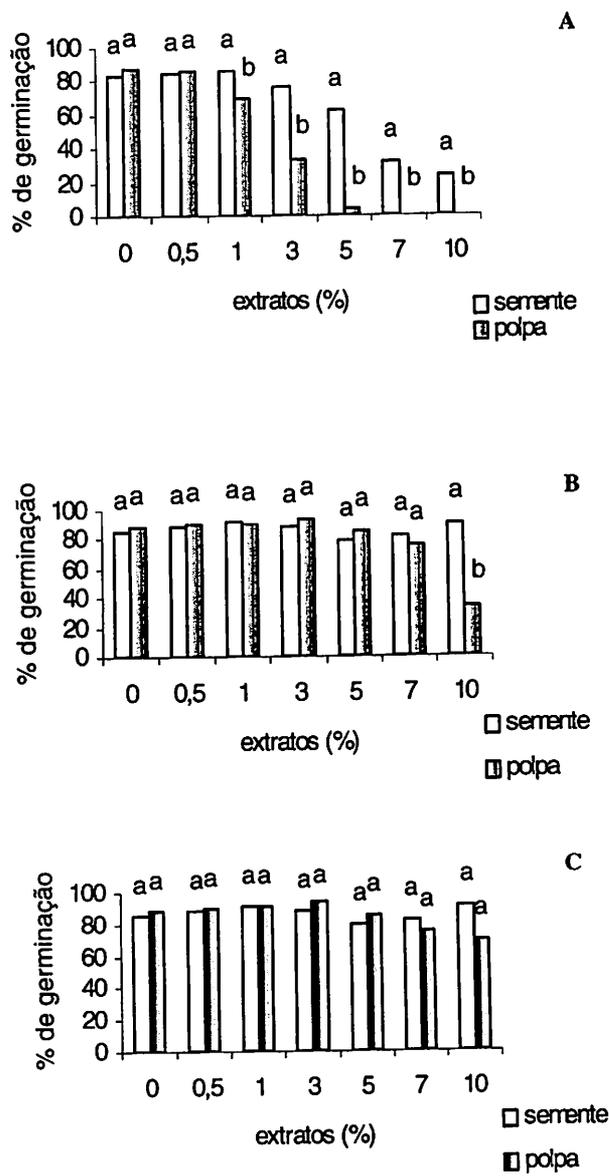


FIGURA 8: Efeito de extratos de frutos maduros e sementes de *Protium widgrenii*, na germinação de sementes de alfafa: A) 24 horas após aplicação, B) 48 horas após aplicação, C) 72 horas após aplicação. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Observa-se que, após 48 horas de aplicação dos tratamentos, a diferença entre os extratos somente permaneceu na concentração de 10%, não sendo observada entre os extratos diferença no tempo de 72 horas. Em todos os tratamentos as percentagens de germinação se igualaram ao do controle (Figura 8B/C).

Em algumas plantas, compostos inibitórios com potencial autotóxico são comuns em sementes ou no interior de várias partes da planta como frutos. Estes compostos possuem papel quimioecológicos e somente com a remoção destes da semente ocorre o disparo do processo germinativo (Desai et al., 1997; Valio, 1973).

3.4 Estudo fitoquímico

Algumas reações colorimétricas apresentaram-se mascaradas, como a reação de purinas, em que o resultado esperado era a de coloração violeta. No entanto, esta coloração apresentou-se pouco intensa. Os testes analíticos mostram-se imprecisos, possivelmente pelo fato de que o extrato utilizado, sendo bruto conteria diferentes constituintes químicos, os quais provavelmente podem ter interferido no resultado final da reação.

Desse modo, supõe-se que existam, para sementes de *P. widgrenii*, oito classes químicas de metabólitos secundários reconhecidos pelos testes analíticos realizados, que são: açúcares redutores, proteínas e aminoácidos, esteróis e triterpenóides, taninos, catequinas, flavonoídes, depsídeos e depsidonas e purinas e, para polpa de frutos maduros, foram encontrados açúcares redutores, proteínas, esteróis e triterpenóides (Tabela 2).

TABELA 2: Análise de diferentes grupos de compostos da polpa de frutos maduros e de sementes de *P. widgrenii*. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Especificidade	Semente	Polpa
Ácidos orgânicos		
Açúcares redutores	X	X
Polissacarídeos		
Proteínas/aminoácidos	X	X
Taninos	X	
Catequinas	X	
Flavonóides	X	
Lactonas/sesquiterpenolactonas		
Azulenos		
Carotenóides		
Esteróides/triterpenóides	X	X
Depsídeos/ depsidonas	X	
Saponinas		
Cumarinas		
Alcalóides		
Purinas	X	
Antraquinonas		

Muitos destes metabólitos foram relatados em outras espécies, estando localizados em diferentes partes das plantas, como inibidores de germinação e crescimento.

Os triterpenóides possuem diversas funções nos vegetais, tais como fitoalexinas, hormônio de sinalização e como agentes de ativação, estando presentes em sementes e frutos de *P. widgrenii*. Em *Protium heptaphyllum* foram identificados oito triterpenos presentes na resina exsudada do tronco da espécie, sendo esta utilizada na medicina popular, confirmando a presença deste

composto no gênero (Maia et al., 2000). Mata et al. (1998) isolaram classes de triterpenóides da parte aérea de *Esenbeckia yaxhoob* que promoveram a inibição e o crescimento radicular em *Amaranthus hypochondriacus* e *Lactuca sativa*.

A presença de catequinas e epicatequinas tem sido relatada como inibitórias em sementes de três espécies do gênero *Lespedeza* (Fabaceae), (Buta & Lusby, 1986). Neste trabalho foram verificadas relações inversas entre a germinação e crescimento com a quantidade de catequinas.

A presença de compostos fenólicos, como flavonóides isolados de *Tithonia diversifolia*, teve maior efeito alelopático que duas classes de sesquiterpenos lactonas, afetando a germinação e crescimento radicular em sementes de *Cucumis sativus*, *Allium cepa* e *Raphanus sativus* (Baruah et al., 1994). Para essa última espécie, quando submetidas a extratos de folhas de *Castanea sativa* que continham diferentes grupos de flavonóides, foram observadas inibições tanto na sua germinação e como no crescimento (Basile et al., 2000). Essa atividade biológica inibitória, muitas vezes, é o resultado da presença de várias e não de uma única substância .

Segundo Kigel & Galili (1995), os taninos são as principais substâncias químicas presentes nos vegetais, associadas à defesa contra predadores e ligadas à coloração das sementes, protegendo-as contra luz. Podem restringir a germinação, por ser um composto fenólico, sujeita a oxidação, interferindo no fluxo de gás (O₂) requerido pelo embrião.

4 CONCLUSÕES

- O padrão da curva de embebição apresentado pelas sementes de *P. widgrenii* foi trifásico, apresentando uma fase I considerada lenta com duração de 30 horas e fase II rápida, atingindo protusão da radícula em 72 horas, iniciando a fase III.

- As quantidades de açúcares redutores e aminoácidos permaneceram constantes em todos os tempos de embebição, enquanto as proteínas apresentaram um aumento em seus teores, após a fase I. Os teores de açúcares solúveis totais sofreram flutuações durante o processo de embebição.

- Extratos de frutos maduros e de sementes de *Protium widgrenii* são constituídos de alguns compostos predominantemente fenólicos que possivelmente interferiram na velocidade de germinação de sementes de *Lactuca sativa* L.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. P. **Germinação, crescimento inicial e anatomia de plantas jovens de *Cryptocaria aschersoniana* MEZ. sob diferentes níveis de radiação.** 2001. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

AMARAL, L. I. V. A. do.; PEREIRA, M. F. D. A. de.; CORTELAZZO, A. L. **Germinação de sementes em desenvolvimento de *Bixa orellana*.** *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 12, n. 3, p. 273-285, dez. 2000.

BARUAH, N. C.; SARMA, J. C.; BARUA, N. C.; SARMA, S.; SHARMA, R. P. **germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and flavone from *Tithonia diversifolia*.** *Phytochemistry*, Oxford, v. 36, n. 1, p. 29-36, Jan. 1994.

BASILE, A.; SORBO, S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; FERRERA, S.; MONTESANA, D.; COBIANCHI, R. M.; VUOTTO, M. L.; FERRARA, L. **Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativas* leaves.** *Fitoterapia*, v. 71, p. 110-116, Aug. 2000. Supplement.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology biochemistry of seeds.** New York, 1983. v. 1, 305 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BUTA, G.; LUSBY, W. R. **Cathechins germination and growth inhibitors in *Lespedeza* seeds.** *Phytochemistry*, Oxford, v 25, n. 1, p. 93-95, Jan. 1986.

CARVALHO, N. M. de.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** Campinas: Fundação Cargil, 1980. 429 p.

DESAI, B. B.; KOTECHA, P. M.; SALUNKHE, D. K. **Seeds handbook: biology, production, processing and storage.** New York, 1997. v. 1, 627 p.

DIONELLO-BASTA, S. B.; BASTA, F. Inibidores de germinação e crescimento em plantas usadas na medicina popular. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 36, n. 9, p. 1603-1606, set. 1984

GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S. de.; AGUIAR, J. P. L. Estudos sobre a germinação e curva de embebição das sementes; germinação em diferentes temperaturas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 16/17, 383-392, 1987.

KARUNAGARAN, D.; RAO, R. Mode and control of starch mobilization during germination of seeds of horse gram. **Plant Science**, Limerick, v. 73, n. 2, p. 155-159, 1991.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York, 1995. 853 p.

KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 1, p. 302-304, Mar. 1991.

LAURA, V. A.; ALVARENGA, A. A. de.; ARRIGONI, M. F. de. Effects of growth regulators, temperature, light, storage and other factors on the *Muntingia calabura* L. seed germination. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 2, p. 573-579, 1994.

MAIA, R. M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Bourseraceae): Caracterização em misturas binárias. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 623-626, set./out. 2000.

MATA, R.; MACÍAS, M. L.; ROJAS, I. S.; LOTINA- HENNSEN, B.; TOSCANO, R. A.; ANAYA, A. L. Phytotoxi compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 441-449, Jan. 1998.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1988. 128 p.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NAWAMAKI, K.; KUROYANAGI, M. Sesquiterpenoids from *Acorus calamus* as germination inhibitors. **Phytochemistry**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 1175-1182, Dec. 1996.



OLIVER, A. E.; CROWE, L. M.; CROWE, J. H. Methods for dehydration-tolerance: Depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 211-221, June 1998.

REUZEAU, C.; CAVALIÉ, G. Changes in RNA and protein metabolism associated with alterations in the germination efficiency of sunflower seeds. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 2, p. 131-137, Aug. 1997.

SUDA, C. N. K.; GIORGINI, J. F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, n. 3, p. 226-245, dez. 2000

VALIO, I. F.M. Effect of endogenous coumarin on the germination of seeds of *Coumarouna odorata* Aublet. **Journal. Exp. Botany**, v. 24, n. 79, p.442-449, 1973.

WELBAUM, G. E.; BRADFORD, K. J.; YIM, K.; BOOTH, D. T.; OLUOCH, M. O. Biophysical, physiological and biochemical processes regulating seed germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 161-172, June 1998.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhidrin. **Analyst**, London, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 90, n. 3, p. 508-514, Mar. 1954.

ZOGHBI, M. G. B. da; CUNHA, E. V. L. da.; FILHO WOLTER, W. Essential oil of *Protium unifoliolatum*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 23, n. 1, p. 15-16, mar. 1993a

ZOGHBI, M. G. B. da; SIQUEIRA, J. B. G.; WOLTER, E. L. A.; JÚNIOR, O. L. P. Constituintes químicos de *Protium paniculatum*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 23, n. 2-3, p. 187-189, abr./set. 1993b.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA SECAGEM E DE DIFERENTES TEMPERATURAS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Protium widgrenii* Engler.

RESUMO

SEIFFERT, Marina. **Influência da secagem, e de diferentes temperaturas na germinação de sementes de *Protium widgrenii* Engler.** 2003. 19 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A espécie *Protium widgrenii* Engler ocorre em várias regiões do Brasil, sendo muitas vezes encontrada em florestas pluviais do Cerrado e recomendada para o reflorestamento de áreas degradadas e de preservação mista. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes temperaturas e da secagem na germinação de sementes de *Protium widgrenii* Engler. Testaram-se quatro diferentes temperaturas na germinação de sementes submetidas à secagem (13% umidade) e não secas (51% de umidade) sendo temperaturas constantes de 15°C, 25°C, 35°C e alternada 30°/20° C. Para as variáveis percentagem de germinação e IVG os melhores resultados foram observados quando utilizou-se a temperatura de 25°C para sementes que não foram submetidas à secagem. Nas sementes submetidas à secagem, temperaturas baixas como de 15°C, proporcionaram quedas acentuadas no percentual de germinação e IVG. Quando compararam-se sementes submetidas à secagem e não submetidas à secagem, não houve diferença significativa entre estas nas diferentes temperaturas, exceto a 15°C.

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Orientador), Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-Orientador), Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães – UFLA (Co-Orientador)

ABSTRACT

SEIFFERT, Marina. **Influence of the drying and of different temperatures in the germination of seeds of *Protium widgrenii* Engler** 2003. 19 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The *Protium widgrenii* Engler species occurs in several regions of Brazil, and it is found on Cerrado, pluvial forest. This specie is recommended for reforestation in degraded areas and mixed preservation areas. The objective of this work was to evaluate the effect of different temperatures during germination of *Protium widgrenii* Engler. It was tested four different in the seeds germination submitted to drying (13% humidity) and not drying (51% of humidity) with constant temperatures 15°C, 25°C, 35°C and alternate ones 30°C/20°C. For germination percentage and IVG, the best results were observed when the temperature of 25°C was used to seeds that were not submitted to drying. The seeds submitted to drying at low temperatures like the 15°C caused in the germination percentage and IVG accentuated drops. When seeds submitted to drying and not drying were compared there was no significant difference between them at different temperatures except to 15°C.

* Comitee - Advisor: Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga - UFLA, Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA, Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Protium widgrenii Engler é uma espécie florestal encontrada em margens de rios e matas do Cerrado do estado de Minas Gerais. É uma espécie recomendada para o reflorestamento de áreas degradadas e de preservação permanente em composições mistas (Oliveira Filho et al., 1994).

Em outras espécies da família Burseraceae, como *P. heptaphyllum* March e *P. spruceanum* Engl., sabe-se que as taxas de germinação são baixas e a emergência ocorre entre 3 e 5 semanas (Lorenzi, 1992).

Segundo Klein (1978), a espécie *P. widgrenii* Engler é uma das mais freqüentes em matas semidecíduas, ocorrendo desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul.

De maneira geral, a propagação de espécies florestais ocorre principalmente por meio de sementes. Nos últimos anos, têm se intensificado os estudos para desenvolver metodologias eficientes no campo da produção de mudas, visando oferecer suporte necessário para a implementação de projetos de recuperação de áreas degradadas, principalmente em margens de reservatórios hidrelétricos, reabilitação de ecossistemas florestais e para conservação de germoplasmas.

No entanto, observa-se uma carência de informações fundamentais para obtenção de mudas, como a capacidade germinativa, disponibilidade de sementes viáveis e seu comportamento fisiológico durante o armazenamento, que influencia diretamente no poder germinativo.

A umidade das sementes é um dos fatores que mais influencia o poder germinativo de sementes armazenadas. Dessa forma, a secagem apresenta-se como uma exigência para garantir a qualidade da semente durante o armazenamento. Entretanto, esta deve ser precisa e conduzida de forma

cuidadosa, em função dos níveis de umidade que a espécie em questão tolera (Carvalho & Nakagawa, 1980).

Diversos fatores se apresentam como limitantes e decisivos no processo germinativo, dentre eles a temperatura. O papel primordial da temperatura se faz presente nas reações bioquímicas que regulam o metabolismo inicial do processo germinativo, conseqüentemente, na porcentagem final e na velocidade de germinação. A temperatura ótima para a maioria das espécies adaptadas ao clima tropical se encontra na faixa entre 15°C a 30°C (Carvalho & Nakagawa, 1980). No entanto, existem espécies que necessitam de alternância de temperatura destinada a simular as flutuações de temperatura ocorridas na natureza (Ferrari & Lopez, 2000).

A temperatura ótima para germinação varia de acordo com a espécie, sendo definida geneticamente e em função das condições fisiológicas da semente, tornando válida a comparação da germinação em temperaturas constantes e alternadas (Kebreab & Murdoch, 1999).

A dormência pode ser considerada um fator de extrema importância para germinação das sementes. Essa dormência, no entanto, pode ter natureza diversa, como imaturidade do embrião, presença de inibidores ou tegumento impermeável à água e gases ou, ainda, a combinação destas. Dessa forma, pré-tratamentos germinativos são, na maioria das vezes, eficientes e necessários para a superação da dormência em muitas espécies, sobretudo as florestais (Almeida, 2001; Bewley & Black, 1994).

Em muitas espécies, a dormência é imposta pela imaturidade e/ou dormência do embrião e esta tem sido freqüentemente associada à presença de substâncias inibidoras de germinação em várias regiões da semente. Diversos tratamentos podem ser sugeridos visando à remoção desses tipos de dormência que impedem, de alguma maneira, a germinação das sementes. Dentre os pré-tratamentos, destaca-se a estratificação, que tem demonstrado ação positiva em

aumentar a porcentagem final de germinação das sementes, como a de *Campis radican*, (Chachalis & Reddy, 2000) e *Lupinus sulphureus*, (Kaye & Kukendall, 2001), permitindo a lixiviação das substâncias inibidoras e a embebição das sementes.

Diante do exposto, aliado ainda à insignificante germinabilidade apresentada pela espécie em ambiente natural, procurou-se neste trabalho, estudar a influência da secagem e de diferentes temperaturas na germinação das sementes de *P. widgrenni*, visando à sua preservação e à produção de mudas dessa espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Considerações gerais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Os frutos de *Protium widgrenii* Engler foram colhidos de plantas existentes em área de Cerrado, localizada no município de Lavras, região sul do estado de Minas Gerais, em dezembro de 2001. No momento da colheita, os frutos encontravam-se no início da deiscência. No laboratório, os frutos foram tratados com Captam (2g/kg de frutos) e armazenados em câmara fria a 10°C e 40% de umidade relativa durante três meses, período de condução dos experimentos.

No início dos experimentos, as sementes foram removidas manualmente dos frutos com a retirada do epicarpo e mesocarpo. Em seguida, as sementes foram submetidas a uma seleção, em que apenas aquelas com o endocarpo de coloração marrom-escuro foram utilizadas para os testes de germinação.

2.2 Avaliações realizadas

2.2.1 Teor de umidade das sementes

A umidade foi determinada pelo método da estufa a 70°C por 72 horas, utilizando-se três amostras de 10 sementes, as quais foram acondicionadas em sacos de papel. Foram consideradas, para fins de cálculo, as médias das pesagens das amostras. Nessa determinação, utilizou-se uma balança analítica

digital com precisão de miligramas e o teor de umidade calculado segundo a expressão:

$$\text{Teor de umidade (\%)} = \frac{\text{massa fresca} - \text{massa seca}}{\text{massa fresca}} \times 100$$

2.2.2 Teste de viabilidade

Com o intuito de conhecer a viabilidade das sementes, foi realizado o teste de tetrazólio, utilizando-se também três amostras de 10 sementes. As sementes foram embebidas por 24 horas em água destilada a 5°C, antes de serem submetidas aos cortes longitudinais. Após o seccionamento, as sementes foram colocadas no escuro e em béqueres de 25 ml contendo 10 mL de solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio a 0,5% por 3 horas a 30°C, devidamente envoltos com papel alumínio. Após a coloração, a solução foi drenada e as sementes lavadas em água corrente para posterior avaliação. Foram consideradas viáveis as sementes com coloração rosa-claro.

2.3 Efeito da secagem e da temperatura na germinação de sementes de *Protium widgrenii* Engler.

O efeito da secagem e de diferentes temperaturas: 15°C, 25°C, 35°C (constantes/escuro) e 30°/20°C (alternada/fotoperíodo de 12 horas) na germinação de sementes de *P. widgrenii* foi avaliado pela percentagem de germinação e pelo índice de velocidade de germinação (IVG), durante 30 dias. Inicialmente, as sementes foram submetidas à secagem até atingirem 13% de umidade sob condições ambientais de laboratório. A umidade e temperatura do ambiente foram registradas com auxílio de um termoigrógrafo, cujos valores

registraram, em média, 60% de umidade relativa (UR) e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura. Nesse estudo, foram utilizadas cinco amostras de 20 sementes, que foram pesadas a cada duas horas, até atingirem peso correspondente a 13% de umidade, com base na umidade inicial do lote que foi de 51%. Nas pesagens, foi utilizada uma balança analítica digital com precisão de miligramas, sendo os cálculos realizados de acordo com a fórmula para teor de umidade descrita anteriormente, para obtenção do peso seco correspondente aos 13% de umidade. A testemunha utilizada foi constituída por sementes não submetidas à secagem.

Antes de submeter as sementes à diferentes temperaturas de germinação foi imposto um pré-tratamento determinado por testes preliminares, em que estas foram submersas em água destilada por 24 horas a uma temperatura de 5°C . Posteriormente a este pré tratamento a frio, foram distribuídas 50 sementes em cada rolo de papel toalha, num total de três rolos por tratamento, constituindo-se assim, as repetições. Em seguida, os rolos foram colocados em béqueres contendo uma lâmina de água destilada e cobertos com sacos plásticos para manutenção da umidade e submetidos, em seguida, a diferentes temperaturas (15°C , 25°C , 35°C constantes e no escuro e, $30^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ luz/ escuro com fotoperíodo de 16h) em câmara de germinação tipo BOD.

O experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado (DIC), em sistema fatorial de 4×2 com três repetições, sendo quatro temperaturas e dois níveis de secagem.

Os dados foram transformados em arco seno $\sqrt{x\%/100}$ para percentagem de germinação e, em $\sqrt{x} + 0,5$ para os dados de índice de velocidade de germinação (IVG), seguidos de análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliações realizadas

3.1.1 Teor de umidade

A umidade das sementes foi, em média, de 51%. As sementes submetidas à secagem atingiram 13% de umidade em 24 horas sob condições ambientais de laboratório com umidade relativa de 60% e temperatura média de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.1.2 Teste de tetrazólio

Pelo teste de tetrazólio, foi observado que cerca de 30% das sementes mostraram-se viáveis para germinação. As sementes inviáveis com valores ao redor de 70% não apresentavam formação completa das estruturas internas. Nos estudos de morfologia aplicada à sistemática de dicotiledônias, os frutos de *Protium* que são triloculares, em geral apresentam dois lóculos férteis e um estéril (Barroso et al., 1999), sendo a maioria fértil, ao contrário dos resultados obtidos neste teste. Pode ter ocorrido algum tipo de interferência nas matrizes utilizadas neste trabalho, tais como condições climáticas desfavoráveis e baixa frequência populacional de indivíduos na região de coleta dos frutos. Observou-se que as sementes completamente formadas e consideradas viáveis, encontravam-se, portanto, potencialmente aptas para germinarem.

3.2 Efeito da secagem e de diferentes temperaturas na germinação de sementes de *Protium widgrenii* Engler.

Na avaliação do percentual de germinação das sementes que não foram submetidas à secagem, foram observados efeitos entre as diferentes temperaturas testadas, havendo, no entanto, maiores percentagens de germinação na temperatura de 25°C constante, atingindo valores ao redor de 24% de germinação. Sob temperatura mais elevada, como 35°C constante, houve redução da germinação para 16%, assim como para a temperatura mais baixa de 15°C e alternada de 30°C/20°C, quando foram observados 20% de germinação

Considerando a variável índice de velocidade de germinação (IVG), notou-se que as sementes submetidas à temperatura de 25°C comportaram-se diferentemente dos demais tratamentos térmicos, atingindo valores na ordem 1,526. Esta temperatura poderá ser recomendada para germinação das sementes sem secagem, pois, além de apresentar maiores percentagens de germinação, o processo foi alcançado em menor tempo. Para as demais temperaturas como 15°C (1,072); 35°C (1,313) e 30°C/20°C (1,283), foram observadas reduções no IVG (Figura 1).

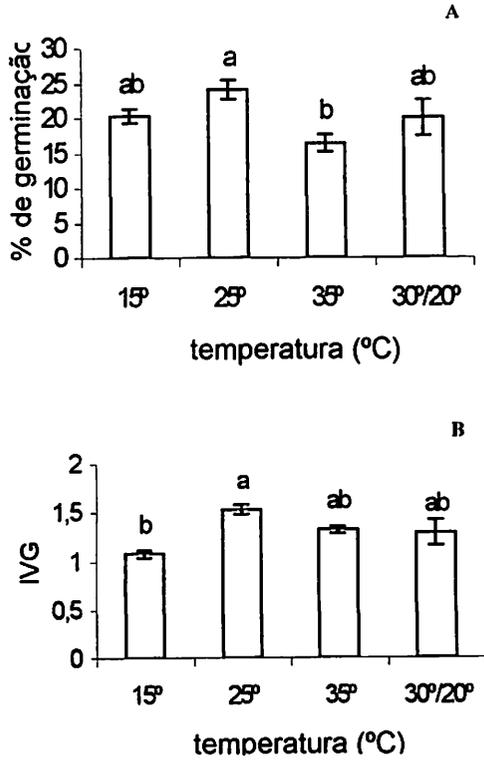


FIGURA 1: Valores médios de percentagem de germinação (A) e IVG (B) de sementes de *Protium widgrenii* Engler sem secagem em diferentes regimes térmicos. A barra representa o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Os resultados apresentados na Figura 1 nos levam a acreditar que temperaturas em torno de 25°C são as mais apropriadas pelas enzimas que participam dos processos metabólicos durante a germinação e adequadas para a embebição inicial das sementes em estudo. Resultados semelhantes foram obtidos por Miranda & Ferraz (1999), em *Maquira sclerophylla* (Moraceae), nos quais a faixa térmica favorável para germinação foi entre 20°C e 30°C, uma vez que não houve diferença entre as temperaturas de 25°C e 30°C. Em *Muntingia calabura* L (Elaeocarpaceae) foi relatado por Laura et al. (1994) que maiores

percentagens de germinação ocorreram sob temperatura constante de 25°C, tanto na presença quanto na ausência de ácido giberélico (GA₃).

Espécies vegetais, de maneira geral, respondem de forma diferenciada à temperatura de germinação. Algumas, no entanto, necessitam de temperaturas mais baixas para atingirem sua plena germinação. *Briza subaristata*, por exemplo, observou-se maiores percentagens de germinação a 15°C constante quando submetida a pré-tratamento a frio e o substrato de germinação umedecido com solução de 0,2% de KNO₃ ou sob regimes térmicos alternados de 15°C/10°C, quando o substrato é umedecido com água destilada. temperaturas mais elevadas inibem a germinação (Ferrari & Lopez, 2000).

Em algumas espécies florestais, como *Cryptocaria aschersoniana*, (Lauraceae), a variação no regime térmico alterou consideravelmente a percentagem final de germinação das sementes, em que as melhores temperaturas para germinação destas sementes, quando escarificadas, ocorrem a 30°C/20°C e a 25°C constante (Almeida, 2001). Chachalis & Reddy (2000), trabalhando com *Campis radicans*, concluíram que as condições ótimas para germinação das sementes desta espécie foi em temperaturas alternadas de 35°C/25°C e fotoperíodo de 12horas, sendo as sementes submetidas a pré-tratamento a frio (5°C) por duas semanas.

Para as sementes em estudo submetidas à secagem, verifica-se, na Figura 2, que não houve diferenças na percentagem de germinação sob temperaturas constantes de 25°C (19%) e 35°C (16%) e, em regime alternado de 30°C/20°C (21%), porém, apresentando valores percentuais de germinação superiores em relação ao tratamento de 15°C (11%).

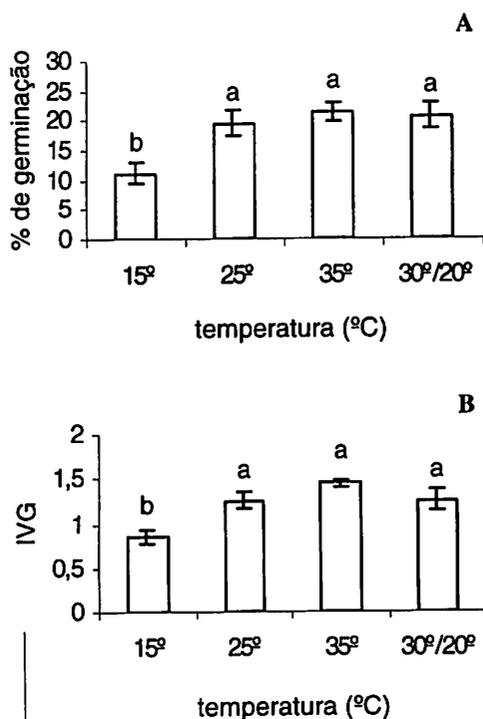


FIGURA 2: Valores médios de percentagem de germinação (A) e IVG (B) de sementes de *Protium widgrenii* Engler submetidas à secagem em diferentes regimes térmicos. A barra representa o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Pela Figura 2, verifica-se comportamento semelhante entre o índice de velocidade de germinação e percentual de germinação, ou seja, as sementes apresentam atraso na germinação quando submetidas à temperatura de 15°C (0,863), enquanto nas outras temperaturas não foram observadas diferenças no IVG: 25°C (1,258), 35°C (1,446), 30°C/20°C (1,255).

Comparando-se lotes de sementes submetidas à secagem e sem secagem, verifica-se, pelos dados de percentagens de germinação e IVG (Figura 3), que houve diferença significativa a 15°C constante e que, em sementes submetidas à secagem (13%), observam-se menores percentagens de germinação, enquanto

para o IVG, nesta mesma temperatura, não foram observadas diferenças entre sementes submetidas e não submetidas à secagem.

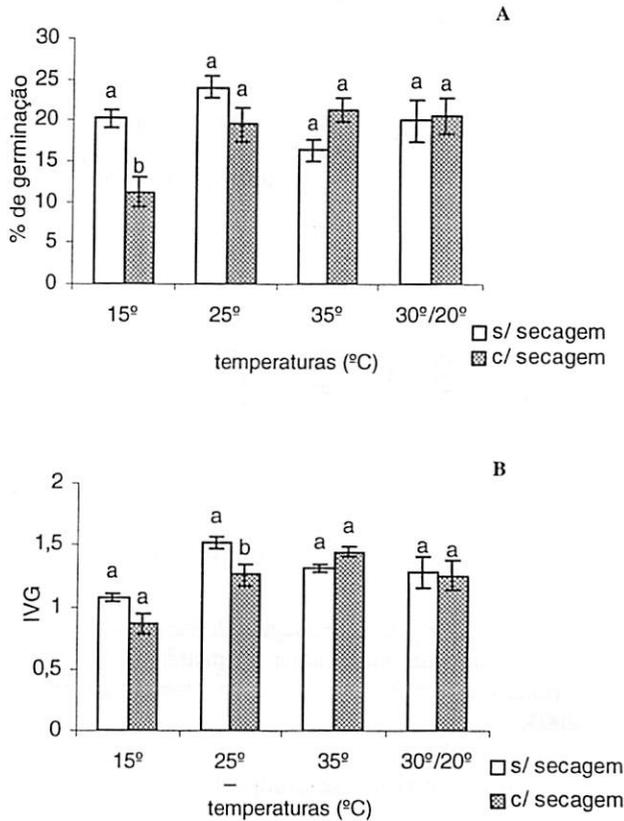


FIGURA 3: Valores médios de percentagem de germinação (A) e IVG (B) de sementes de *Protium widgrenii* Engler sem redução do grau de umidade e submetidas à dessecação em diferentes regimes térmicos. A barra representa o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.

De maneira geral, pode-se observar um comportamento semelhante entre sementes submetidas e não submetida à secagem, fato que permite inferir que sementes de *P.widgrenii* são tolerantes à secagem. Notam-se diferenças marcantes de comportamento entre sementes submetidas e não submetidas à

secagem, com destaque para as sementes não submetidas à secagem e nas temperaturas mais baixas (15°C), considerando o fator germinação e 25°C para o fator IVG. Essas diferenças podem ser explicadas por prováveis danos ocasionados pela embebição nas sementes secas, pela redução das atividades metabólicas do processo de germinação devido a baixas temperaturas e, no caso específico do IVG, pelo maior tempo gasto pelas sementes secas para atingirem a umidade necessária para a germinação. Com a secagem, os principais danos ocorrem na integridade das membranas e em sua composição química.

O teor de umidade durante a reidratação tem sido relacionado com a dependência da temperatura, a qual influencia os mecanismos protetores à secagem e, conseqüentemente, na reestruturação das membranas, como visto em *Zizania palustris*, relatado por Kovach & Bradford (1992), quando estas sementes submetidas à secagem apresentaram menores percentuais de germinação quando reidratadas a 5°C ou a 30°C. Carvalho (2000) chegou a resultados semelhantes em várias espécies florestais, entre elas *Alchornea triplinervea*, *Senna multijuga*, *Cedrela fissilis*, que mantiveram a mesma percentagem inicial de germinação em relação às sementes submetidas a diferentes graus de dessecação.

Uma outra espécie cujas sementes mostram o mesmo tipo de comportamento em relação à espécie em estudo foi *Swietenia macrophylla* (Meliaceae), com 27,7% de umidade após o beneficiamento, com 98% de germinação inicial (Carvalho & Leão, 1995). Estas sementes, após serem submetidas à secagem sob condições ambiente com ar condicionado (temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e $65 \pm 3\%$ de umidade relativa), mantiveram-se viáveis e com a mesma percentagem inicial de germinação e a uma umidade reduzida para 5,6%, levando os autores a classificarem a espécie no grupo das sementes ortodoxas. Outras espécies, como *Citrus karma* e *Citrus grandis*, quando submetidas a diferentes condições de secagem, também mostraram-se tolerantes

à secagem, tendo seu percentual de germinação reduzido em cerca de 10% a 15% após a secagem (Saipari et al., 1998).

4 CONCLUSÕES

- As maiores percentagens de germinação e IVG de *P. widgrenii* são obtidas a 25°C.
- Nas sementes submetidas à secagem, temperaturas baixas como 15°C proporcionaram quedas acentuadas no percentual de germinação e no IVG.
- Sementes da espécie em estudo toleram secagem.
- As sementes de *Protium widgrenii* Engler são, em sua maioria, inviáveis (70%).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

ALMEIDA, L. P. de. **Germinação, crescimento inicial e anatomia de plantas jovens de *Cryptocaria aschersoniana* MEZ. sob diferentes níveis de radiação.** 2001. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e Sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 443 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

CARVALHO, J. E. U. de.; LEÃO, N. V. Efeitos imediatos de diferentes métodos de dessecação na germinação de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Informativo ABRATES**, Brasília, v. 5, n. 2, p. 161, Ago. 1995.

CARVALHO, L. M. de. **Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais quanto à capacidade de armazenamento.** 2000. 97 p. Dissertação (Mestrado em Produção Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CARVALHO, N. M. de.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** Campinas: Fundação Cargil, 1980. 429 p.

CHACHALIS, D.; REDDY, K. N. factors affecting *Campis radicans* seed germination and seedling emergence. **Weed Science**, Lawrence, v. 48, n. 2, p. 212-216, Mar./Apr. 2000.

FERRARI, L.; LOPEZ, C. Germination conditions for *Briza subaristata*: pretreatments and temperature effects. **Seed Science and Technology**, Zurich v. 28, n. 3, p. 631-639, Jan. 2000.

KAYE, T. N.; KUYKENDALL, K. Effects of scarification and cold stratification on seed germination of *Lupinus sulphureus* ssp. *Kincaidii*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, n. 9, p. 663-668, June 2001.

KEBREAB, E.; MURDOCH, A. J. A model of the effects of a wide range of constant and alternating temperatures on seed germination of four *Orabanche* species. **Annals of Botany**, London, v. 84, n. 6, p. 549-557, June 1999.

KLEIN, R. M. **Contribuição ao conhecimento da flora e da vegetação do Vale do Itajaí- Santa Catarina**. 1978. 112 p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

KOVACH, D. A.; BRADFORD, K. J. Imbibitional damage and desiccation tolerance of Wild Rice (*Zizania palustris*) seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, n. 251, p. 747-757, 1992.

LAURA, V. A.; ALVARENGA, A. A. de.; ARRIGONI, M. F. de. Effects of growth regulators, temperature, light, storage and other factors on the *Muntingia calabura* L. seed germination. **Seed Science and Technology**, v. 22, n. 2, p. 573-579, 1994.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

MIRANDA, P. R. M. de.; FERRAZ, I. D. K. Efeito da temperatura na germinação de sementes e morfologia da plântula de *Maquira sclerophylla* (Ducke) C. C. Berg. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 303-307, Out. 1999. (Suplemento).

OLIVEIRA FILHO, A. T.; VILELA, E. A.; GAVILANES, M. L.; CARVALHO, D. A. Effects of flooding and understory bamboos on the physiognomy and tree species composition of a tropical semideciduous forest in Southeastern Brazil. **Vegetatio**, The Hague, v. 113, n. 1, p. 99-124, 1994.

SAIPARI, E.; GOSWAMI, A. M.; DADLANI, M. Effect of seed drying on germination behaviour in citrus. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 73, n. 2/3, p. 185-190, Mar. 1998.

CAPÍTULO 4

ASPECTOS COMPARATIVOS DA ANATOMIA FOLIAR EM DIFERENTES AMBIENTES DE *Protium widgrenii* Engler.

RESUMO

SEIFFERT, Marina. Aspectos comparativos da anatomia foliar em diferentes ambientes *Protium widgrenii* Engler. 2003. 17 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O estudo da anatomia foliar é de grande importância para que se compreenda a adaptação da espécie sob diferentes condições ambientais. O objetivo deste trabalho foi caracterizar alguns aspectos de anatomia foliar de *Protium widgrenii* Engler, desenvolvida em diferentes níveis de sombreamento, plantas obtidas in vitro, comparando-as àquelas provenientes do hábitat natural, com o intuito de verificar a plasticidade da espécie. Os resultados mostraram que a espécie em estudo apresenta plasticidade anatômica para diferentes condições ambientais. Plantas submetidas a maiores intensidade luminosa apresentaram maior espessura do limbo foliar e presença de tecidos lignificados, na extensão da bainha do eixo vascular.

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Orientador), Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-Orientador), Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães – UFLA (Co-Orientador)

ABSTRACT

SEIFFERT, Marina. **Comparative aspects of leaf anatomy in *Protium widgrenii* Engler submitted to different environmental conditions.** 2003. 17 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

The study of the leaf anatomy has a great importance to understand the species adaptation under different environmental conditions. The objective of this work was to characterize some leaf anatomical aspects of *Protium widgrenii* Engler, developed on different shading levels, plants obtained “in vitro”, to compare with those from natural habitat. In addition this goal aims to verify the species plasticity. The results showed that the species in study show anatomical plasticity in different environmental conditions. The plants submitted to higher light intensity presented larger leaf limb thickness and lignified tissues presence in the vascular system extension.

* Comitee - Advisor: Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga - UFLA, Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA, Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA.



1 INTRODUÇÃO

Protium widgrenii Engler é uma espécie arbórea, da família Burseraceae, de interesse em projetos de reflorestamento e enriquecimento de áreas perturbadas ou degradadas. Cada vez mais torna-se importante a preservação e recuperação das matas, principalmente em locais críticos, como margens de rios, nascentes e encostas.

Como consequência da degradação surgem clareiras nas matas, aumentando a luminosidade, alterando as temperaturas do ar e do solo e a disponibilidade de nutrientes. O grau de perturbação e a forma das clareiras são fundamentais para definir espécies potenciais que poderão recolonizar. Neste contexto, o fator luz é fundamental, uma vez que o contraste de radiação fotossinteticamente ativa entre floresta fechada e as diferentes clareiras apresentam larga amplitude (Sousa-Silva, 1999). A anatomia foliar é grandemente influenciada pelo nível de luz durante o crescimento, pois a folha é um órgão plástico e sua estrutura interna adapta-se às condições de luz do ambiente. Esta plasticidade adaptativa é uma característica das espécies que possuem potencial de aclimação (Björkman, 1981).

RF Grande número de espécies de plantas tem capacidade de desenvolver folhas com anatomias distintas quando cultivadas em diferentes níveis de luz. O aumento no nível de luz proporciona maior espessura do limbo foliar, especialmente vindo pelo alongamento ou adição de células do parênquima paliçádico, que está relacionado com a redução na resistência do mesófilo ao dióxido de carbono (Nobel, 1977).

Em várias espécies temperadas tem sido avaliada a tolerância à sombra e seu desempenho fisiológico sob condições de sol/sombra. Espécies tolerantes possuem maior plasticidade que as intolerantes. O aumento da plasticidade

indica que estas espécies são mais adaptáveis por sua capacidade de mudanças em condições modificadas do meio. Espécies que exibem pouca plasticidade mostram sua anatomia foliar com poucas diferenças estruturais entre folhas expostas ao sol e ao sombreamento (Carpenter & Smith, 1981).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a plasticidade anatômica foliar de *Protium widgrenii* em diferentes condições ambientais e níveis de sombreamento, que possam vir à influenciar as condições de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi conduzido de abril de 2002 a novembro de 2002, em condições de viveiro no setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, região sul do estado de Minas Gerais, a 918 m de altitude, latitude 21°14 S e longitude 45° GRW.

Segundo a classificação climática de Koppen, o clima regional é tipo Cwa com características CWb, apresentando duas estações bem definidas: seca com temperaturas mais baixas, de abril a setembro e chuvosa, com temperaturas mais elevadas, de outubro a março.

As mudas utilizadas foram produzidas a partir de propagação por sementes germinadas dos experimentos de germinação. Após a protrusão da radícula estas sementes foram transferidas para tubetes com Plantimax® e levadas para sala de crescimento sob sombrite de 30%, até atingirem o primeiro par de folhas (15 dias). Posteriormente, as mudas foram transferidas para sacos perfurados de 25x20 cm. O substrato utilizado para o enchimento dos recipientes foi composto por terra, areia e adubo na proporção 2: 1 1 (5 kg super fosfato simples e 0,5 kg cloreto de potássio/ m² de terra). As mudas foram mantidas durante três meses sob radiação de 30% e em abril de 2002 foram transferidas para os níveis de radiação pré estabelecidos.

As plantas de *Protium widgrenii* foram submetidas a três níveis de sombreamento (pleno sol, 30% e 70%); para os níveis de 30% e 70% foram utilizadas telas pretas de nylon.

Após oito meses submetidas aos tratamentos de sombreamento foram coletadas cinco folhas por tratamento, sendo uma folha por planta do 3° nó para o estudo anatômico e fixados em álcool 70°GL. De cada folha foram extraídos pedaços de 0,5 cm² da região mediana da folha e com os quais foram efetuados

estudos anatômicos com base no exame microscópico das seções obtidas à mão livre. As seções foram clarificadas em solução de 50% de hipoclorito de sódio, sendo em seguida lavadas com água destilada, neutralizadas em água acética 1% e montadas em glicerina a 50%. O corante utilizado foi a mistura azul de astra safranina, seguindo os métodos descritos por Bukatsch (1972).

Foram utilizadas regiões distintas da seção transversal para efetuar as medições das espessuras das epidermes adaxial e abaxial, dos parênquimas paliçádicos e esponjosos. Para cada seção transversal, o diâmetro da nervura central foi medido, em um total de 5 medições por tratamento. As medições foram realizadas com auxílio de ocular micrométrica.

Os mesmos procedimentos de fixação e de medições foram realizados para folhas de plantas adultas coletadas na região do terço superior da copa e para folhas de mudas com 4 meses, vindas do meio de propagação sexuada “in vitro” onde utilizou-se meio de cultura 100% MS em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura variando entre 25°C e 28°C.

2.1 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com tratamentos representados por cinco ambientes diferentes: folhas de plantas adultas (localizadas em ambiente nativo) e de mudas submetidas a pleno sol, 30% e 70% de sombreamento e de plantas cultivadas “in vitro”. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR versão 1999 (Ferreira, 1999). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises das amostras de seções transversais das folhas de *Protium widgrenii* indicaram que as espessuras dos tecidos que compõem as folhas, o tamanho da nervura central e o número de canais secretores diferem entre plantas cultivadas em diferentes ambientes, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Observando-se as médias de espessura, nota-se que as plantas cultivadas com maior intensidade luminosa possuem folhas mais espessas (Tabela 1).

TABELA 1: Espessura (μm) dos tecidos epidérmicos, parênquima paliçádico e esponjoso e espessura total de plantas de *Protium widgrenii* Engler submetidas a diferentes níveis de sombreamento. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Tratamentos	Epiderme adaxial	Parênqui ma paliçádico	Parênqui ma Esponjoso	Epiderme abaxial	Espessura do limbo
Pleno sol	15,248 a	64,992 a	74,784 b	11,440 a	166,464 a
Planta adulta	13,248 b	61,648 a	91,568 a	7,664 c	174,128 a
30%	12,416 bc	44,864 b	48,464 c	7,840 c	113,584 b
70%o	8,560 d	34,624 c	44,160 c	7,104 c	94,448 c
Planta "in vitro"	11,120 c	23,939 d	40,128 c	9,584 b	84,768 c
CV	14,56	10,35	26,59	16,75	14,24

As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Estes resultados concordam com os obtidos para outras espécies, em que geralmente ocorre um aumento na espessura dos tecidos que compõem o mesófilo com o aumento da intensidade luminosa (Björkman, 1981; Sert, 1992; Almeida, 2001; Castro, 2002).

Com variações do ambiente, a anatomia é modificada adaptando-se, garantindo sua sobrevivência e atendendo suas necessidades. Em folhas originadas de sombra é comum este o ajustamento para suprir as necessidades fotossintéticas. Estas folhas possuem razão crescente de fotossíntese por unidade de matéria seca em todos os níveis de luz quando são comparadas com folhas de locais de intensidade solar alta (Carpenter & Smith, 1980).

No estudo das epidermes adaxial e abaxial verificamos que são unisseriada em seção transversal. Observa-se, na Tabela 1, que plantas adultas cultivadas em ambiente nativo possuem epiderme adaxial e abaxial mais espessa. Analisando-se as epidermes adaxial e abaxial, observa-se que houve aumento na espessura com o acréscimo da intensidade luminosa como ocorreu em plantas submetidas a pleno sol, 30% de sombreamento e em plantas adultas. Em todos os ambientes, a espessura da epiderme adaxial foi maior que abaxial, concordando com as observações feitas por Castro (2002) em *Mikania glomerata* Sprengel, na qual as epidermes adaxial e abaxial em três regiões da planta apresentaram-se mais espessas em pleno sol. Resultado semelhante foi relatado por Lee et al. (2000) em *Hopea odorata*, que tiveram aumento do volume na epiderme superior e do tecido paliçádico quando submetida a ambientes com altos níveis de irradiação.

O mesofilo da folha de *Protium widgrenii* possui uma organização dorsiventral, o parênquima paliçádico constituído de uma camada e o parênquima esponjoso possui três camadas. Como se pode observar na Figura 1, plantas cultivadas a pleno sol e adultas possuem parênquima paliçádico mais espesso com células mais alongadas e justapostas em direção perpendicular à superfície foliar. Com a imposição do sombreamento, esta espessura foi reduzida, havendo diferenças entre os tratamentos (Tabela 1), assim como na organização das células menos alongadas e com maior espaços intercelulares. Gonçalves (2001), trabalhando com *Ocimum selloi*, notou que o parênquima

paliçádico possui células mais alongadas e justapostas, constituindo um tecido paliçádico mais espesso em plantas crescidas em radiação solar plena.

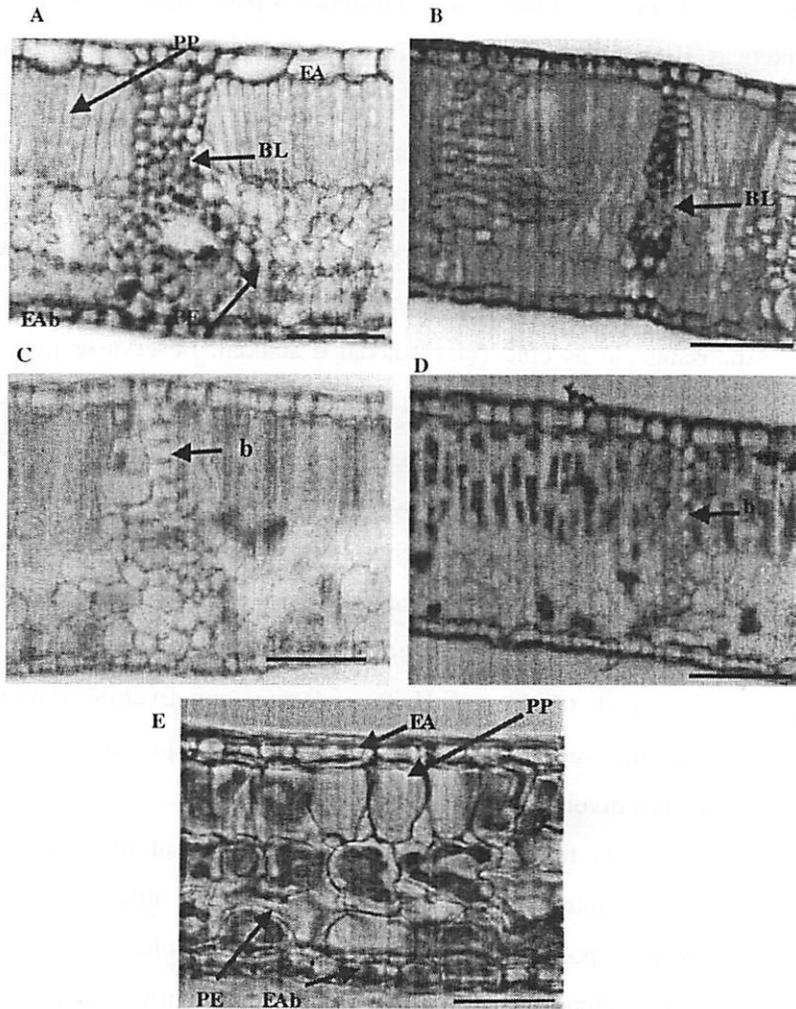


FIGURA 1: Seções transversais do mesofilo da folha de *Protium widgrenii*, submetidas a diferentes ambientes: A) planta adulta, B) pleno sol, C) 30% de sombreamento, D) 70% de sombreamento e E) in vitro, evidenciando os parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE), epiderme adaxial (EA), epiderma abaxial (EAb), extensão da bainha vascular lignificada (BL) e extensão da bainha (b). Barra=50µm.UFLA, Lavras, MG, 2003.

Segundo Fahn (1985), o tecido paliçádico é especializado no sentido de aumentar a eficiência da fotossíntese. Nos mesófilos que têm claramente diferenciados tecidos paliçádicos e esponjosos, a maioria dos cloroplastos se encontram nas células paliçádicas. Dada forma e disposição das células paliçádicas, os cloroplastos se colocam de maneira que permitam uma máxima utilização de luz. Outro fator importante que aumenta a eficiência fotossintética é a presença de um sistema bem desenvolvido de espaços intercelulares que se encontram, no mesófilo, o que facilita um rápido intercâmbio gasoso.

Diversos estudos têm demonstrado padrões de respostas anatômicas semelhantes, onde se observa um incremento na espessura total do limbo foliar e no parênquima paliçádico com aumento da intensidade luminosa (Medri & Lleras, 1980; Voltan et al., 1992; Castro et al., 1998; Lee et al., 2000).

As células que compõem o parênquima esponjoso possuem formato mais alongado e são justapostas, tornando-o mais espesso em plantas submetidas ao pleno sol e adultas, havendo diferença entre estes ambientes (Tabela 1); quando submetidas ao sombreamento estas células são arredondadas e têm espaços intercelulares (Figura 1). De acordo com Cutter (1987) e Sert (1992), plantas submetidas a baixas intensidades luminosas possuem espaços intercelulares no tecido esponjoso em maior proporção, tornando o parênquima esponjoso mais difuso.

Nervura menores localizadas no mesófilo apresentam extensão da bainha do sistema vascular ligando ambas as epidermes. Nas plantas encontradas em habitat natural este conjunto encontra-se lignificado quando comparado com os demais tratamentos. Em *Cryptocaria aschersoniana* também foi observada por Almeida (2001) a extensão da bainha do sistema vascular bem lignificado em plantas cultivadas a pleno sol. Segundo Esaú (1977), os feixes menores localizados no mesófilo apresentam-se envolvidos por camadas de células compactadas constituindo a bainha que envolve as terminações vasculares, de tal

maneira que o xilema e floema em seu transcurso na folha não fiquem expostos ao ar contido nos espaços intercelulares. Em muitas espécies as bainhas dos feixes são ligadas à epiderme por sua extensão transportando água.

O decréscimo da espessura do limbo (Tabela 1), das plantas de *Protium widgrenii* cultivadas em reduzida intensidade luminosa, deve ter ocorrido em virtude da diferença da distribuição dos fotoassimilados. Em menores intensidades luminosas, as plantas apresentam folhas mais finas devido ao consumo de assimilados para expansão da área foliar (Cooper & Qualls, 1967; Sert, 1992).

De acordo com as teorias que explicam a ação morfogenética da radiação solar, Rizzini (1976) argumenta que plantas submetidas à iluminação intensa apresentam elevada concentração de açúcares solúveis e, como consequência, há um aumento da pressão osmótica celular causando uma diminuição no teor de água dos tecidos. Assim, ocorre déficit hídrico nas folhas, o qual gera um desvio de água dos meristemas. Em consequência, o crescimento das células na fase de alongamento é paralisado. As paredes das células cessam a expansão, antes do que deveriam, e tendem por isso, engrossar. O resultado é a produção de células menores e dotadas de paredes mais espessas. O excesso de açúcares produzido na fotossíntese tende a permanecer na forma solúvel e vai servir como material de edificação parietal.

Na Tabela 2 observa-se que o diâmetro da nervura central foi maior em plantas cultivadas a pleno sol, diferenciando significativamente dos tratamentos de sombreamento, plantas adultas e in vitro.

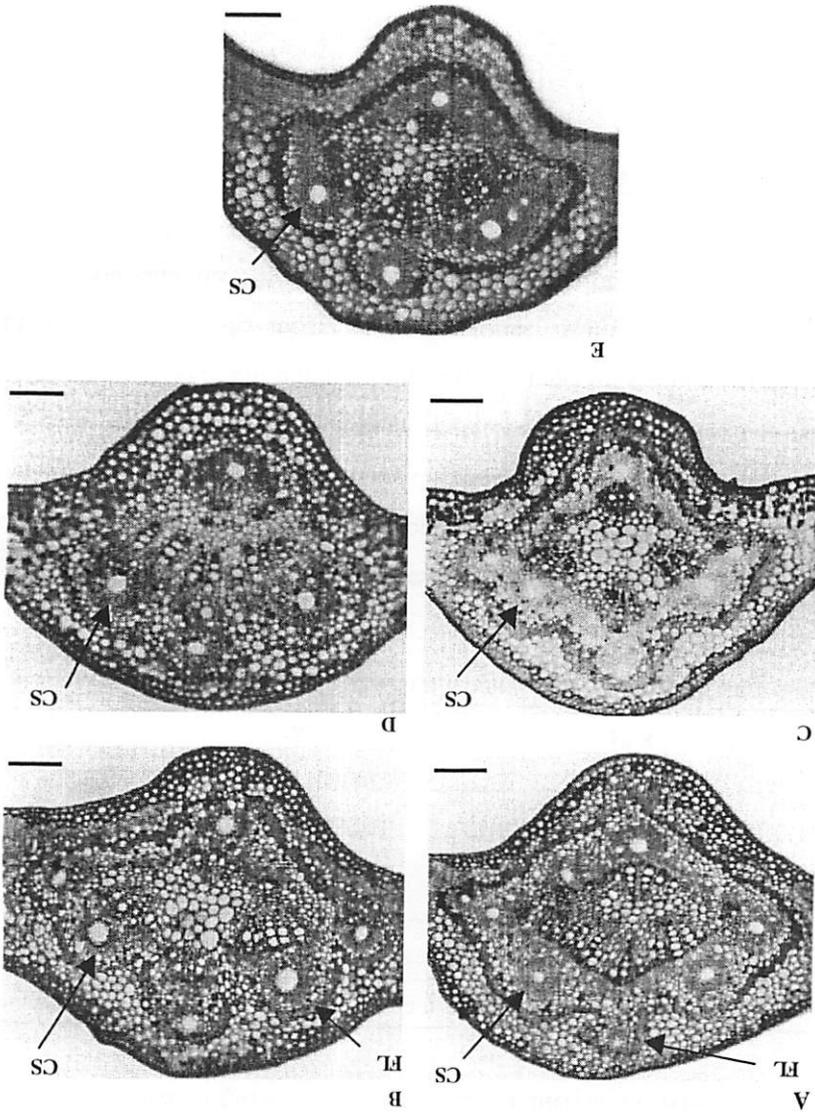
TABELA 2: Espessura (μm) da nervura central e número de canais secretores de *Protium wdgrenii* Engler submetidas a diferentes níveis de sombreamento. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Tratamentos	Diâmetro da nervura central	Número de canais
Pleno sol	226,032 a	8,200 a
Planta adulta	196,224 b	6,600 ab
30% de sombreamento	169,200 b	5,600 b
70% de sombreamento	169,920 b	4,800 b
Planta "in vitro"	110,496 c	4,800 b
CV	8,83	17,8

As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pela seção transversal da nervura central observar-se a presença de esclerênquima no córtex em uma proporção maior em plantas adultas, quando comparadas com seções transversais de nervuras de plantas submetidas a pleno sol e 30% de sombreamento. Canais secretores estão presentes nas nervuras e em maior quantidade em plantas cultivadas a pleno sol e adultas, possivelmente pela alta produção de substâncias secretoras. Acima destes canais há uma camada continua de fibras lignificadas, com maior intensidade em plantas adultas (Figura 2).

FIGURA 2: Seções transversais da nervura mediana da folha de *Protium widgeonii*, submetidas a diferentes ambientes: A) pleno sol, B) planta adulta, C) 30% de sombreamento, D) 70% de sombreamento e E) in vitro, evidenciando os canais secretores (CS) e fibras lignificadas (FL). UFLA, Lavras, MG, 2003.



3.1 Anatomia de mudas “in vitro”

O mesofilo de folhas de *P. widgrenii* cultivadas “in vitro” possui uma organização dorsiventral, parênquima paliçádico constituído de uma camada de células alongadas com espaços intercelulares e menos espessas quando comparada à plantas de outros ambientes. O tecido esponjoso é formado por duas camadas de células arredondadas mais espessas que o parênquima paliçádico. Este tecido do de difere de plantas cultivadas a pleno sol e adultas, sendo menos espesso (Tabela 1) e apresentando as epidermes unisseriadas, sendo a adaxial mais espessa. Plantas submetidas a outros ambientes (pleno sol, 30% sombreamento e adulta) possuem epiderme adaxial com maior espessura quando comparadas com plantas “in vitro”. Estas não diferem de plantas submetidas a 70% de sombreamento (Figura 1), conseqüentemente possuem espessura do limbo menor. Plantas cultivadas “in vitro” possuem nervura central com diâmetro menor que das plantas submetidas a outros ambientes (Tabela 2) e número de canais reduzidos (Figura 2).

As condições ambientais in vivo e in vitro podem ter contribuído para as diferenças observadas na estrutura foliar da espécie de *P. widgrenii*. Resultados semelhantes foram encontrados por Santos (2001). Este autor verificou, em *Coffea arabica* cultivar Rubi, parênquima paliçádico com maior espessura para plantas cultivadas in vivo do que in vitro e parênquima esponjoso com maior número de camadas in vivo.

4 CONCLUSÕES

- As variações anatômicas das folhas de *Protium widgrenii* Engler desenvolvidas em diferentes níveis de sombreamento foram caracterizadas por um aumento da espessura foliar nas plantas submetidas a maiores intensidades de radiação.

- As nervuras centrais das plantas de *Protium widgrenii* Engler apresentam maiores números de canais secretores em plantas submetidas a pleno sol.

- Essas observações evidenciam que a espécie *Protium widgrenii* Engler desenvolve certa plasticidade anatômica de acordo com o ambiente a que está submetida.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. P. **Germinação, crescimento inicial e anatomia de plantas jovens de *Cryptocaria aschersoniana* MEZ. sob diferentes níveis de radiação.** 2001. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BJÖRKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O.; NOBEL, P. S.; OSMONA, C. B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Physiological plant ecology I. response to the physical environment: encyclopedia of plant physiology.** New York: Singer-Verlag, 1981. p. 57-60.
- BUKASTSH, F. Benerkungren zur doppelfarbung astrablausafranina. **Microkosmos**, v. 61, p. 255, 1972
- CARPENTER, S. B.; SMITH, N. D. A comparative study of leaf thickness among southern Appalachian hardwoods. **Canadian Journal of Botanic**, Ottawa, v. 59, n. 8, p. 1393-1396, Aug. 1981.
- CASTRO, E. M. **Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel (GUACO) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento.** 2002. 221 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CASTRO, E. M.; GAVILANES, M. L.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, D. M.; GAVILANES, T. O. T. Aspectos da anatomia foliares de mudas de *Guarea guidoneo* (L.) Sleumer, sob diferentes níveis de sombreamento. **Daphne**, Belo Horizonte, v. 8, n. 4, p. 31-35, out. 1998.
- COOPER, C. S.; QUALLS, M. Morphology and chlorophyll content of shade and sun leaves of two legumes. **Crop Science**, Madison, v. 7, n. 6, p. 672-673, Nov./Dec. 1967.
- CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal: Parte II: órgãos, experimentos e interpretações.** São Paulo: Rocca, 1987. 336 p.
- ESAÚ, K. **Anatomy of seed plants.** 2. ed. New York: John Willey, 1977. 550 p.
- FAHN, A. **Anatomia vegetal.** Madrid: A. Fahn pergamon press, 1985. 599 p.

- ✕ FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3- Sistemas de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.
- ✕ GONÇALVES, L. A. **Ontogenia dos tricomas glandulares e influência da radiação solar no desenvolvimento e no teor de óleo essencial de *Ocimum selloi Benth* (Lamiacea)**. 2001. 95 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- ✕ LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KRISHAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S. K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, Apr. 2000.
- MEDRI, M. E.; LLERAS, E. Aspectos da anatomia ecológica de folhas de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 10, n. 3, p. 389-409, 1980.
- ✕ NOBEL, P. S. Internal leaf area and cellular CO₂ resistance: Photosynthetic implication of variations with grown conditions and plant species. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 40, n. 2, p. 137-144, 1977.
- RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos**. São Paulo: HUCITEC/EDUSP, 1976. 327 p.
- ✕ SANTOS, C. G. dos. **Micropopagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ✕ SERT, M. A. **Anatomia foliar e teores de clorofila em três variedades de soja *Glycine max* (L.) MEDRILL e dois níveis de radiação solar**. 1992. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- SOUSA-SILVA, J. C.; SALGADO, M. A. S.; FELFILI, J. M.; REZENDE, A. V.; FRANCO, A. C. Desenvolvimento inicial de *Cabralea Saldanha* em diferentes condições de luz. **B. Herb. Ezechias Heringer**, Brasília, v. 4, p. 80-89, dez. 1999.

VOLTAN, R. B. Q.; FAHL, J. L.; CARELLI, M. L. C. Variações na anatomia foliar de cafeeiros submetidas a diferentes intensidades luminosas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Londrina, v. 4, n. 2, p. 99-105, dez. 1992.