

**Dormência em sementes de *Annona crassiflora*
Mart.**

DANIEL LEÃO BANDEIRA DE MELO

2005

59436
050621

DANIEL LEÃO BANDEIRA DE MELO

Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart.

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Claudio Davide

Co-orientador:

Prof. PhD. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA

2005



59436

BIBLIOTECA CENTRAL

UFLA

Nº CLAS T631.521

MEL

dor

Nº REGISTRO 59436

DATA 15 / 07 / 05

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

Melo, Daniel Leão Bandeira de

Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart. / Daniel Leão Bandeira de Melo. -- Lavras : UFLA, 2005.

51 p. : il.

Orientador: Antonio Claudio Davide

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. *Annona crassiflora*. 2. Dormência morfofisiológica. 3. Endo- β -mananase. 4. Germinação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.521

BIBLIOTECA CENTRAL
UFLA
MEL
2005
R. REGISTRO
DATA 15

DANIEL LEÃO BANDEIRA DE MELO

Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart.

Dissertação apresentada à universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Engenharia Florestal, área de concentração Manejo Ambiental, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 4 de março de 2005

Prof. PhD. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva - UFLA

Prof. Dr^a. Lisete Chamma Davide – UFLA

Prof. Antonio Claudio Davide



UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, meus irmãos e minha filha,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu pai, Antônio Soares Bandeira de Melo, pela dedicação incondicional durante esta nossa conquista;

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciências Florestais, pela oportunidade de realizar o curso, e ao CNPq pela concessão da bolsa;

Ao professor Edvaldo Aparecido Amaral da Silva que foi fundamental em todas as etapas deste trabalho;

Ao meu orientador Antonio Claudio Davide pela confiança e oportunidades;

À Professora Lisete Chamma Davide pela atenção no laboratório e valiosas críticas;

Ao professor Eduardo Alves pela condução dos trabalhos de microscopia de precisão;

Ao professor Henk Hilhorst que, mesmo à distância, esteve sempre presente, contribuindo com o trabalho;

Ao doutorando Anderson Resende Almeida pelas fotos e pelo bom humor;

Aos colegas de trabalho José Márcio, José Carlos, José Pedro, Chica, Olívia, Thatiane Tathiane, Guilherme, Roberto, Jorge, Sheila, Patrícia, Sara e Lívia;

À minha filha querida que tanto me enche de vida e me leva a buscar ser melhor a cada dia;

À minha mãe Magda Leão pelo amor e apoio, para que eu me dedicasse ao mestrado;

Aos meus irmãos Toninho e Graziela, pelo exemplo amizade e incentivo;

À minha Dãni que esteve comigo desde o início, sempre linda carinhosa e curando minhas azias;

Aos amigos, Gentil, Simone, Gleice, Lílian, Anderson Cenzinho, Ferdinando, Claudão, Nélio, Bodinho, e Seu Edgar, pela alegria e companheirismo;

Aos companheiros da Travalata, à Lúcia e ao Huran.

Sumário

Lista de Figuras	ii
Lista de Tabela	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Caracterização da Espécie	3
2.2 Utilização da espécie	5
2.3 Desenvolvimento de sementes	6
2.3.1 Embriogênese e formação do tecido de reserva	6
2.3.2 Transição de desenvolvimento para germinação.....	8
2.4 Dormência	9
2.4.1 Dormência morfofisiológica.....	12
2.5 Germinação	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Origem das sementes.....	19
3.2 Beneficiamento das sementes.....	19
3.3 Determinação do grau de umidade da semente	19
3.4 Curva de embebição	20
3.5 Germinação no campo.....	20
3.6 Ganho de peso fresco dos embriões	21
3.7 Determinação do crescimento do embrião	21
3.8 Registro fotográfico.....	22
3.9 Quantificação da atividade de endo- β -mananase	23
3.10 Localização da atividade de endo- β -mananase	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Embebição	25
4.2 Germinação	25
4.3 Crescimento do embrião.....	27
4.4 Ganho de peso fresco do embrião	29
4.5 Quantificação da atividade de endo- β -mananase	29
4.6 Localização da atividade da endo- β -mananase	30
4.7 Registro fotográfico.....	31
5 DISCUSSÃO.....	33
6 CONCLUSÕES.....	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS.....	43

Lista de Figuras

FIGURA 1 Endosperma micropilar e endosperma lateral.	23
FIGURA 2. Curva de embebição de sementes <i>A. crassiflora</i> mostrando as fases I e II da embebição.....	25
FIGURA 3. Porcentagem de germinação referente a cada mês do ciclo de germinação das sementes de <i>A. crassiflora</i> , em condições de campo.	26
FIGURA 4. Curva de germinação de sementes de <i>A. crassiflora</i> , em condições de campo.....	26
FIGURA 5. Foto de um embrião, no momento da dispersão da semente, gerada em microscopia eletrônica de varredura, mostrando a radícula, hipocótilo e cotilédones.....	28
FIGURA 6. Comprimento do embrião de sementes de <i>A. crassiflora</i> desde a dispersão, em abril, até novembro de 2004. $P < 0,05$	28
FIGURA 7. Ganho de peso fresco do embrião de sementes de <i>A. crassiflora</i> durante os meses de germinação no campo. $P < 0,05$	29
FIGURA 8. Atividade de endo- β -mananase no endosperma micropilar e lateral de sementes de <i>A. crassiflora</i> durante a germinação no campo. $P < 0,05$. .	30
FIGURA 9 Localização da atividade da endo- β -mananase, usando “tissue printing”. A) ausência de atividade B) início da atividade ao redor da cavidade embrionária no mês de setembro – C) atividade crescente no endosperma micropilar e endosperma lateral – D) Atividade presente em todo o endosperma – E) Semente com o tegumento rompido.	32
FIGURA 10 Crescimento do embrião. A) semente de <i>A. crassiflora</i> na dispersão em abril – B) semente em agosto – C) semente em setembro – D) semente em outubro – E) semente recém germinada, em novembro.	32

Lista de Tabela

TABELA 1. Alguns eventos associados ao desenvolvimento, germinação e crescimento de plantas superiores. Adaptado de Kermodé (1990).....	9
TABELA 2. Versão simplificada da classificação de dormência primária de Nikolaeva (1977).	12

RESUMO

Melo, Daniel Leão Bandeira de. **Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart.** Lavras: UFLA, 2005. 50p. (Dissertação de Mestrado em Manejo Ambiental)*

Com o objetivo de melhor entender o processo de dormência das sementes de *Annona crassiflora* buscou-se caracterizar as mudanças morfológicas que ocorrem no embrião e endosperma durante a superação da dormência e germinação em condições de campo. Em abril, sementes recém dispersas foram semeadas e, mensalmente amostradas para determinação do comprimento e peso do embrião, e quantificação e localização da atividade de endo- β -mananase no endosperma. Os resultados mostraram que os embriões já se encontram diferenciados quando as sementes são dispersas, necessitando, porém retomar o crescimento para em seguida germinar. As sementes permaneceram dormentes no solo durante o outono e inverno (de abril a agosto) sem apresentar alterações morfológicas. Em setembro iniciou-se o aumento no comprimento e peso do embrião, degradação do endosperma, rompimento do tegumento e início da germinação. Até o mês de dezembro, 40% das sementes germinaram. Os resultados mostram que as sementes de *A. crassiflora* apresentam dormência morfofisiológica, sendo a dormência fisiológica superada nos meses de outono e inverno e a dormência morfológica superada a partir da elevação da temperatura no mês de setembro.

* Comitê orientador: Antonio Claudio Davide – UFLA (Orientador) e Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

Melo, Daniel Leão Bandeira de. **Seed dormancy in *Annona crassiflora* Mart.** Lavras: UFLA, 2005. 50p. (Master Dissertation in Environmental Management)*

With the objective of understand *Annona crassiflora* seed dormancy, morphological characterization in the embryo and endosperm was performed during dormancy overcoming and germination at field conditions. In April, after dispersal, seeds were sowed and every month samples were taken to measure embryo length, weight and localization and quantification of endo- β -mannanase activity in the endosperm. The results showed that the embryo is already differentiated when the fruit are dispersed. However, the embryo is not completely developed, requiring a period of time to resume growth before germination. The seeds remained dormant in the soil during fall and winter (April-August), without any morphological changes. Morphological changes started in September, when embryo grew in size and weight, endosperm was degraded, the tegument ruptured and the first seeds germinated. Until December, 40% of the seeds germinated. The results showed that *A. crassiflora* has morphophysiological dormancy, where physiological dormancy being overcome during fall and winter and morphological dormancy being overcome upon the increase of temperature in September.

* Guidance Committee: Antonio Claudio Davide – UFLA (Supervisor) e Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA (Co-Supervisor)

1 INTRODUÇÃO

A região do cerrado, com uma área de aproximadamente 200 milhões de hectares no Brasil, dos quais 30,8 milhões (15%) encontram-se em Minas Gerais (Costa Neto al., 1990), apresenta elevada biodiversidade. Estima-se que a flora da região possua 10 mil espécies, com um grande número de espécies ainda pouco estudadas, de alto potencial alimentar, madeireiro, combustível, agroindustrial, forrageiro, medicinal e ornamental (Avidos & Ferreira, 2000).

As formas de utilização das espécies de importância econômica do cerrado tem sido o plantio das mesmas em áreas de proteção ambiental, o enriquecimento da flora das áreas mais pobres, a recuperação de áreas degradadas, a formação de pomares domésticos e comerciais, e o plantio em áreas de reflorestamento, parques e jardins (Avidos & Ferreira, 2000). Para atender esta demanda, a produção de mudas tem sido intensificada nos últimos anos.

Annona crassiflora, popularmente conhecida como marolo, araticum, cabeça-de-negro, cascudo e pinha-do-cerrado, pertence à família Annonaceae e é uma das principais espécies arbóreas do cerrado com potencial alimentar e econômico a ser explorado. Sua distribuição é bastante ampla, ocorrendo nos cerrados dos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Mato Grosso, Maranhão, Goiás, Tocantins, Pará, Bahia e Piauí (Ribeiro et al., 2000). Os frutos são grandes, apresentando cerca de 20cm de diâmetro, pesando até 5kg, sendo muito apreciados pela população. Na época da dispersão dos frutos, de fevereiro a abril, estes são comercializados em feiras livres e beiras de estradas, com preços variando de dois a cinco reais por fruto, pagos diretamente ao produto rural (Ribeiro et al., 2000). Dos frutos pode-se retirar a polpa e utilizá-la na produção de geléias, doces e licores. Além disto, *A. crassiflora*

possui princípios ativos com potencial de uso na indústria farmacêutica para a produção de medicamentos utilizados para o tratamento de câncer.

Todavia, a produção de mudas dessa espécie é dificultada pelo fato de suas sementes possuírem dormência, devido à imaturidade do embrião, o qual necessita finalizar seu desenvolvimento durante a embebição, para que então ocorra a germinação (Rizzini, 1973; Baskin & Baskin, 1998). Segundo Rizzini (1973), quando as sementes de *A. crassiflora* são dispersas, no final do verão, o embrião não se encontra totalmente desenvolvido, requerendo um período após a dispersão, para que o embrião finalize seu desenvolvimento. Este comportamento natural seria, então, responsável pelo longo período necessário para a germinação das sementes de *A. crassiflora*.

Durante a germinação das sementes de *A. crassiflora* o hipocótilo é a primeira estrutura a emergir do solo, caracterizando germinação epígea. A germinação é extremamente lenta, necessitando, em condições de campo, de 240 a 260 dias para que 50% da população de semente apresente emergência da plântula (Rizzini, 1973).

Todavia, ainda são desconhecidos os eventos iniciais que ocorrem na germinação de sementes de *A. crassiflora*, bem como os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos com a indução, manutenção e superação da dormência. Desta forma, este trabalho tem como objetivo caracterizar as mudanças morfológicas, que ocorrem nas sementes de *A. crassiflora*, durante a superação da dormência e germinação em condições de campo, dando subsídio para o avanço no conhecimento sobre dormência desta espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da Espécie

Annona crassiflora é uma espécie frutífera característica e exclusiva do cerrado brasileiro. A espécie ocorre desde o Estado de São Paulo até Tocantins, passando por Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Bahia em áreas de cerrados e cerradões, sendo mais freqüente em terrenos elevados e de solos arenosos (Lorenzi, 1998). A planta é decídua - perde as folhas parte do ano; heliófita - cresce a pleno sol; e seletiva xerófita - possui mecanismos anatomo-fisiológicos para restringir a perda de água.

A. crassiflora é uma planta arbórea, pertencente à família Annonaceae, com a altura da árvore variando entre 4m e 8m e o diâmetro da copa chegando aos 4m. O tronco é geralmente tortuoso, variando entre 20cm e 30cm de diâmetro, revestido por uma casca áspera e corticosa resistente à ação do fogo. As folhas são crasso-membranosas, glaucas, coriáceas quando maduras e ferrugineo-hirsutas quando jovens (Lorenzi, 1998). A planta possui sistema radicular do tipo axial ou pivotante que atinge grandes profundidades (Carvalho, 2002).

A planta floresce, geralmente, entre os meses de outubro e novembro (Lorenzi, 1998). As flores são geralmente solitárias, podendo ser encontradas flores agrupadas, axilares, com pétalas engrossadas e carnosas de cor verde-amarelada e sedosas (Lorenzi, 1998). As flores são hermafroditas e apresentam protoginia, isto é, o gineceu - órgão feminino - amadurece primeiro que o androceu - órgão masculino - (Carvalho, 2002). A polinização é do tipo entomófila (feita por insetos), com flores apresentando termogênese, isto é, a flor totalmente formada sofre um leve aquecimento no início da noite, mais ou menos 10°C no seu interior quando comparada com a temperatura externa da

flor. Devido a esse aquecimento interno, a flor exala um forte cheiro que atrai seus polinizadores (Carvalho, 2002).

O fruto, popularmente conhecido como marolo, araticum, araticum-dos-grandes e cabeça de negro é do tipo baga subglobosa, de superfície tomentosa e tuberculada, de cor verde com o fruto em desenvolvimento, e marrom, quando maduro (Lorenzi, 1998). A polpa é levemente adocicada e de cheiro agradável, podendo variar do branco ao amarelo, sendo que esse último tem sabor e cheiro mais acentuado e por isto é mais bem aceito pelo mercado (Carvalho, 2002). O fruto pode pesar de 0,5Kg a 5Kg, contendo de 60 a 190 gomos, em forma de cone, que dentro possuem, geralmente, uma semente. A frutificação tem início em novembro e a maturação se dá entre janeiro e abril, com um período curto de frutificação, mais ou menos de 14 a 16 semanas (Carvalho, 2002). A planta possui produção sazonal, isto é, produz muito num ano e pouco no outro. Em média, uma planta adulta produz de 5 a 20 frutos, mas há casos de produzir até 40 frutos, que despolpados rendem de 50-60% de polpa (Carvalho, 2002).

As sementes possuem aspecto abovóide, são grandes (100 sementes pesam em médias entre 150-200g) e achatadas, o tegumento é coriáceo e de cor marrom e o endosperma rígido (Rizzini, 1973). O endosperma possui reentrâncias e por isto é dito que a semente possui endosperma ruminante, pois a superfície deste lembra o interior de um rumem. O endosperma é o principal componente da semente, apresentando células de formato isodiamétrico; presença de óleos tem sido relatada (Heijden & Bouman, 1988). As paredes celulares das células do endosperma de Annonaceae são bastante rígidas (Heijden & Bouman, 1988), possivelmente compostas de celulose, mananas ou galactomananas.

O embrião de uma semente de *A. crassiflora*, no momento da dispersão, é uma massa de células não diferenciada com 2mm de comprimento, hialino e de formato cilíndrico (Rizzini, 1973). Este ainda não se encontra completamente

desenvolvido, não sendo possível distinguir os cotilédones e o eixo embrionário (Rizzini, 1973).

2.2 Utilização da espécie

Entre as frutas nativas brasileiras, que ainda não foram domesticadas, o marolo é uma das que apresentam o maior índice de aproveitamento. Além do consumo *in natura* do fruto, são inúmeras as receitas de doces e bebidas que levam o sabor perfumado e forte de sua polpa. Existe mercado para o fruto e, durante os meses de fevereiro a abril, é possível encontrar marolo sendo vendido nas ruas, nos mercados, feiras e à beira de estradas por onde ele ocorre.

O potencial econômico do marolo como cultura foi calculado baseado no preço médio do fruto de R\$ 3,00, na produtividade média de 10 frutos por plantas e na densidade de 357 plantas por hectare. O ganho bruto médio com a venda dos frutos é de R\$ 12.495,00/ha/ano, podendo chegar a R\$ 21.420,00/ha/ano caso o agricultor comercialize a polpa do fruto (Carvalho, 2002).

A casca que reveste o tronco pode ser empregada como sucedâneo da cortiça e a madeira pode ser empregada como caixotaria e miolo de portas e painéis (Lorenzi, 1998). A árvore de *A. crassiflora*, apesar do lento crescimento, é rústica, de pequeno porte e com raízes profundas, características desejáveis para a arborização de ruas estreitas.

Santos et al. (1996) descreveram a estrutura de um novo poliquetideo extraído a partir das sementes de *A. crassiflora*, denominado araticulina (1), que demonstrou, *in vitro*, citotoxicidade contra células de carcinoma humano e contra células de melanoma humano.

Com todas as alternativas de uso da espécie, o cultivo da *A. crassiflora* é uma alternativa viável, principalmente considerando o uso sustentável dos

recursos. Na região do cerrado a espécie pode ser cultivada em consórcio com outras espécies e também em áreas de preservação ambiental, garantindo renda ao produtor e impacto mínimo ao ambiente.

Outro ponto a ser considerado é o fato de a *A. crassiflora* nativa correr risco de extinção, devido ao desmatamento do cerrado. O repovoamento e preservação de reservas ainda existentes que tenham *A. crassiflora* possuem, além do valor econômico, um valor ambiental inestimável.

2.3 Desenvolvimento de sementes

2.3.1 Embriogênese e formação do tecido de reserva

Durante a evolução das plantas terrestres houve uma tendência de aumento da dependência do desenvolvimento embrionário sobre o esporófito maternal. Esta tendência culminou nas plantas que florescem (as angiospermas), onde o embrião desenvolve dentro de uma semente (Kermode, 1990).

O ciclo de vida das angiospermas é dividido em geração haplóide e geração diplóide, que dependem uma da outra. A geração haplóide, ou gametofítica começa após esporos sofrerem meiose, seguida de mitoses e diferenciação ou em um grão de pólen - gametófito masculino - ou em um saco embrionário - gametófito feminino - (Kermode, 1990).

A geração diplóide, ou esporofítica começa com o zigoto, após a fertilização, e forma a planta adulta com órgãos vegetativos (folhas, caule e raízes) e flores que contém os órgãos reprodutivos (antera e pistilo). O traço característico da fertilização nas angiospermas é a participação de dois núcleos masculinos, logo, dois eventos de fertilização ocorrem: a oosfera haplóide é fertilizada por uma célula espermática e os núcleos polares centrais do saco embrionário são fertilizados pela outra célula espermática, resultando na

formação do embrião diplóide e do endosperma triplóide respectivamente (Bewley & Black, 1994).

Assim que ocorre a fertilização da oosfera, que leva a formação do zigoto, tem início a embriogênese. A fase de morfogênese, caracterizada por intensa divisão celular, consiste de sucessivas etapas denominadas de globular, trapezoidal, cordiforme, torpedo e estágio cotiledonar, em referência às formas que o embrião adquire à medida que aumenta o número de células (Mayer et al., 1991). Em seguida, quando o embrião está morfológicamente formado, ocorre um período de crescimento que é controlado principalmente por expansão celular (Goldberg et al., 1994). Na fase final do desenvolvimento, inicia-se o período de maturação, na qual há acúmulo de reservas, aquisição de tolerância à dessecação e dormência (Goldberg et al., 1994).

Em sementes em desenvolvimento, o endosperma se diferencia concomitantemente com a embriogênese, embora o desenvolvimento do endosperma possa ocorrer independente da embriogênese (Ohad et al., 1996).

Carboidratos, lipídios e proteínas de reserva da semente são acumulados nas células do endosperma, durante a segunda metade do desenvolvimento da semente. Em sementes endospermáticas as reservas são mantidas principalmente no endosperma na maturidade, e são degradadas após a germinação para dar suporte à nova plântula até que esta se torne autotrófica. A mobilização das reservas armazenadas nas sementes endospermáticas é geralmente um evento pós-germinação (Bewley & Black, 1994). Em contraste, em sementes não endospermáticas (sementes cotiledonares) as camadas do endosperma que se diferenciam brevemente durante a embriogênese são degradadas antes da dispersão da semente.

O embrião das angiospermas contém dois órgãos primários: eixo embrionário e cotilédones (um cotilédone nas monocotiledôneas e dois nas dicotiledônias). Estes órgãos são compostos de três camadas básicas de tecidos:

protoderme, procâmbio e meristema fundamental; os quais originam a epiderme, tecido vascular e tecido parenquimático da jovem plântula, respectivamente. O corpo de um embrião formado inclui o meristema apical, hipocótilo, meristema radicular e um padrão radial incluindo a epiderme e as camadas de tecidos conjuntivos e vasculares (Esau, 1974).

A embriogênese em plantas superiores encaminha para (i) especificar meristemas e o padrão parte aérea-raiz do corpo da planta, (ii) diferenciar os tecidos primários da planta, (iii) gerar um órgão especializado em armazenar reservas, essenciais para a tolerância à dessecação, germinação e o desenvolvimento das plântulas e (iv) capacitar o embrião para permanecer dormente até que as condições se tornem favoráveis para o desenvolvimento pós-embrionário.

2.3.2 Transição de desenvolvimento para germinação

Organismos multicelulares requerem um determinado período de tempo para controlar o seu desenvolvimento (Raz et al., 2001), havendo necessidade de determinadas fases para que a divisão e a diferenciação celular ocorram. Em plantas, ocorrem fases de transição entre o embrião, a plântula e o organismo adulto. Essas fases de transição levam a mudanças na taxa de divisão e padrão celular, alterando a taxa de crescimento da planta e formando novas estruturas.

O desenvolvimento da semente e a germinação nas angiospermas podem ser divididos em estágios confluentes (Figura 1). Inicialmente, durante a histodiferenciação, uma única célula zigótica passa por extensiva divisão mitótica e as células resultantes diferenciam para formar o plano básico do corpo do embrião. Em seguida, a maturação ocorre grandemente na ausência de divisão celular e é caracterizada pela expansão celular e deposição de reservas nos tecidos de armazenamento. A maturação é geralmente encerrada com a

secagem, a qual resulta em uma redução gradual no metabolismo à medida que a água é perdida pelos tecidos da semente e o embrião passa para um estado quiescente ou entra em dormência (Kermod, 1990).

TABELA 1. Alguns eventos associados ao desenvolvimento, germinação e crescimento de plantas superiores. Adaptado de Kermod (1990).

Desenvolvimento			Germinação		Crescimento
Histodiferenciação	Dessecação	Semente seca	Embebição		Protrusão da radícula
Maturação					
Divisão celular	Deposição de reservas	Redução do metabolismo	Quiescência	Retomada do metabolismo	Expansão celular
	Expansão celular		Dormência		Divisão celular

Para muitas sementes, a aquisição de tolerância à dessecação é um importante evento de desenvolvimento, e a secagem na maturação é um evento importante para o encerramento do desenvolvimento, tendo como resultado uma mudança da fase de desenvolvimento para a fase de germinação (Bewley & Black, 1994).

2.4 Dormência

A dormência é o resultado de uma adaptação alcançada durante a evolução das espécies e que permitiu às mesmas sobreviverem e colonizarem novos ambientes, superando situações estressantes que suas sementes e jovens plantas venham a enfrentar (Baskin & Baskin, 1988). O fenômeno é uma das mais extraordinárias adaptações vegetais, sem a qual a perpetuação das espécies vegetais poderia estar comprometida. A dormência é a chave para a formação de bancos de sementes no solo, que representam a reserva de sementes prontas para

germinar e dar origem a uma nova formação vegetal, caso ocorra algum distúrbio que venha a alterar o equilíbrio dos ecossistemas (Baskin & Baskin, 1988).

Embora muitos pesquisadores estudem a dormência de sementes, não há uma definição amplamente usada para o fenômeno, talvez por ser manifestada e superada de diferentes maneiras em diferentes espécies (Bewley & Black, 1994).

A dormência de sementes é o processo caracterizado pelo atraso da germinação ou até mesmo sua ausência, mesmo estando estas sementes em condições ambientais satisfatórias para a germinação. Componentes do processo de germinação, tais como embebição, respiração, síntese de ácidos nucléicos e proteínas e inúmeros outros eventos metabólicos, podem ocorrer em uma semente dormente, sem que haja protrusão da radícula (Bewley & Black, 1994).

Sementes de algumas espécies são impedidas de germinar pelos tecidos que envolvem o embrião - dormência mecânica. Nestes casos, os embriões germinam quando isolados das sementes e incubados em condições apropriadas (Bewley & Black, 1994). Uma outra categoria de dormência é quando o próprio embrião é dormente - dormência embrionária (Bewley, 1997).

As sementes dormentes possuem mecanismos que impedem a germinação até que se instalem condições ambientais próprias, não apenas para a germinação, mas também para o crescimento da nova planta (Bewley & Black, 1994). Esta adaptação é devido ao processo de seleção ao longo da história evolutiva das espécies, onde a dormência se tornou uma característica chave para a sobrevivência da espécie frente às condições de estresse que suas sementes e plântulas enfrentavam a cada ciclo reprodutivo.

Como a dormência é o resultado de adaptação para as mais variadas situações encontradas ao longo do planeta, várias são as formas em que este fenômeno se manifesta, podendo ser desde alguma resistência a entrada de água para a germinação até os mais complexos mecanismos hormonais que controlam

o desenvolvimento da semente (Bewley & Black, 1994). O grau de dormência é normalmente relacionado com o grau de germinação. Há uma dificuldade em determinar se um fator influencia a germinação ou a dormência. Segundo Bewley & Black (1994), a essência de se desvendar os mecanismos de dormência está na capacidade de se distinguir a sua causa e o efeito. Ou seja, respondendo a duas perguntas: Qual é o mecanismo de ação do agente inibidor? Por que o embrião não consegue superá-lo?

Nikolaeva foi a primeira bióloga a desenvolver um esquema de classificação compreensivo para os vários tipos de dormência de sementes. Este foi publicado em Russo em 1967 e em inglês dois anos depois (Nikolaeva, 1969). Em 1977 Nikolaeva expandiu e revisou o sistema, e esta versão permanece sendo o melhor esquema de classificação geral disponível nos dias de hoje. De acordo com Nikolaeva (1969, 1977) existem dois tipos gerais de dormência em sementes: endógena e exógena. Na dormência endógena, algumas características do embrião previnem a germinação, enquanto na dormência exógena alguma característica da estrutura, incluindo endosperma, tegumento ou fruto, cobrindo o embrião previne a germinação (tabela 2).

TABELA 2. Versão simplificada da classificação de dormência primária de Nikolaeva (1977).

	Tipo	Causa	Quebra
Endógena	Fisiológica	Mecanismo inibidor fisiológico (PIM)	Estratificação quente e, ou, fria
	Morfológica	Embrião imaturo	Tempo suficiente sob condições apropriadas para a germinação
	Morfofisiológica	PIM e embrião imaturo	Estratificação quente e, ou, fria e tempo suficiente sob condições apropriadas para a germinação
Exógena	Física	Fruto e, ou, tegumento impermeável	Escarificação
	Química	Inibidor de germinação	Lixiviação de inibidores
	Mecânica	Estrutura rígida restringindo crescimento	Estratificação quente e, ou, fria

2.4.1 Dormência morfofisiológica

A dormência morfológica ocorre em sementes grandes com embriões lineares rudimentares (Baskin & Baskin, 1998). A maior parte da semente é ocupada por endosperma e o embrião pode representar apenas 1% do volume da semente, ou até menos (Nikolaeva, 1969). Na dormência morfológica há diferenciação do embrião, porém o mesmo se encontra pouco desenvolvido. Frequentemente é observado em Annonaceae, Arecaceae, Araceae, Liliaceae, Magnoliaceae e outras, sendo a maioria de clima tropical e poucas espécies de clima temperado (Baskin & Baskin, 1998). Na natureza, o período que passam, seja em ambiente quente ou frio, colabora para completar o desenvolvimento do embrião após a semente ter sido dispersa da planta mãe (Baskin & Baskin, 1998).

Para que haja o crescimento do embrião, a semente requer substrato úmido e um tempo determinado sob condições de temperaturas adequadas, e algumas espécies também requerem uma combinação específica de luz e escuro (Baskin & Baskin, 1998). Em ambientes tropicais, embriões imaturos crescem lentamente após a dispersão da planta mãe. A associação de dormência fisiológica com dormência morfológica pode explicar a germinação da espécie *Elaeis guineensis*. Sementes da variedade *dura*, mantida a 39,5^oC por 100 dias, tiveram no máximo 42% de germinação, enquanto que as sementes que ficaram 50 dias ou mais a 39,5^oC e depois levadas para a temperatura de 28^oC tiveram uma germinação entre 60-90%. Um aumento na porcentagem de germinação das sementes partindo de 28^oC, seguindo por uma estratificação quente a 39,5^oC, sugere que algumas sementes possuem dormência fisiológica – superada à 39,5^oC – aliada à dormência morfológica - superada à 28^oC - (Baskin & Baskin, 1998).

O fenômeno observado em sementes de *A. crassiflora* parece estar ligado à imaturidade do embrião e, quando estas são colocadas a embeber, a germinação é retardada até que seja completado o desenvolvimento do embrião (Rizzini, 1973). Segundo Baskin & Baskin (1998), o embrião é dormente quando as sementes dessa espécie são dispersas no final da estação chuvosa, caracterizando, assim, dormência primária. Segundo Rizzini (1973), o embrião da *A. crassiflora*, no momento da dispersão, é uma massa hialina com aproximadamente 2mm de comprimento, não sendo possível identificar os cotilédones nem o eixo, mesmo sob um aumento de 50 vezes.

Mais estudos são necessários para determinar se a semente de *A. crassiflora* requer estratificação fria para superar a dormência fisiológica antes da superação da dormência morfológica. Porém, a dormência fisiológica pode não estar presente e, neste caso, o crescimento do embrião da *A. crassiflora* é muito lento (Baskin & Baskin, 1998).

2.5 Germinação

A germinação tem início com o ganho de água por uma semente, sobre condições que encorajem o metabolismo, isto é, temperatura adequada e a presença de oxigênio, e termina com a alongação do eixo embrionário e protrusão da radícula. Este fenômeno inclui inúmeros processos, tais como hidratação de proteínas, mudanças estruturais sub-celulares, respiração, síntese de macromoléculas e alongação celular, sendo nenhum deles único no processo de germinação (Bewley & Black, 1994).

O ganho de água pela semente é um passo inicial essencial para a germinação. Sob condições ótimas de fornecimento de água, a embebição é trifásica. O potencial hídrico de uma semente seca é muito menor que o do substrato úmido ao redor e o rápido ganho inicial na embebição, ou fase I, é principalmente consequência de forças matriciais, e a embebição acontece tanto em sementes dormentes quanto em sementes não dormentes. A fase II é de estagnação no ganho de água, quando as forças matriciais se equilibram e não são mais significantes. Durante a fase II, em sementes não dormentes, a maioria dos eventos prepara para a germinação, sendo as sementes dormentes também metabolicamente ativas nesta fase. Um aumento posterior no ganho de água ocorre somente após a finalização da germinação (fase III). Embora sementes dormentes atinjam a fase II da embebição, apenas sementes germinando atingem a fase III, a qual é concomitante com a alongação da radícula (Bewley & Black, 1994).

Quando sementes viáveis secas absorvem água, uma corrente de eventos é iniciada, resultando na emergência da radícula. Na embebição, o metabolismo rapidamente recomeça. Respiração, ativação de enzimas e organelas e síntese de RNA e proteínas são atividades celulares fundamentais intimamente ligadas à germinação e à preparação para o crescimento subsequente. Com o início da

embebição da semente, o ciclo celular é ativado, assim como a síntese de proteínas, que tem a função de dar suporte à manutenção do crescimento do embrião (Bewley, 1997). Síntese de β -tubulina, uma proteína presente durante a divisão e a expansão celular, ocorre no embrião de sementes de tomate (de Castro et al., 2000) e café (da Silva et al., 2004). Síntese de proteínas relacionadas com o crescimento do embrião funciona como uma preparação inicial para o crescimento da radícula durante a germinação e, após a protrusão, no estabelecimento da plântula.

A expansão da radícula através das estruturas ao redor do embrião é o evento que termina a germinação e marca o início do crescimento da plântula. Esta expansão pode, ou não, ser acompanhada de divisão celular (Bewley, 1997). Em muitas espécies, as células do embrião quiescentes encontram-se na fase G_1 (Bewley e Black, 1994), e a primeira mitose no meristema da ponta da radícula normalmente ocorre logo após a protrusão da radícula. Pawlowski et al. (2004), estudando o ciclo celular e o acúmulo de β -tubulina durante a superação da dormência de sementes de *Acer platanoides*, observaram que a maioria dos núcleos das células das sementes secas encontram-se na fase G_2 do ciclo celular e com o menor conteúdo de β -tubulina detectado. A embebição e a estratificação fria resultaram na redução do número de células na fase G_2 e um aumento simultâneo no conteúdo de β -tubulina. Com relação à atividade mitótica, só foi detectada divisão celular nos meristemas e na protoderme dos embriões de *Acer platanoides* após a protrusão da radícula.

A divisão celular e a expansão celular são freqüentemente considerados os dois processos de interesse nas análises de crescimento. O índice de divisão celular tem sido demonstrado ser regulado independentemente da taxa de expansão do tecido em alguns casos (Jacobs, 1997). Quando o índice de divisão celular foi reduzido por mutações ou por tratamento químico, não teve efeito aparente na expansão do tecido ou no formato das folhas. Em contraste, uma

regulação sincronizada de divisão e expansão tem sido observada em outros casos.

A expansão da radícula é um processo dirigido pelo turgor, requerendo que as paredes celulares das células do eixo embrionário, que estão entre a ponta da radícula e a base do hipocótilo, cedam. De acordo com Bewley (1997), existem três possibilidades para o crescimento da radícula. A primeira é que tardiamente durante a germinação o potencial osmótico (ψ_{π}) das células do embrião torna-se mais negativo devido ao acúmulo de solutos e, assim, permite que o embrião penetre o endosperma, promovendo a protrusão da radícula. A segunda possibilidade é que há um aumento na extensibilidade das paredes celulares das células da radícula, em resposta ao aumento do potencial de pressão interno. Expansinas, xiloglucanos e endotransglucosilase (XET) têm sido sugeridas como enzimas envolvidas no afrouxamento das paredes celulares do embrião, permitindo expansão celular (Cosgrove, 1999). Em sementes de *Brassica napus*, apenas o aumento no potencial de pressão e extensão das paredes celulares do embrião são pré-requisitos para que ocorra a protrusão radicular (Schopfer & Plachy, 1985).

A terceira possibilidade prevê o amolecimento do tecido que envolve o embrião, permitindo o crescimento da radícula. Em sementes que possuem uma barreira ao crescimento da radícula imposta pelas estruturas que envolvem o embrião, o potencial de pressão (ψ_p) no embrião e o turgor são insuficientes para controlar a expansão das paredes celulares. Neste caso o amolecimento dos tecidos que envolvem o embrião pela ação de hidrolases específicas é necessário para a diminuição da resistência mecânica imposta pelas estruturas que envolvem o embrião. Em sementes de tomate apenas o amolecimento do endosperma à frente da radícula é suficiente para que ocorra a protrusão da radícula (Groot & Karssen, 1987). A ocorrência do amolecimento do endosperma foi verificada por meio da quantificação da força requerida para o

embrião penetrar o endosperma em sementes de tomate (Toorop et al., 2000). Neste caso, a redução da força necessária para a penetração coincide com a atividade de endo- β -mananase na região do endosperma localizada em frente à radícula, chamada de endosperma micropilar (Toorop et al., 2000).

Em sementes de café (*Coffea arabica*), o crescimento do embrião é controlado pelo aumento no potencial de pressão nas células do embrião e pela extensão das paredes celulares (Silva et al., 2004). Concomitante com o crescimento do embrião existe um declínio da força requerida para sua penetração no endosperma, coincidindo com o aumento na atividade de endo- β -mananase e da porosidade nas paredes celulares na região do endosperma “cap” (Silva et al., 2004). Esses resultados confirmam que, em sementes de café, além do crescimento do embrião, há degradação das paredes celulares do endosperma, com a finalidade de facilitar a protrusão da radícula (Silva et al., 2004).

Em sementes de cenoura (*Daucus carota L.*), o embrião não completa seu desenvolvimento antes da dessecação e a semente de cenoura é dispersa da planta mãe aparentemente madura. Embora diferentes tecidos, tais como, epiderme e procâmbio estejam formados e os cotilédones e o eixo embrionário sejam distinguíveis, o embrião é muito pequeno, comparado com o tamanho da semente na maturidade (Homrichhausen et al., 2003). O pequeno embrião da semente de cenoura, localizado na região micropilar, alonga dentro do endosperma lateral durante a embebição e atinge cerca de dois terços do comprimento da semente antes da protrusão (Homrichhausen et al., 2003).

É plausível que, em sementes de cenoura, a endo- β -mananase esteja envolvida com a degradação do endosperma, pois manana é o principal carboidrato de reserva nas sementes das *Umbelliferae* (Van der Toorn, 1989). O embrião imaturo de sementes de cenoura é localizado na região micropilar no início da embebição e alonga dentro do endosperma lateral nos estágios finais da embriogênese. Isto ocorre concomitantemente com o aumento de corrosão na

cavidade embrionária, a qual presume-se ser causada por degradação enzimática do endosperma, uma vez que os padrões espaciais e temporais de expressão do mRNA *DcMANI* e da atividade de endo- β -mananase é consistente com o padrão de aumento da corrosão da cavidade embrionária e do desenvolvimento do embrião de sementes embebidas. Assim, endo- β -mananase seria apropriada para ser associada com o programa de desenvolvimento do embrião em sementes de cenoura.

Diferentes enzimas têm sido clonadas durante a germinação de sementes de tomate (Bradford et al., 2000). Em sementes de café, Silva et al. (2002) clonaram endo- β -mananase e β -manosidase durante a germinação. Essas enzimas atuam na região do endosperma “cap”, com a finalidade de promover o amolecimento do endosperma e assim, facilitar a protrusão da radícula. Portanto, enzimas que podem estar presentes na região do endosperma micropilar de *A. crassiflora* durante a germinação podem ter a função de degradar o endosperma, para facilitar a protrusão da radícula, da mesma forma que ocorre em sementes de tomate e café (da Silva et al., 2002; Toorop et al., 2000).

Com relação à germinação de sementes de *A. crassiflora*, apenas o trabalho do Rizzini (1973) foi encontrado na literatura. Neste trabalho, a germinação foi definida como emergência da plântula em condições de campo, sendo que germinação *stricto sensu* não foi estudada em detalhes. Segundo Rizzini (1973), durante a germinação de sementes de *A. crassiflora* o hipocótilo é a primeira estrutura a emergir do solo, caracterizando germinação epígea. A germinação é extremamente lenta, necessitando, em condições de campo, de 240 a 260 dias para que 50% da população de sementes apresentem emergência da plântula. Portanto, ainda são desconhecidos os eventos iniciais que ocorrem durante a germinação de sementes de *A. crassiflora*, bem como os processos fisiológicos e moleculares envolvidos com a superação da dormência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem das sementes

A coleta dos frutos ocorreu no dia 01/04/2004 na localidade de Palmital do Servo, município de Lavras, a trinta e três quilômetros do campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Segundo a classificação de Köppen, a região tem o clima Cwb, ou seja, mesotérmico com verões brandos e suaves e estiagem no inverno. A fisionomia da vegetação no local de coleta é cerrado *sensu stricto*. Foram coletados apenas frutos maduros que já haviam sido dispersos da planta mãe.

3.2 Beneficiamento das sementes.

Os frutos foram despulpados em uma betoneira por aproximadamente duas horas, tendo sido adicionado um pouco de água à massa para facilitar a despolpa. Em seguida, as sementes foram trilhadas em peneiras, sendo limpas e catadas manualmente. As sementes foram levadas para o laboratório de Sementes Florestais da UFLA e secas sobre a bancada durante dez dias, até a estabilização da umidade. Foram eliminadas as sementes que apresentavam sinais visíveis de predação e, ou, trincas no tegumento.

3.3 Determinação do grau de umidade da semente

Para a determinação do grau de umidade das sementes, foram utilizadas três repetições de quatro sementes cada. O procedimento foi em estufa com circulação de ar (103°C durante 17h), de acordo com ISTA (1993). Foram anotados os pesos úmidos e as amostras foram levadas à estufa (FANEM 320-

SE, Brasil). Após 17 horas, as amostras foram retiradas da estufa, esfriadas em dessecador contendo sílica-gel e pesadas novamente em uma balança (MICRONAL B-360, Brasil). A umidade foi obtida pela média das três repetições e foi calculada pela diferença de peso, em base úmida, pela fórmula:

$$U = \frac{(PU - PS)}{PU - T} \times 100$$

U = umidade das sementes (%)

PU = peso úmido das sementes (g)

PS = peso seco das sementes mais a tara (g)

T = tara - peso do recipiente (g)

3.4 Curva de embebição

Para a elaboração da curva de embebição foram utilizadas apenas sementes intactas tratadas com solução de hipoclorito de sódio 1%, durante 10 minutos, em temperatura ambiente e lavadas em água corrente. As sementes foram colocadas em germinadores tipo Mangelsdorfii regulados a temperatura de 25°C, tendo como substrato três folhas de papel germitest (ELO's CEL-065, Brasil) embebidas em água destilada. Foram embebidas 50 sementes e o peso fresco de cada uma foi medido diariamente até a estabilização do peso.

3.5 Germinação no campo

As sementes foram para o campo no dia 06/04/2004, em um canteiro previamente preparado no Viveiro Florestal do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal da Lavras (DCF-UFLA). O intuito foi imitar as condições naturais de temperatura encontradas após a dispersão dos frutos. Foram usadas apenas sementes intactas tratadas com solução de hipoclorito de

sódio a 1% durante 10 minutos em temperatura ambiente e lavadas em água corrente. Quatro repetições de duzentos e cinquenta sementes, individualizadas em rede plástica (malha de 0,5 cm) foram enterradas, lado a lado, a uma profundidade de 3-5 cm. O substrato utilizado no canteiro foi composto de seis partes de terra de barranco, duas de esterco e uma parte de palha de arroz carbonizada. O canteiro foi irrigado em dias alternados, não deixando que o mesmo ficasse seco. Mensalmente, as sementes foram desenterradas e computadas aquelas que apresentaram protrusão da radícula e retiradas do canteiro. O teste teve a duração de 240 dias e o resultado foi expresso em porcentagem média de sementes germinadas.

3.6 Ganho de peso fresco dos embriões

Para determinar o ganho de peso fresco do embrião durante a germinação no campo, foram utilizadas sementes colocadas para germinar, seguindo a mesma metodologia adotada no item 4.6. Três repetições de dez embriões cada foram utilizadas para determinar o ganho de peso fresco. Os embriões foram mensalmente isolados dos endospermas com o uso de um bisturi e pesadas em balança de precisão (BEL Engineering, China). O ganho de peso dos embriões foram obtidos pela média das três repetições e expressos em valores absolutos.

3.7 Determinação do crescimento do embrião

Para determinar o crescimento do embrião durante a germinação, foram utilizadas sementes colocadas para germinar em canteiro do viveiro florestal da UFLA, seguindo a mesma metodologia adotada no item 4.6. Mensalmente as sementes foram coletadas e três repetições de cinco embriões intactos foram

isoladas do endosperma com um bisturi, imersas em solução fixativa Karnovisk's modificado (glutaraldeído 25%, formaldeído 10% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2), pH 7,2 e armazenadas em câmara fria a 10°C até o uso. Os embriões foram lavados em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10 min), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora e subsequentemente desidratados em uma série ascendente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100 % por três vezes). A desidratação final foi feita em um aparelho de ponto crítico (BAL-TEC CPD 030). Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, com a ajuda de uma fita de carbono de dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro em um aparelho de Sputter (BAL-TEC SCD 050) e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP.

Imagens foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, para cada amostra, nas condições de trabalho de 20Kv e distância de trabalho de 9mm. A observação dos embriões intactos foi realizada no laboratório de Microscopia de Precisão do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP-UFLA).

3.8 Registro fotográfico

Foram utilizadas sementes colocadas para germinar em canteiro do viveiro florestal da UFLA, seguindo a mesma metodologia adotada no item 4.6. As sementes foram cortadas longitudinalmente, sem danificar o embrião, de forma que o mesmo ficasse bem visível e distinto do endosperma. As imagens das sementes foram feitas mensalmente utilizado-se um microscópio estereoscópico (modelo Leica MZ 75); com uma câmera digital acoplada (Cânon Power Shot S40, 4.0M pixels) pertencente ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos do Departamento de Fitopatologia da UFLA-MG.

3.9 Quantificação da atividade de endo- β -mananase

Foi investigada a atividade de endo- β -mananase no endosperma das sementes de *A. crassiflora* durante os meses que seguiram a superação da dormência e germinação no campo. As sementes foram bipartidas em endosperma micropilar, onde se encontra a região micropilar, e em endosperma lateral, o restante do endosperma (Figura 1), e a

atividade foi medida em cada parte separadamente.

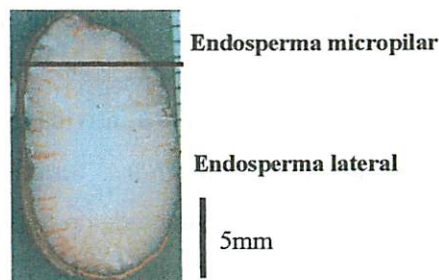


FIGURA 1 Endosperma micropilar e endosperma lateral.

Foram utilizadas sementes obtidas durante a germinação no campo, de acordo com o item 4.6. A quantificação foi realizada no endosperma. Foram amostradas quinze sementes e os endospermas separados em cap e lateral e armazenados em “deep freezer” a -80°C . A extração da enzima endo- β -mananase foi feita com tampão de McIlvaine (0,05 M ácido cítrico/0,1 M Na_2HPO_4 , pH 5.0) com 0,5M NaCl. Para quantificar a atividade da enzima, 2 μl do extrato foi aplicado em furos feitos no gel (0,75 mm de espessura contendo 0,5% (p/v) de “locust bean gum (Sigma) em tampão de McIlvaine (pH 5.0) e 0,8% de agarose do tipo III-A (Sigma) sobre um “gelbond film” (Pharmacia). Após a aplicação dos extratos o gel foi incubado 21h a 25°C , e então lavado com o tampão de McIlvaine (pH 5.0) por 30min, colorido com Vermelho Congo (Sigma) 0,5% (p/v) por 30min, lavado em etanol 90% por 15min, e revelado em NaCl 1M por 5min. Todos os passos da coloração e revelação foram feitos sobre uma mesa agitadora. Endo- β -mananase comercial de *Aspergillus niger*

(Megazyme) foi utilizado para gerar a curva padrão. Os cálculos foram feitos de acordo com Downie et al. (1994).

3.10 Localização da atividade de endo- β -mananase

Para localizar a atividade de endo- β -mananase no endosperma de sementes de *A. crassiflora*, foram utilizadas sementes embebidas seguindo a mesma metodologia adotada no item 4.6. Estas tiveram o endosperma cortado ao meio longitudinalmente, com o uso de um bisturi, sendo os embriões descartados e uma das metades do endosperma colocada em contato com o gel, anteriormente descrito no item 4.10, com a parte cortada em contato com o gel. As sementes permaneceram em contato com o gel durante 20min à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi colorido e revelado como descrito no item 4.10.

4 RESULTADOS

4.1 Embebição

As sementes de *A. crassiflora*, embebidas em água destilada, absorveram água logo após o contato da semente com o substrato úmido. A fase I da embebição teve início logo que as sementes foram colocadas em contato com a água e, durante sete dias, as sementes ganharam peso em água (Figura 2). Após o sétimo dia de embebição, o peso das sementes se estabilizou e as mesmas entraram na fase II da embebição.

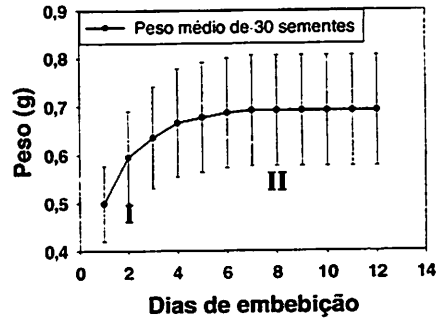


FIGURA 2. Curva de embebição de sementes *A. crassiflora* mostrando as fases I e II da embebição.

4.2 Germinação

O início da germinação de sementes de *A. crassiflora* ocorreu após 150 dias do início do experimento de germinação em condições de campo. A germinação das sementes iniciou-se em setembro de 2004, onde se observou porcentagem de germinação em torno de 1%. No mês de outubro foi observada a maior porcentagem de germinação (31,25%), e no mês de novembro a porcentagem de germinação caiu para 6,5%. No mês de dezembro a germinação foi bastante reduzida (0,125%) (Figuras 3 e 4). Do início da germinação, no mês de setembro, até o mês de dezembro, onde praticamente não houve germinação, a porcentagem total de germinação foi de aproximadamente 39% (Figura 3).

Portanto, estes resultados confirmam observações anteriores feitas por Rizzini, (1973) de que as sementes de *A. crassiflora* apresentam germinação lenta, necessitando de 240 a 260 dias em condições de campo para que 50% da população de sementes germine.

Foi observado que o tegumento da semente se rompe naturalmente antes da germinação, sendo este um marcador morfológico da germinação das sementes. No período entre o rompimento do tegumento e a germinação da semente há a formação de uma protuberância no endosperma cap, indicando que teve início do crescimento do embrião.

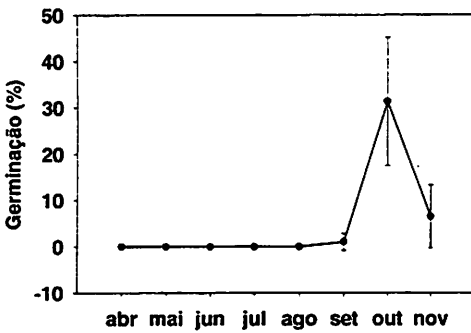


FIGURA 3. Porcentagem de germinação referente a cada mês do ciclo de germinação das sementes de *A. crassiflora*, em condições de campo.

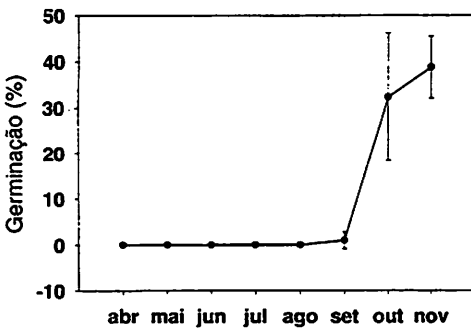


FIGURA 4. Curva de germinação de sementes de *A. crassiflora*, em condições de campo.

4.3 Crescimento do embrião

O embrião de uma semente de *A. crassiflora*, no momento da dispersão do fruto, possui todas as suas estruturas já formadas, sendo possível identificar os cotilédones e o eixo embrionário (Figura 5). Porém, o embrião é muito pequeno (~1,8mm), quando comparado com o comprimento da semente (~17,00mm). Durante a germinação em condições de campo o comprimento do embrião permaneceu inalterado de abril a setembro, ou seja, 150 dias no campo. Apenas a partir de outubro o embrião apresentou crescimento significativo (Figura 6), o que coincidiu com o início da germinação das sementes em condições de campo (Figura 4). O embrião no interior da semente cresceu de aproximadamente 1,8mm de comprimento, para aproximadamente 6,0mm antes da protrusão da radícula (Figura 6), caracterizando assim um aumento de 3,3 vezes (330%) do início das mudanças morfológicas até o final germinação. Embora haja variação entre sementes, o embrião atingiu um terço do comprimento da semente antes da protrusão da radícula (Figuras 6 e 10D).

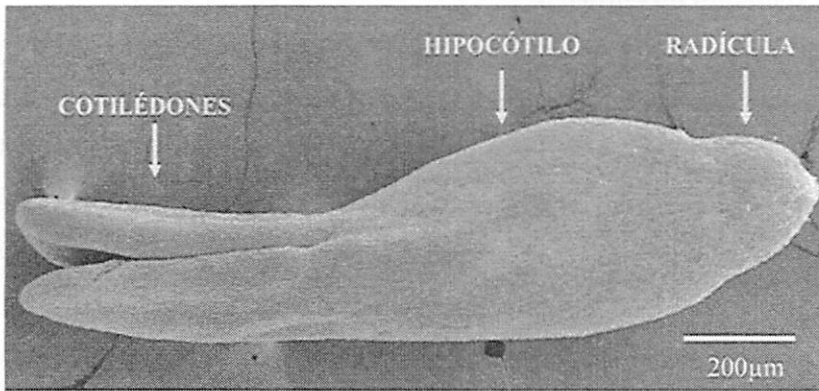


FIGURA 5. Foto de um embrião, no momento da dispersão da semente, gerada em microscopia eletrônica de varredura, mostrando a radícula, hipocótilo e cotilédones.

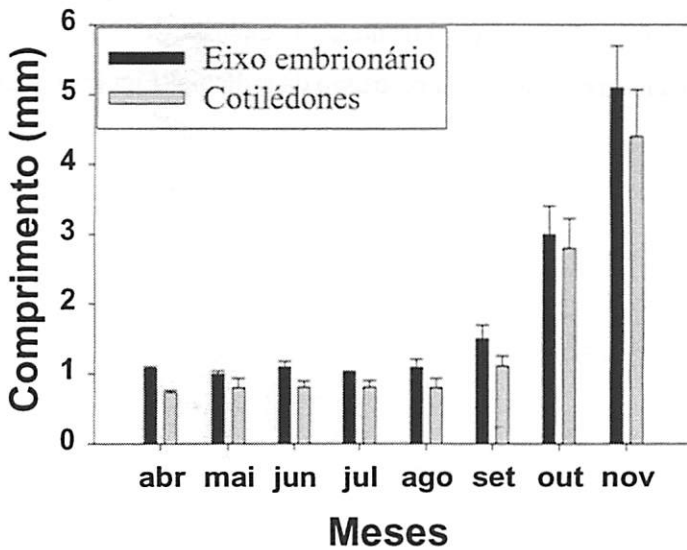


FIGURA 6. Comprimento do embrião de sementes de *A. crassiflora* desde a dispersão, em abril, até novembro de 2004. $P < 0,05$.

4.4 Ganho de peso fresco do embrião

Concomitantemente com o crescimento do embrião, houve também ganho de peso fresco no embrião durante a germinação no campo. O peso fresco do embrião permaneceu inalterado desde a dispersão, em abril, até agosto. Em setembro teve início o ganho do peso fresco dos embriões (Figura 7). No momento da dispersão dos frutos, o embrião, no interior de cada semente, pesou em média 0,0005g e no início da germinação, em setembro, os embriões pesaram em média 0,0035g, ou seja, um aumento de sete vezes no peso fresco.

Os embriões continuaram a ganhar peso fresco no interior da semente e as sementes que se encontravam com a radícula próxima a protrusão, em outubro, pesaram em média 0,0075g. O ganho de peso fresco médio de cada embrião no interior da semente antes da protrusão da radícula foi de aproximadamente 15 vezes. Após a germinação o peso médio de cada embrião foi de 0,022g (Figura 7).

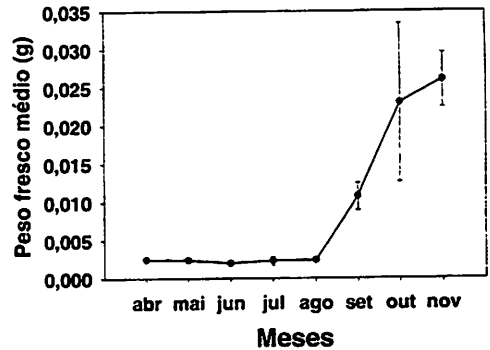


FIGURA 7. Ganho de peso fresco do embrião de sementes de *A. crassiflora* durante os meses de germinação no campo. $P < 0,05$.

4.5 Quantificação da atividade de endo- β -mananase

A atividade de endo- β -mananase somente foi detectável em setembro, tanto no endosperma micropilar quanto no endosperma lateral. Em setembro, antes da protrusão da radícula, a atividade de endo- β -mananase foi superior no

endosperma micropilar do que no endosperma lateral (Figura 8). Em outubro a atividade foi praticamente igual nas duas regiões do endosperma. Nas sementes germinadas, em novembro, a atividade foi superior no endosperma lateral do que no endosperma micropilar (Figura 8).

Assim, a atividade da enzima é crescente a partir de setembro, tanto no endosperma micropilar quanto no endosperma lateral. Todavia, o início da atividade da endo- β -mananase no endosperma micropilar em setembro, coincidiu com o início do crescimento e ganho de peso fresco do embrião. Já a atividade no endosperma lateral foi superior a atividade do endosperma micropilar somente após a protrusão radicular em novembro (Figura 8).

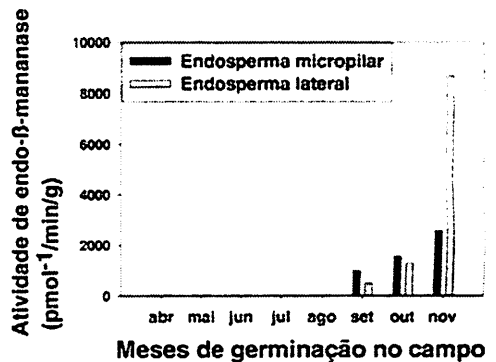


FIGURA 8. Atividade de endo- β -mananase no endosperma micropilar e lateral de sementes de *A. crassiflora* durante a germinação no campo. $P < 0,05$.

4.6 Localização da atividade da endo- β -mananase

A técnica de impressão de tecido “tissue printing” foi usada para localizar a atividade da endo- β -mananase no endosperma de sementes de *A. crassiflora* durante a germinação no campo. Ambas as partes do endosperma apresentaram atividade de endo- β -mananase, antes da protrusão da radícula, mas a atividade no endosperma micropilar, ao redor do embrião iniciou-se antes (Figura 9B). A atividade da endo- β -mananase observada ao redor da cavidade embrionária no mês de setembro coincidiu com crescimento e ganho de peso

fresco do embrião antes da protrusão da radícula. A atividade foi também observada no endosperma lateral (Figura 9C e 9D), coincidindo com o rompimento do tegumento da semente e com a germinação. Além disso, observou-se que o tegumento da semente se rompe naturalmente antes da germinação, sendo este um marcador morfológico da germinação das sementes. No período, entre o rompimento do tegumento e a germinação da semente, há a formação de uma protuberância no endosperma em frente à radícula do embrião, causada pelo crescimento do embrião (Figura 9E).

4.7 Registro fotográfico

Foi registrado o crescimento do embrião no interior do endosperma, antes da germinação da semente (Figura 10). De abril até agosto, os embriões de todas as sementes permaneceram inalterados e ocupavam uma pequena fração da semente (Figura 10A e 10B). Em setembro, teve início o crescimento do embrião, que passou a ser mais facilmente visualizado dentro do endosperma (Figura 10C). O embrião cresceu no interior da semente e, no mês de outubro, as sementes, que estavam próximas a germinar apresentaram um embrião desenvolvido com um terço do comprimento do endosperma. (Figura 10D).

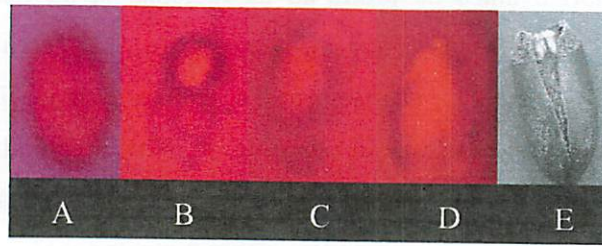


FIGURA 9 Localização da atividade da endo- β -mananase, usando "tissue printing". A) ausência de atividade B) início da atividade ao redor da cavidade embrionária no mês de setembro – C) atividade crescente no endosperma micropilar e endosperma lateral – D) Atividade presente em todo o endosperma – E) Semente com o tegumento rompido.

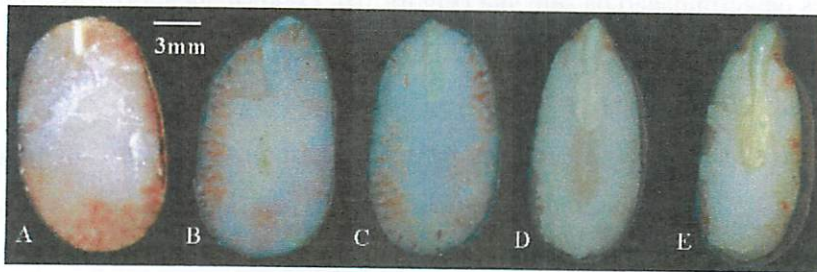


FIGURA 10 Crescimento do embrião. A) semente de *A. crassiflora* na dispersão em abril – B) semente em agosto – C) semente em setembro – D) semente em outubro – E) semente recém germinada, em novembro.

5 DISCUSSÃO

Os dados de temperatura média diária foram obtidos na estação meteorológica da UFLA e, a partir destes, foram calculadas as temperaturas médias mensais máximas, mínimas e médias. Os dados de precipitação diária também foram obtidos pela mesma estação e, a partir deste, foi calculada a precipitação acumulada de cada mês.

Os resultados obtidos foram coerentes com a classificação de Köppen para a região de Lavras, ou seja: Cwb - mesotérmico com verões brandos e suaves e estiagem no inverno (Figura 1 do anexo).

A precipitação total do ano de 2003 foi de 1267,1mm, dos quais 121,8mm - equivalente a 9,61% do total - ocorreu durante a estação seca, de abril à setembro e o restante, 1.145,3mm - equivalente a 90,39% do total - ocorreu na estação chuvosa, de outubro a março. O ano de 2004 teve precipitação total de 1488,8mm, dos quais 213mm - equivalente a 14,30% do total - ocorreu durante a estação seca e o restante, 1275,8mm - equivalente a 85,70% do total - ocorreu na estação chuvosa (Figura 1 do anexo).

As temperaturas médias máximas, médias e mínimas também oscilaram ao longo do ano, com as temperaturas mais baixas, ocorrendo entre os meses de abril e agosto, coincidindo com a estação seca, e as mais altas entre setembro e março durante a estação chuvosa. A temperatura média das máximas, no ano de 2004, foi de 27,1^oC, a média das médias de 20,3^oC e a média das mínimas de 15,5^oC. A variação entre a média das máximas e das mínimas foi de 11,6^oC, sendo que durante a estação seca esta variação foi de 12,7^oC e na estação chuvosa foi de 10,5^oC (Figura 2 do anexo).

De acordo com Rizzini, (1973), a germinação de sementes de *A. crassiflora* é extremamente lenta, necessitando, em condições de campo, de 240 a 260 dias para que 50% da população de sementes apresentem emergência de

plântula. Todavia, as sementes de *A. crassiflora* foram capazes de embeber água logo após o contato com o substrato úmido e atingiram a fase II da curva padrão de embebição a partir do sétimo dia. Este resultado mostra que as sementes não possuem restrição à entrada de água, eliminando assim a hipótese de que sementes de *A. crassiflora* apresentavam dormência devido à impermeabilidade do tegumento. Por possuir dormência, em condições de laboratório não foi possível observar a fase III de embebição. Em condições de campo, provavelmente a fase III inicie por volta de 180 e 210 dias, quando ocorre o início da germinação (protrusão da radícula).

Segundo Rizzini (1973), o embrião da semente de *A. crassiflora*, no momento da dispersão, é uma massa de células não diferenciada com 2mm de comprimento, hialino e de formato cilíndrico e que não se encontra completamente desenvolvido, necessitando terminar o seu desenvolvimento após a dispersão para em seguida, a semente germine. Porém, neste trabalho foi observado que o embrião de *A. crassiflora* já se encontra visivelmente diferenciado, sendo possível identificar o hipocótilo e os cotilédones (Figura 5). Todavia, crescimento significativo do embrião só ocorreu a partir do mês de outubro.

De acordo com Rizzini (1973), no bioma cerrado, as sementes de *A. crassiflora* são dispersas ao final da estação chuvosa (fevereiro e março). As sementes germinam apenas após 240-260 dias da dispersão, ou seja, no início da primavera. Neste trabalho foi observado o mesmo comportamento quanto à germinação das sementes de *A. crassiflora*. Portanto, as sementes permaneceram embebidas e dormentes no solo durante os meses de abril, maio, junho, julho e agosto. Durante estes meses, não foram observadas alterações morfológicas no embrião, como por exemplo, crescimento ou aumento no peso. No endosperma não foi observado a atividade de endo- β -mananase ou rachadura no tegumento, que indicaria a preparação para germinação da semente .

Todavia, a partir do mês de setembro houve coincidência entre o início das alterações morfológicas no embrião e bioquímicas no endosperma com o início da germinação das sementes. Estas modificações coincidiram com o início do aumento na temperatura e precipitação, ou seja, o final da estação de inverno (agosto) e início da primavera (setembro). O início da germinação foi no mês de setembro, 1%, porém, o pico de germinação ocorreu em outubro, 31,25%, sendo que as últimas sementes germinaram em novembro, 6,5% (Figura 3). O pico de germinação, no mês de outubro, pode indicar que a espécie apresenta uma estratégia que permite que as sementes germinadas em outubro tenham condições de se estabelecer como plantas no solo, utilizando-se dos seis meses seguintes de estação chuvosa e altas temperaturas que ocorre no bioma cerrado.

Parte da população de sementes, cerca de 20%, permaneceram aparentemente em estado de dormência, sem que sofram alterações morfológicas, durante o período em que estiveram embebidas. Este comportamento indica que a espécie pode contribuir para a formação de banco permanente de sementes no solo.

O início da atividade de endo- β -mananase no endosperma coincidiu com o início das mudanças morfológicas, que ocorreram no embrião antes da germinação. A atividade de endo- β -mananase teve início ao redor da cavidade embrionária e se espalhou por todo o endosperma. Desta forma, pode-se correlacionar a atividade inicial da endo- β -mananase no endosperma micropilar com o crescimento do embrião. Aparentemente, a atividade de endo- β -mananase, observada inicialmente no endosperma micropilar, tem a função de dar suporte ao crescimento do embrião, por meio da degradação do endosperma. A cavidade embrionária aumenta concomitantemente com o crescimento do embrião. A cavidade em que o embrião cresceu, aumentou à medida que as camadas de tecido no endosperma ao redor do embrião foram degradadas.

Portanto, em *A. crassiflora* a função de endo- β -mananase no endosperma micropilar é diferente daquela observada para tomate (Toorop *et al.* 2000) e café (da Silva *et al.*, 2004). Para tomate e café a atividade inicial de endo- β -mananase no endosperma cap tem a função de amolecer o endosperma para facilitar a protrusão radicular, e é claramente visualizada apenas no endosperma cap é, só depois da germinação, foi observada atividade ao redor do embrião para fornecer reservas para o estabelecimento da plântula.

Assim, o processo de dormência é o resultado de uma adaptação alcançada através da evolução das espécies e que impede a germinação até que se instalem condições ambientais próprias, não apenas para a germinação, mas também para o crescimento da nova planta. No mês de setembro houve aumento das temperaturas médias diárias máximas, mínimas e médias. O mês de setembro foi também o último mês da estação seca do ano de 2004, assim denominado pela classificação de Köppen para a região.

Baskin & Baskin (1998), baseados no trabalho de Rizzini (1973), sugeriram que as semente de *A. crassiflora* apresentam dormência morfológica, ou seja, na dispersão da semente o embrião de *A. crassiflora* não se encontra totalmente diferenciado necessitando de um período após a dispersão para que o embrião cresça e a germinação ocorra. Baskin & Baskin (1998) afirmam que dormência morfológica pode ser superada pela incubação das sementes em condições apropriadas de temperatura e umidade, para que ocorra o crescimento do embrião.

Desta forma, para superar a germinação de sementes de *A. crassiflora*, as mesmas foram colocadas para embeber água nas temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C, já que estas temperaturas ocorrem no mês de setembro, quando as sementes iniciam a germinação. Todavia, durante este experimento não foi observado crescimento do embrião e nem germinação de sementes de *A. crassiflora* (dados não mostrados). Isso indica que sementes de *A. crassiflora*

não apresentam apenas dormência morfológica, sendo possível a ocorrência de dormência fisiológica; caracterizando-se um tipo de dormência chamada de morfofisiológica (Baskin & Baskin, 1998). A superação da dormência morfológica, ou seja, o crescimento do embrião dentro da semente antes da germinação, se dá na presença de substrato úmido e temperaturas adequadas para o crescimento do embrião; e que no caso da *A. crassiflora* não há exigência de luz, pois as sementes permaneceram enterradas no solo e mesmo assim germinaram.

A possibilidade de ocorrência também de dormência fisiológica tem suporte no fato que as sementes permaneceram dormentes no solo, durante os meses de inverno, em que as temperaturas mínimas observadas nos anos de 2003 e 2004 foram ao redor de 10°C. Durante esses meses as sementes não apresentaram alterações morfológicas no embrião nem degradação do endosperma. Aparentemente, as sementes de *A. crassiflora* precisam de um período de aproximadamente três meses de temperaturas baixas, ao redor de 10°C, para que a dormência fisiológica seja superada, e, somente a partir daí, iniciarem o crescimento do embrião e superarem a dormência morfológica. Realmente, o crescimento do embrião ocorreu apenas a partir de outubro. O fato de parte da população de sementes permanecerem dormentes no solo (20%), mesmo estando embebidas e sob condições de temperatura adequadas, também suporta a afirmação de que em sementes de *A. crassiflora*, aliada à dormência morfológica, pode haver também dormência fisiológica. Sementes de *A. crassiflora* precisam de um período de estratificação a frio, a 10°C, de 3-4 meses, para superação da dormência fisiológica, e um período de estratificação a quente, de 30 a 35°C, de 30 dias, para que a dormência morfológica seja superada (crescimento do embrião).

6 CONCLUSÕES

1. As sementes de *A. crassiflora* não possuem restrição à entrada de água e atingem a fase II da embebição após sete dias de contato com o substrato úmido;

2. As sementes permanecem dormentes durante o outono e inverno;

3. As sementes da *A. crassiflora* apresentam o embrião totalmente diferenciado no momento da dispersão, podendo ser identificados os cotilédones e o eixo embrionário;

4. O embrião da *A. crassiflora* necessita retomar o crescer, aumentando três vezes seu comprimento e 15 vezes seu peso antes da protrusão da radícula;

5. O crescimento do embrião da *A. crassiflora* é consequência do crescimento do eixo embrionário e dos cotilédones;

6. A degradação do endosperma da *A. crassiflora*, pela endo- β -mananase, atua principalmente na nutrição do embrião, sendo que a atividade da enzima no endosperma micropilar coincide com o início do crescimento e ganho de peso do embrião e a atividade presente em todo o endosperma lateral coincide com o início da germinação da semente;

7. Sementes de *A. crassiflora* apresentam dormência morfofisiológica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. **Frutos do cerrado: preservação gera muitos frutos.** 2000.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Ecology, Biogeography, and evolution of dormancy and germination.** San Diego: Academic Press, 1988. 666 p.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, July 1997.

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

BRADFORD, K. J.; CHEN, F.; COOLEY, M. B.; DAHAL, P.; DOWNIE, B.; FUKUNAGA, K. K.; GEE, O. H.; GURUSINGHE, S.; MELLA, R. A.; NONOGAKI, H.; WU, C-T.; YIM K. O. Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In: BLACK, M. ; BRADFORD, K. J.; VAZQUEZ-RAMOS, J. (Ed.). **Seed biology: advances and applications.** Wallingford, UK: CAB International, 2000. p. 231-251.

CARVALHO, J. A. **Marolo: o doce sabor do cerrado; sugestões de cultivo.** Editora Folha machadense, 2002.

COSGROVE, D. J. Enzymes and others agents that enhance cell wall extensibility. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 391-417, 1999.

COSTA NETO, F. **Subsídios técnicos para um plano de manejo sustentado em áreas de cerrado.** 1990. 142 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

DA SILVA, E. A. A. **Coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation.** 2000. Thesis (Ph.D) - Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

CASTRO, R. D. de, VAN LAMMEREN, A. A. M.; GROOT, S. P. C.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. M. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 2, p. 327-335, Feb. 2000.

DOWNIE B.; HILHORST H. W. M.; BEWLEY J. D. A new assay for quantifying endo- β -mannanase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 829-835, July 1994.

ESAU, KATHERINE. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo. USP, 1974. 293p.

GOLDBERG, R. B.; PAIVA, G. de, YADEGARI, R. Plant embryogenesis: Zygote to seed. **Science**, Washington, v. 266, n. 5185, p. 605-614, Oct. 1994.

GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: A study with gibberellin-deficient mutants. **Planta**, Berlin, v. 171, n. 4, p. 525-531, Aug. 1987.

HEIJDEN, E.; BOUMAN, F. Studies in Annonaceae. X Seed Anatomy of the Annona group. **Botanish Jahrbucher fur Systematik**, Leipzig, v. 110, 117-135, 1988.

HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. **Seed Science Research**, Wallington, v. 5, n. 1, p. 51-73, Mar. 1995.

HOMRICHHAUSEN, T. M.; HEWITT, J. R.; NONOGAKI, H. Endo- β -mannanase activity is associated with the completion of embriogenesis in imbebed carrot (*Daucus carota* L.) seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 3, p. 219-227, Sept. 2003.

JACOBS, T. Why do plant cells divide? **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1021-1029, July 1997.

KERMODE, A. R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 9, n. 2, p. 155-195, 1990.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1998.

MAYER, U.; TORRES R. R. A.; BEELETH, T.; MISERA, S.; JÜRGENS, G. Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. **Nature**, London, v. 353, n. 6343, p. 402-407, Oct. 1991.

NIKOLAEVA, M. G. Factors controlling the seed dormancy pattern. In: KHAN, A. A. (Ed.). **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. North-Holland, Amsterdam, 1977. p. 51-74.

NIKOLAEVA, M. G. **Physiology of deep dormancy in seeds**. Leningrad: Izdatel'stvo Nauka, 1969. (Translated from Russian by Z. Shapiro, NSF, Washington, DC.)

OHAD, N.; MARGOSSIAN, L.; HSU, Y. C.; WILLIAMS, C.; REPETTI, P. AND FISCHER, R. L. A mutation that allows endosperm development without fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5319-5324, May 1996.

PAWLOWSKI, T. A.; BERGERVOET, J. H. W.; BINO, R. J.; GROOT S. P. C. Cell cycle activity and β -tubulin accumulation during dormancy breaking of *Acer platanoides* L. Seeds. **Biologia Plantarum**, Dodrecht, v. 48, n. 2, p. 211-218, 2004.

RAZ, V.; BERGERVOET, J. H. W.; KOORNNEEF, M. Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. **Development** Cambirdge, v. 128, n. 2, p. 243-252, Jan. 2001.

RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. de; SCALOPPI JUNIOR, E. J.; FONSECA, C. E. L. da. **Araticum (*Annona crassiflora* Mart.)** Jaboticabal – SP – Embrapa Cerrados, 2000. 52 p.

RIZZINI, C. T. Dormancy in seeds of *Annona crassiflora* Mart. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 24, n. 78, p. 117-123, 1973.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C. Control of seed germination by abscisic acid. III. Effect on embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility in *Brassica napus* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 77, n. 3, p. 676-686, 1985.

SILVA, E. A. A. da; TOOROP, P. E.; VAN AESLT A. C.; HILHORST, H. W. M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening durig coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 251-261, Dec. 2004.

TOOROP, P. E.; VAN AELST, A. C.; HILHORST, H. W. M. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon*

esculentum) seed germination is under control of ABA. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 51, n. 349, p. 1371-1379, Aug. 2000.

Van der TOORN, P. **Embryo growth in mature celery seeds**. 1989. Thesis (Ph.D.) - Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

ANEXOS

Lista de Figuras

FIGURA 1A. Precipitação acumulada mensal do ano de 2003 e 2004.....	44
FIGURA 2A. Médias das temperaturas máxima, mínima e média do ano de 2004 em Lavras – MG.....	44

Lista de Tabelas

TABELA 1A - Resumo da ANAVA, para o crescimento do embrião, durante a germinação no campo de sementes de <i>A. crassiflora</i>	45
TABELA 2A – Resumo da ANAVA, para o crescimento do eixo embrionário, durante a germinação no campo de sementes de <i>A. crassiflora</i>	46
TABELA 3A – Resumo da ANAVA, para o crescimento dos cotilédones, durante a germinação no campo de sementes de <i>A. crassiflora</i>	47
TABELA 4A – Resumo da ANAVA, para o ganho de peso fresco do embrião dentro das sementes de <i>A. crassiflora</i> , durante a germinação no campo.	48
TABELA 5A – Resumo da ANAVA, para a atividade de endo- β -mananase no endosperma cap, durante a germinação no campo de sementes de <i>A. crassiflora</i>	49
TABELA 6A – Resumo da ANAVA, para a atividade de endo- β -mananase no endosperma lateral, durante a germinação no campo de sementes de <i>A. crassiflora</i>	50

Precipitação mensal acumulada

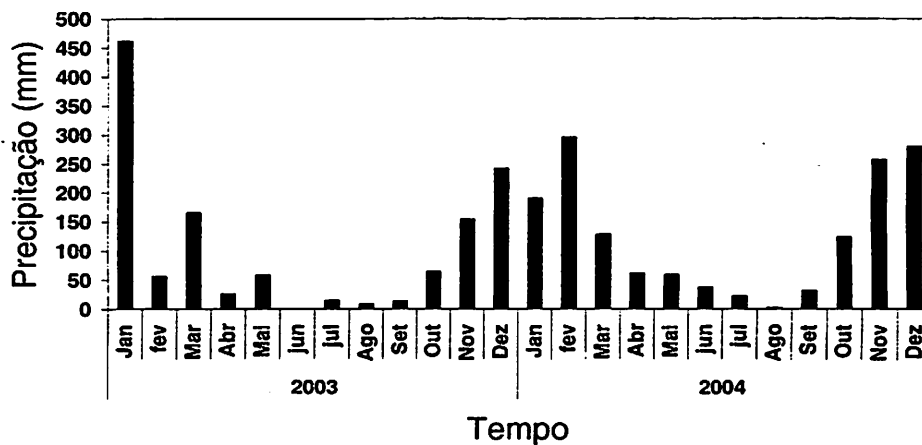


FIGURA 1A. Precipitação acumulada mensal do ano de 2003 e 2004.

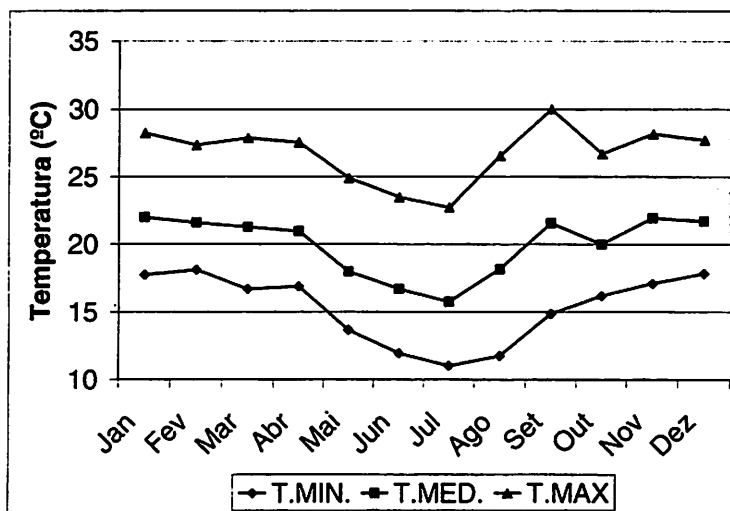


FIGURA 2A. Médias das temperaturas máxima, mínima e média do ano de 2004 em Lavras - MG.

TABELA 1A - Resumo da ANAVA, para o crescimento do embrião, durante a germinação no campo de sementes de *A. crassiflora*.

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

MÒS 7 336.320099 48.045728 163.909 0.0000

erro 40 11.724969 0.293124

CV (%) = 16.44

Teste de Tukey para a FV MÒS

abr a1

mai a1

jun a1

jul a1

ago a1

set a1

out a2

nov a3

TABELA 2A – Resumo da ANAVA, para o crescimento do eixo embrionário, durante a germinação no campo de sementes de *A. crassiflora*.

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

MÒS 7 90.540543 12.934363 177.427 0.0000
erro 40 2.915983 0.072900

CV (%) = 15.05

Teste de Tukey para a FV MÒS

abr a1
mai a1
jun a1
jul a1
ago a1
set a1
out a2
nov a3

TABELA 3A – Resumo da ANAVA, para o crescimento dos cotilédones, durante a germinação no campo de sementes de *A. crassiflora*.

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

MOS 7 77.525266 11.075038 124.812 0.0000

erro 40 3.549351 0.088734

CV (%) = 19.94

Teste de Tukey para a FV MÔS

Erro padrão: 0,121609881154635

abr a1
mai a1
jun a1
jul a1
ago a1
set a1
out a2
nov a3

TABELA 4A – Resumo da ANAVA, para o ganho de peso fresco do embrião dentro das sementes de *A. crassiflora*, durante a germinação no campo.

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

MÒS 7 0.002200 0.000314 15.086 0.0000

erro 16 0.000333 0.000021

CV (%) = 68.47

Teste de Tukey para a FV MÒS

Erro padrão: 0,00263523138347365

abr a1

mai a1

jun a1

jul a1

ago a1

set a1 a2

out a2 a3

nov a3

TABELA 5A – Resumo da ANOVA, para a atividade de endo- β -mananase no endosperma cap, durante a germinação no campo de sementes de *A. crassiflora*.

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

TRATAMENTO 7 851.833333 121.690476 486.762 0.0000
 erro 16 4.000000 0.250000

Total corrigido 23 855.833333

CV (%) = 10.91

Teste de Tukey para a FV TRATAMENTO

DMS: 1,41381544985327 NMS: 0,05

Erro padrão: 0,288675134594813

abr a1
 mai a1
 jun a1
 jul a1
 ago a1
 set a2
 out a3
 nov a3

TABELA 6A – Resumo da ANAVA, para a atividade de endo- β -mananase no endosperma lateral, durante a germinação no campo de sementes de *A. crassiflora*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	978.000000	139.714286	1676.571	0.0000
erro	16	1.333333	0.083333		

CV (%) = 6.19

Teste de Tukey para a FV TRAT

NMS: 0,05

Erro padrão: 0,166666666666667

abr	a1
mai	a1
jun	a1
jul	a1
ago	a1
set	a2
out	a3
nov	a4
