



FABRÍCIO PALLA TEIXEIRA

DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE
Sesbania virgata (Cav.) Pres.

LAVRAS – MG

2016

FABRÍCIO PALLA TEIXEIRA

DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE *Sesbania virgata* (Cav.) Pres.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. José Márcio Rocha Faria

Coorientadores

Prof. Dr. Anderson Cleiton José

Dr^a Olívia Alvina Oliveira Tonetti

Dr^a Heloisa Oliveira dos Santos

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Teixeira, Fabrício Palla.

Desenvolvimento de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pres.
/ Fabrício Palla Teixeira. – Lavras : UFLA, 2016.
59 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): José Marcio Rocha Faria.
Bibliografia.

1. Semente ortodoxa. 2. Dessecação de sementes. 3.
Maturação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

FABRÍCIO PALLA TEIXEIRA

DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE *Sesbania virgata* (Cav.) Pres.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2016

Prof^a Dr^a. Fernanda Carlota Nery UFSJ

Dr. Wilson Vicente Souza Pereira UFLA

Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria
Orientador

Coorientadores
Prof. Dr. Anderson Cleiton José
Dr^a Olívia Alvina Oliveira Tonetti
Dr^a Heloisa Oliveira dos Santos

**LAVRAS-MG
2016**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José M^a. Teixeira e Cláudia M^a. Palla Teixeira, meu irmão Guilherme Palla Teixeira pelo total apoio, carinho e atenção, sendo muito importantes para minha motivação.

A Tainá, pela dedicação, compreensão e companheirismo em todos os momentos.

Aos amigos Victor, Eder e Ronaldo, pela excelente convivência intra e extra domiciliar, proporcionando um ambiente sempre sadio e familiar.

Aos amigos do Laboratório de Sementes Florestais (LSF) pelo constante auxílio nos experimentos, pelos momentos hilários e amizade.

Aos colegas de Departamento Zé Alvim, Erick, Vanessa e Bruno pelos bons momentos de descontração.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Anderson pelos conselhos no desenvolvimento deste trabalho.

À Olívia, técnica do (LSF) pelo auxílio em parte dos experimentos.

Ao Rodrigo, Estudante de iniciação científica do (LSF) pela ajuda com a parte de microscopia.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal pela oportunidade de realização do curso.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitou minha dedicação exclusiva ao curso.

Meu muito obrigado a todos que de alguma forma contribuíram para a conquista de mais essa etapa. Minha profunda gratidão.

RESUMO

A literatura apresenta uma gama de trabalhos que exploram aspectos diversos relacionados com sementes de caráter agrônômico. Entretanto, ainda há uma infinidade de espécies florestais que carecem de informações sobre sua maturação. *Sesbania virgata* é uma espécie da família Fabaceae, e por possuir crescimento rápido e rusticidade, entre outros fatores, é comumente utilizada em programas de reflorestamento, sendo suas mudas produzidas principalmente por sementes. Assim, os estudos relacionados à biologia de sementes dessa espécie são importantes como base para sua propagação e conservação. O presente trabalho abordou aspectos morfológicos, fisiológicos e moleculares da aquisição da tolerância à dessecação em sementes de *S. virgata* durante o processo de maturação. Após a marcação de flores em campo, foram coletados frutos em diferentes estádios de maturação para a caracterização da aquisição da tolerância à dessecação, envolvendo caracterização física de frutos e sementes, microscopia, estudos histoquímicos, e perfil eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor. As sementes atingem o máximo de massa fresca aos 44 dias após a antese (DAA). Aos 85 DAA, as sementes estão completamente maduras, possuindo em média 6,3% de conteúdo de água. Também foi possível observar deposição de lignina nos tegumentos ao final da maturação e acúmulo de proteína. A tolerância à dessecação foi evidenciada aos 44 DAA, no entanto, a obtenção de plântulas normais após a secagem só foi possível a partir de 75 DAA. Nos estádios iniciais não foi possível observar acúmulo de proteínas totais e resistentes ao calor, entretanto, a partir de 32 DAA iniciou-se a formação de proteínas totais e resistentes, permanecendo constantes em abundância até o fim da maturação. Estes resultados permitiram caracterizar o desenvolvimento e a aquisição de tolerância à dessecação em sementes de *S. virgata*.

Palavras-chave: Semente ortodoxa. Dessecação de sementes. Maturação.

ABSTRACT

There are large amount of studies exploring diverse aspects related with agronomic seeds, however there is a lack of information about the forest seeds. *Sesbania virgata* is a tree species from the Fabaceae family and, due to its fast development and rusticity, among other factors, is normally used on reforestation programs, being the seedlings produced mostly from seeds. Thus, studies related to *S. virgata* seed biology are important as background for its propagation and conservation. This study addressed the morphological, physiological and molecular aspects of the desiccation tolerance acquisition on *S. virgata* seeds during the maturation process. After marking flowers on field, were collected fruits on different maturation stages for the desiccation tolerance acquisition tests, involving the physical characterization of fruits and seeds, microscopy, histochemical studies and the electrophoretic profile of total and heat resistant proteins. The seeds reached the highest fresh mass at 44 days after the anthesis (DAA). At 85 DAA, seeds are completely mature, with an average of 6.3% of water content. It was also possible to observe the lignin deposition at the end of the maturation and protein accumulation. The desiccation tolerance was observed at 44 DAA, however, only was observed normal seedlings formation after 75 DAA. In the firsts stages was not observed protein accumulation, but after 32 DAA was initiated the synthesis of both total and heat resistant proteins, being constant in its abundance until the end of the maturation. These results allowed to characterize the seed development and the desiccation tolerance of *S. virgata*.

Keywords: Orthodox seed. Desiccation seeds. Maturation.

SUMÁRIO

1	INTRUDUÇÃO.....	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1	Caracterização da espécie.....	10
2.2	Desenvolvimento de sementes.....	11
2.3	Tolerância à dessecação.....	12
2.4	Aquisição da tolerância à dessecação.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	Caracterização do desenvolvimento de frutos e sementes.....	19
3.2	Caracterização estrutural do tegumento.....	20
3.3	Histoquímica.....	20
3.4	Aquisição da tolerância à dessecação.....	21
3.5	Perfil eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor...	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1	Caracterização do desenvolvimento de frutos e sementes.....	23
4.2	Caracterização estrutural do tegumento.....	30
4.3	Histoquímica.....	33
4.4	Aquisição da tolerância à dessecação.....	36
4.5	Perfil eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor...	40
5	CONCLUSÕES.....	45
6	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

São vários os estudos relacionados à morfologia de sementes de espécies agronômicas, como soja, milho, arroz e trigo (MARCOS FILHO, 1979; MARCOS FILHO, 1980; FANCELLI; DOURADO-NETO, 1997; FONSCECA et al., 2007; FONSCECA et al., 2015; HAMADA, 2000;). Entretanto, muitas espécies florestais nativas ainda não possuem a caracterização do desenvolvimento de suas sementes. Para Beltrati (1984), a identificação de espécies presentes no banco de sementes do solo pode contribuir para a melhor compreensão da regeneração e sucessão vegetal nos ecossistemas. Os conhecimentos dos aspectos morfológicos são necessários para as análises de identificação e certificação da qualidade das sementes (OLIVEIRA; PEREIRA, 1984).

O desenvolvimento de sementes ortodoxas pode ser dividido em três estádios: embriogênese; deposição de reservas e a dessecação. O desenvolvimento compreende uma série ordenada de alterações fisiológicas e morfológicas, sendo controladas geneticamente. Estas modificações proporcionam um rápido crescimento de estruturas internas, havendo ainda, adaptações fisiológicas que em alguns casos culminam com a indução do embrião à dormência. Na fase de dessecação, há a ação de mecanismos de proteção e reparo, preservando a integridade dos compostos celulares, evitando danos irreversíveis, mantendo as sementes sadias até o momento da dispersão (BEWLEY et al., 2013).

As sementes podem ser classificadas em relação à tolerância à dessecação (TD) e ao armazenamento em dois grupos distintos, ortodoxas e recalcitrantes (ROBERT, 1973). A TD pode ser definida como a capacidade

celular de um organismo de tolerar a perda de água a níveis extremos, sem que haja danos irreversíveis às células, por meio de redução metabólica, e na presença de água, retornar suas funções normais (BUITINK; LEPRINCE, 2008).

Tunnacliffe e Wise (2007) afirmam que as espécies apresentam variações no grau de TD. Isso ocorre devido às diferenças que ocorrem na estrutura física de suas matrizes internas, que envolvem interações de ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e proteínas que são produzidas durante a maturação, sendo associadas a diversas macromoléculas, impedindo a desnaturação (BERJAK; PAMMENTER, 2008). Proteínas resistentes ao calor têm sido relatadas em estudos, relacionadas à proteção contra danos causados por estresses. Entre as classes destas proteínas, destacam-se as Late Embryogenesis Abundant (LEA) (FARRANT; MOORE, 2011). O estudo do desenvolvimento de sementes pode contribuir para a compreensão de seu processo de maturação, conhecendo suas possíveis alterações metabólicas e estratégias de sobrevivência.

Diante do exposto, objetivou-se estudar os aspectos morfológicos, fisiológicos, moleculares e a aquisição de tolerância à dessecação durante a maturação de sementes de *Sesbania virgata*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da espécie

Sesbania virgata pertence à família Fabaceae, subfamília *Faboideae*. O gênero *Sesbania* é constituído por cerca de 500 espécies, com ocorrência nos trópicos e subtropicais (SHUGUANG et al., 2009). Ocorrem em diferentes ambientes como planícies, zonas úmidas e semiáridas (SHARMA et al., 2005). As espécies apresentam hábito herbáceo, arbustivo e arbóreos (árvores de pequeno e médio porte).

O gênero *Sesbania* é caracterizado por possuir espécies tolerantes a solos pobres com alto índice de metais pesados, e elevado nível de adaptabilidade quando submetidas a estresses bióticos e abióticos (YANG et al., 2003; SAHI et al., 2007). Há espécies de sesbania com o potencial para a utilização no consórcio com cultura anuais, como o arroz irrigado, por tolerar ambientes muito úmidos e pela capacidade de fixar grandes quantidades de N₂ atmosférico (JAMES et al., 2001; CUMMINGS et al., 2009).

Sesbania virgata é popularmente conhecida pelos nomes sesbania, feijãozinho, sarazinho e mãe-José. Segundo Araújo et al., (2004), é um arbusto que chega a alcançar 6 metros de altura, com 25 cm de DAP e sua copa pode medir até 5 metros de diâmetro. Possui ciclo de vida curto, de 8 a 9 anos, capaz de competir com gramíneas, se desenvolvendo naturalmente em terrenos úmidos, bem adaptada a áreas alagáveis, podendo ser encontrada em margens de rios, lagos e represas, predominantemente em solos argilosos e arenosos. *Sesbania virgata* possui um rápido crescimento e rusticidade, apresenta potencial para plantios visando a recuperação de áreas degradadas e matas

ciliares (DELARMELINA et al., 2014), (CHAVE et al., 2003), além de trazer benefícios físicos para o solo com a alta ramificação de seu sistema radicular, prevenindo assim a erosão (ZANANDREA et al., 2009).

Santos et al. (1997) relatam a espécie como ocorrendo naturalmente no Brasil, entretanto, a maior ocorrência do gênero se dá no continente africano.

No Brasil, distribui-se pelas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, apresentando intensa floração desuniforme em um mesmo indivíduo (POTT; POTT, 1994). Habita marcadamente matas de galerias em regiões tropicais e, segundo Potomati e Buckeridge (2002), associa-se com estágios iniciais de sucessão ecológica. A espécie ainda possui boa rebrota da cepa após corte ou incidência de fogo. Coutinho (2005) relata o significativo papel ecológico da espécie de apresentar simbiose radicular com rizóbio e de proporcionar boa disponibilidade de sementes.

2.2 Desenvolvimento de sementes

As sementes são estruturas dispersas pela planta-mãe e em muitas espécies florestais as sementes não só desempenham papel propagativo, mas também como reservatório genético, quando as mesmas são armazenadas, preservando as características de sua espécie.

A embriogênese, o acúmulo de reservas, como carboidratos, lipídios e proteínas, e posteriormente a secagem durante a maturação, são os estágios típicos no desenvolvimento de sementes ortodoxas. O desenvolvimento das sementes está ligado a uma série ordenada de alterações bioquímicas, fisiológicas, físicas e morfológicas, sendo estas modificações, controladas

geneticamente ocorrendo após a fecundação do óvulo até o instante em que as sementes se desligam da planta.

A formação da semente inicia com divisões mitóticas, seguidas de diferenciação. Posteriormente, segue-se a fase de expansão celular e acúmulo de reservas. No desenvolvimento, há significativas adaptações fisiológicas que em alguns casos pode induzir o embrião à dormência, incluindo o acúmulo de ácido abscísico (ABA) prevenindo a germinação precoce. Neste momento, os eventos da maturação requerem a expressão coordenada de inúmeros genes em resposta ao ABA. À medida que a semente vai dessecando, há a ativação de mecanismos de proteção e reparo, preservando a integridade dos compostos celulares, evitando danos irreversíveis, mantendo as sementes sadias até o momento da dispersão (BEWLEY et al., 2013).

2.3 Tolerância à dessecação (TD)

TD é a capacidade celular de um organismo de tolerar a perda de água a níveis críticos, por meio de redução metabólica, sem que haja danos irreversíveis às células. Quando novamente na presença de água, retomam suas funções normais (BUTINK; LEPRINCE, 2008).

Roberts (1973) classifica as sementes em dois grupos em resposta à secagem e ao armazenamento. As sementes recalcitrantes possuem elevado grau de umidade no momento da dispersão, não tolerando a dessecação e, sobrevivem por curtos períodos. Outra característica marcante é sua sensibilidade a baixas temperaturas, não podendo, geralmente serem armazenadas abaixo de 15° C (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Tolerando níveis que podem chegar a 5% de seu conteúdo de água, as sementes classificadas como ortodoxas permanecem viáveis por longos períodos de armazenamento, em temperaturas subzero. Estas sementes possuem capacidade de sobrevivência em ambientes com pouca ou nenhuma disponibilidade de água (HOEKSTRA; GOLOVIN; BUITINK, 2001). No final da fase de maturação, sementes ortodoxas dependem do processo de dessecação para direcionar suas rotas metabólicas para a germinação (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998).

Ellis et al. (1990) descreveram ainda uma terceira categoria de sementes, as “intermediárias”. Estas sementes, após a dispersão, são relativamente tolerantes à dessecação. Entretanto, não acompanham o comportamento das ortodoxas com relação à água, ou seja, não suportam a remoção de água a níveis tão baixos. Geralmente espécies intermediárias suportam o armazenamento por períodos médios e são frequentemente sensíveis ao frio.

A TD é uma habilidade que pode ser encontrada em bactérias, fungos, protozoários, nematóides, rotíferos e tardígrados (ALPERT, 2006). Dentro do reino vegetal, é comum em algas, briófitas e estruturas reprodutivas das plantas superiores como grãos de pólen e sementes (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000). Para estes organismos, a TD é uma característica crucial para sua sobrevivência, sendo a TD uma evolução da sensibilidade, onde a necessidade de tolerar condições desfavoráveis (falta de água) foi sendo superada com a adaptação destes organismos (TWEDDLE et al., 2003).

Após a dispersão, as sementes ortodoxas permanecem no solo até haver disponibilidade de água e de condições para a germinação. Havendo condições favoráveis para a germinação, a semente inicia o processo de embebição assim, sendo capaz de manter a TD por um período determinado do tempo, variando de

espécie para espécie. Se neste período a água se tornar escassa novamente, a semente volta a secar, retornando ao seu estágio original sem que ocorram danos irreversíveis (FARIA et al., 2005). Todavia, com a continuidade ao processo de embebição, a TD é perdida gradualmente, em ritmo que também varia de espécie para espécie, no tempo de embebição e entre diferentes partes da semente (KOSTER et al., 2003; REN e TAO, 2003). Em espécies tolerantes à dessecação, há variações no grau de TD, devido as diferenças que ocorrem na estrutura física de suas matrizes internas, que envolvem interações de proteínas e açúcares com ácidos orgânicos, sais e aminoácidos. (TUNNACLIFFE; WISE, 2007). Geralmente a TD está associada com o processo de dormência, principalmente a dormência física (TWEDDLE et al., 2003).

2.4 Aquisição da tolerância à dessecação

Em sementes ortodoxas, durante o desenvolvimento, ocorre o processo de aquisição da tolerância à dessecação, promovendo às células adaptações sem haver dano decorrente da secagem, devido a complexos ajustes e interações metabólicas. Para Kermode e Finch-Savage (2002), o processo de secagem pode ser desencadeado inicialmente com a perda de água em decorrência da evaporação superficial da semente, seguida por um processo metabolicamente intenso. Desta forma, a perda do conteúdo de água faz com que a semente diminua seu metabolismo gradativamente, chegando muito próximo à inativação, mantendo a semente quiescente em ambientes secos até o momento onde ocorra sua hidratação (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

Os compostos de reserva assumem papel importante neste processo. Para Obendorf (1997), os carboidratos solúveis estão intimamente ligados à

tolerância à dessecação. Estes carboidratos se encontram em tecidos vivos como embriões e cotilédones, se apresentando como monossacarídeos e dissacarídeos, destacando-se a sacarose, e os oligossacarídeos, como rafinose, estaquiose e verbascose, atuando no citosol, mantendo a integridade celular, estabilizando as membranas e outras moléculas (KIGEL; GALILI, 1999).

Na fase de dessecação das sementes, açúcares específicos podem auxiliar na prevenção dos efeitos danosos da secagem nas membranas celulares, dando origem a ligações de hidrogênio, ligando-as com os fosfolipídios da membrana, mantendo o espaçamento dos grupos lipídicos, impedindo a transição da fase líquida cristalina para a fase gel (PAMMENTER; BERJAK, 1999). Também há outro mecanismo onde os açúcares podem evitar os danos às células durante e após a dessecação, onde há a formação de vidro intracelular, com aspecto viscoso, não permitindo a formação de cristais mesmo em temperaturas muito baixas, sendo instáveis em uma ampla faixa de temperatura (KOSTER, 1991). Assim, sem formação intracelular de cristais de gelo, o risco de ruptura das membranas cai, possibilitando armazenar estas sementes em temperaturas baixas onde não sofreriam injúrias irreversíveis.

Pode ocorrer ainda uma interação entre os açúcares e proteínas, levando a evitar a mudança de sua conformação e função (LEPRINCE et al., 1993). Essas proteínas são produzidas durante a secagem, sendo associadas a diversas macromoléculas, impedindo a desnaturação de outras proteínas (BERJAK; PAMMENTER, 2008). As proteínas resistentes ao calor têm sido relacionadas à proteção contra danos causados por estresses. Entre as classes destas proteínas, destacam-se as Late Embryogenesis Abundant (LEA) (FARRANT; MOORE, 2011).

Farrant; Berjak e Pammenter (1992) e Wechsberg; Bray e Probert (1994) constataram modificações qualitativas e quantitativas nas proteínas LEA, conforme o estágio de maturação e o grau e duração do estresse hídrico em sementes de *Avicennia marina* e *Ranunculus sceleratus* L., respectivamente. Estas proteínas se acumulam nas fases finais do desenvolvimento da semente e têm sido relacionadas com a aquisição de tolerância à dessecação em sementes de diferentes espécies. As características físicas de resistência à desnaturação dessas proteínas, juntamente com seu padrão de acúmulo e ocorrência abundância, são atributos que indicam sua ligação com a tolerância à dessecação, agindo como protetoras dos componentes celulares no estado seco, ajustando o equilíbrio osmótico (HAN et al., 1997). As proteínas LEA podem se ligar a íons e água, podendo ainda estar associada aos açúcares, equilibrando a perda de água e mantendo, assim, a viabilidade das sementes ortodoxas (MENTER; BERJAK; WALTERS, 2000).

Estudos apontam a importância das proteínas LEA, devido ao fato destas atuarem como chaperonas, que são moléculas que auxiliam na montagem ou na manutenção de estruturas moleculares, evitando que haja interações errôneas (HAND et al., 2011).

Outro grupo de proteínas relacionadas à tolerância à dessecação, são as proteínas de choque térmico (*heat shock protein* – HSP), também da classe das chaperonas, sendo definidas como proteínas celulares que mediam o enovelamento correto de outras proteínas. Elas recebem esse nome por serem sintetizadas em grande quantidade quando a célula é submetida a altas temperaturas (> 42°C) e situações de estresse metabólico, quando a maioria das proteínas celulares são desnaturadas (FREITAS, 2012).

Durante a dessecação, pode ocorrer um acúmulo de espécies reativas de oxigênio e radicais livres nas células (NTULI et al., 2011). Estes radicais são danosos à integridade celular, induzindo a oxidação e despolimerização de ácidos nucleicos, a desnaturação de proteínas e a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática (KRANNER et al., 2010). Como tentativa de reduzir esses danos, há a síntese de enzimas como a redutase da glutatona, superóxido dismutase, catalase e peroxidase, as quais são especializadas na remoção de espécies reativas de oxigênio (PUKACKA; RATAJCZAK, 2006). A ausência ou ineficácia de mecanismos contra espécies reativas de oxigênio pode ser um dos fatores que levam algumas sementes a não tolerarem a dessecação.

Para Asada (1992), as peroxidases são as grandes responsáveis pela remoção do peróxido de hidrogênio, que pode ser extremamente danoso às células, dando origem ao radical hidroxila OH^\cdot , acarretando em injúrias aos ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e membranas celulares. Estudos comprovam a eficiência destas enzimas, Tang (2000) trabalhando com sementes de *Pinus taeda*, verificou que um maior conteúdo de peroxidase no estado tolerante quando comparado com o estado intolerante à dessecação, sugerindo um importante papel dessa enzima como mecanismo de proteção.

Um dos fatores determinantes para a tolerância à dessecação é a manutenção da integridade do DNA. O estresse decorrente da restrição de água leva o material genético à degradação, o que pode acarretar na morte celular. Para Fukuda (2000), a manutenção da integridade do DNA proporciona uma regulação de auto destruição celular, sendo observado pela sequência de ativação de enzimas com a função de destruir macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios.

A aquisição de tolerância à dessecação envolve uma gama de interações de ajustes estruturais e metabólicos, proporcionando às células tolerância a altos níveis de desidratação sem, contudo prejudica-las de forma acentuada. Ela também está associada à capacidade de manutenção da integridade das estruturas celulares, e alguns marcadores ultraestruturais têm sido relacionados com a sensibilidade a tolerância à dessecação (BERJAK; PAMMENTER, 2000).

Muitos são os processos que garantem a tolerância à dessecação, levando a proteção contra os efeitos da perda de água no interior das células. O funcionamento desses processos determina o nível de sensibilidade à perda de água. Os principais efeitos da desidratação nas estruturas das células, são danos às membranas e descolamento destas da parede celular, dobramento da parede, condensação da cromatina, justaposição das mitocôndrias e cloroplastos e degradação de organelas devido à ineficiência de sistemas antioxidantes. Assim sendo, as mitocôndrias são as principais organelas que sofrem danos relativos à desidratação, devido muito provavelmente à presença de espécies reativas de oxigênio (WANG et al., 2012).

Em sementes em desenvolvimento, os tecidos embrionários apresentam atividade metabólica elevada, devido à histodiferenciação, juntamente com a divisão celular e taxa respiratória intensa, ainda não sendo perfeitamente estruturadas, e é nesse momento que ocorre a expansão celular, acompanhada da vacuolização. Com a dessecação, a semente lança como resposta à desidratação, alternativas como a desdiferenciação de organelas, alterações no citoesqueleto e conformação de moléculas como o DNA, redução do metabolismo e aumento da vacuolização. Situações de estresse podem induzir a vacuolização promovendo a remoção de organelas danificadas ou redundantes e outros materiais da matriz celular. (HARA-NISHIMURA; HATSUGAI, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de *S. virgata* foram coletados entre dezembro de 2014 e abril de 2015, em um trecho de mata ciliar inserido em área com interferência antrópica, no campus da Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras, MG.

3.1 Caracterização do desenvolvimento de frutos e sementes

Dezesseis matrizes foram selecionadas para o experimento, as quais tiveram suas flores marcadas com fitas devidamente datadas para aferição da antese, em número suficiente para obtenção de sementes em quantidade compatível com a demanda dos experimentos.

Continuamente, foi sendo feito registro fotográfico a partir da antese, para o acompanhamento do desenvolvimento dos frutos e sementes.

No decorrer do processo de maturação, foram coletados frutos aos 24, 36, 44, 58, 75 e 85 dias após a antese (DAA), tendo sido esses tempos definidos com base em testes pilotos, e descrições feitas por Araújo et al. (2004), definindo-se como estágio final de maturação de frutos e sementes o tempo de 85 DAA. Para a caracterização dos frutos, os aspectos considerados foram: tipo, cor e biometria (comprimento, largura e espessura). Para os experimentos com sementes, o beneficiamento foi manual, retirando-as sementes do interior das vagens por meio de bisturi. Foram avaliados os seguintes parâmetros: cor, dimensões (comprimento, largura e espessura), grau de umidade, massa fresca e massa seca, além de imagens de microscopia das estruturas internas. Comprimento, largura e a espessura foram medidos pelo Sistema de Análise de

Sementes, SAS®, sendo o comprimento medido da base até o ápice, a largura e espessura medidas na linha mediana.

Para quantificação da massa fresca e seca das sementes, logo após a coleta dos frutos, as sementes foram pesadas em balança analítica (0,0001g) para obtenção do peso fresco. Posteriormente foram levadas para estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, e logo após foram novamente pesadas. Foram utilizadas 20 sementes. A umidade foi determinada pelo método de estufa, a $105\pm 3^{\circ}\text{C} / 24\text{h}$, com 4 repetições de 5 sementes (BRASIL, 2009), cortadas ao meio para potencializar a secagem devido a espessura do tegumento. As análises foram realizadas, apresentando suas médias e desvios médios.

3.2 Caracterização estrutural do tegumento

Para identificar possíveis mudanças estruturais no tegumento ao longo da maturação, foram utilizadas sementes coletadas aos 24, 36, 44, 58, 75 e 85 DAA. O material foi fixado em FAA₅₀ (10% de solução de formaldeído 40% + 5% de ácido acético glacial + 50% de álcool etílico v/v) por 48 horas. Posteriormente, realizaram-se os cortes transversais na região oposta ao hilo, à mão livre. Os fragmentos vegetais foram corados com Azul de Toluidina 0,05%. As lâminas foram seladas com Entellan® e visualizadas em microscópio ótico *Olympus BX 51* em aumento de 10, 20 e 40x. As imagens foram digitalizadas por câmera de vídeo acoplada ao microscópio e processadas por computador através do software *Image – Pro-plus 5.1*.

3.3 Histoquímica

Para analisar as proteínas nos diferentes pontos de desenvolvimento, foram utilizadas sementes coletadas aos 24, 36, 44, 58, 75 e 85 DAA. Os cortes foram feitos nos cotilédones e os fragmentos imersos em solução de azul brilhante de Coomassie por 3 minutos, em seguida lavados com ácido acético a 7% por 10 minutos, seguido por uma rápida lavagem em água destilada. Posteriormente, os cortes foram levados ao microscópio *Olympus BX 51* onde as imagens foram capturadas e analisadas com auxílio do software *Image – Pro-plus 5.1*.

3.4 Aquisição da tolerância à dessecação

Com o intuito de caracterizar a aquisição de tolerância à dessecação, frutos colhidos aos 24, 36, 44, 58, 75 e 85 DAA. Testes preliminares baseados na germinação de sementes secas e não secas foram realizados, não sendo observada germinação nos pontos 24 e 36 com ou sem secagem, decidindo-se pelos pontos de estudo em 44, 58, 75 e 85 DAA.

As sementes foram coletadas e divididas em dois grupos, o primeiro consistiu de sementes não secas. No segundo grupo, as sementes foram pesadas e posteriormente secas (com exceção aos 85 DAA) em caixas plásticas contendo aproximadamente 100g de sílica gel. Para este experimento, utilizou-se como referência o protocolo elaborado por Hong e Ellis (1996) atualizado em 2000 com modificações. As sementes foram dispostas uniformemente sobre tela, não havendo contado com a sílica. As caixas foram mantidas em sala de secagem a 20°C, com monitoramento constante do peso das sementes até atingirem

equilíbrio higroscópico (umidade aproximadamente de 7%). As sementes após a secagem foram pré-umidificadas. Os dois grupos de sementes foram escarificadas para superação de dormência física (SILVA et al., 2011) e posteriormente colocadas em germinador à 25°C em rolos de papel contendo 4 repetições de 20 sementes por tratamento.

As variáveis levantadas foram percentagem de germinação raiz primária ≥ 2 mm) e plântulas normais (presença do primeiro par de folhas e raízes secundárias). As leituras ocorreram diariamente até o vigésimo dia de contagem.

O experimento foi montado em esquema fatorial com tratamento adicional (3x2+1), sendo três estádios de desenvolvimento das sementes (44,58 e 75 DAA), na presença e ausência de secagem. O tratamento adicional foi composto por sementes aos 85 DAA, por estarem totalmente maduras, apresentando conteúdo de água desejado. Foi realizada análise de variância dos dados pelo teste F. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.5 Perfil eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor

Para se verificar o perfil proteico das sementes, foram feitas coletas aos 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 58, 63, 75 e 85 DAA. De cada ponto de coleta foi feita a extração de proteínas, em 3 repetições biológicas, utilizando sementes inteiras, num total de 100 mg por repetição. As amostras foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido, que foi em seguida pesado e misturado em 1 mL de tampão de extração (50 mM Tris HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,005 M MgCl₂; 0,001 M PMSF; e 0,1% β -mercaptoetanol). Os microtubos foram centrifugados a 13.200 rpm por 30 min a 4°C, e o sobrenadante recolhido e

separado em duas alíquotas, sendo uma colocada em banho-maria por 15 min a 85 °C.

As amostras aquecidas ou não, foram novamente centrifugadas, conforme descrito anteriormente. O extrato obtido foi quantificado em espectrofotômetro pelo método de Bradford (1976). O volume correspondente a 40 µg de proteína total (determinada com base na alíquota que não foi aquecida) foi misturado em 20 µg de tampão da amostra (2,5 mL glicerol; 0,46 g SDS; 20 mg azul de Bromofenol).

A mistura foi imersa em água fervente por 5 min e aplicadas em gel descontínuo de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). Como padrão, foi utilizado marcador BenchMak™ Protein ladder 10 – 220 KDa. Foi realizada a corrida eletroforética a 150 V por 5 h, logo após os géis foram fixados por 30 minutos em solução de ácido acético mais metanol. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* 0,05% CBB-G250 por 48 h, seguido de descoloração por 30 minutos em solução Tris base 1,2% (p/v) pH 6,5, e posteriormente lavados em água por 3 dias. As imagens dos géis foram feitas utilizando-se escâner Umax (modelo PowerLook 1120).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do desenvolvimento de frutos e sementes

Após a antese, as flores de *S. virgata* permaneceram cerca de 2 dias vigorosas, desidratando-se gradativamente, até perderem completamente suas pétalas entre o 4º e o 6º dias após a antese (DAA), sendo possível, a partir daí, observar o fruto no início de seu desenvolvimento. Os frutos apresentaram cor

verde até atingir os 44 DAA, sendo que, a partir deste ponto, a coloração verde vai escurecendo, chegando à coloração marrom escuro aos 63 DAA, permanecendo até aos 85 DAA (Figura 1 A). A coloração dos frutos, entre outros fatores, auxilia na determinação do ponto ideal de coleta, tornando o trabalho em campo mais rápido e eficiente.

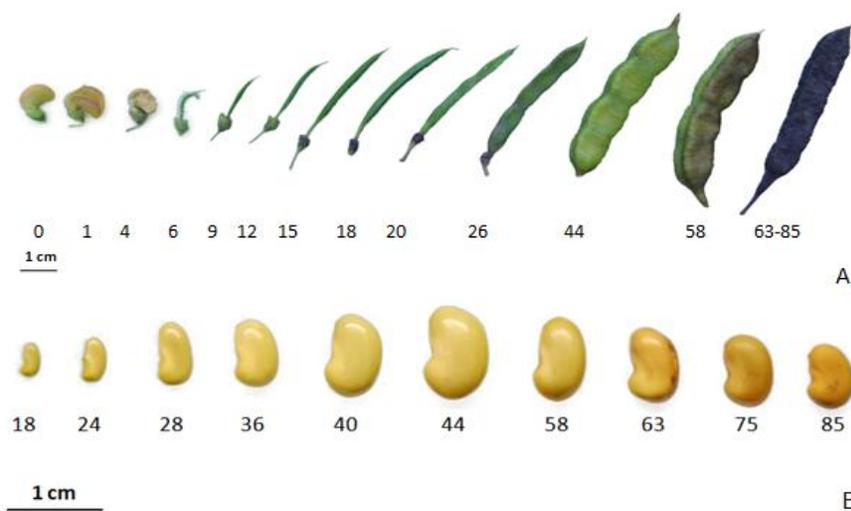


Figura 1 Frutos (A) e sementes (B) de *Sesbania virgata* em diferentes estádios de maturação. Os números indicam dias após a antese (DAA).

Na Figura 2 A, são apresentadas as dimensões dos frutos a partir dos 44 DAA, demonstrando que há pouca variação biométrica quando estes iniciam o processo de secagem, alcançado média de comprimento, largura e espessura de 5,5; 1,0 e 0,9 cm respectivamente. Barroso et al., (1999) ao elaborarem a chave de identificação de gênero da família Fabaceae, com base nos aspectos morfológicos de frutos e sementes, relataram que o gênero *Sesbania* é caracterizado por possuir frutos com mais de três centímetros de comprimento, de acordo com o encontrado no presente trabalho.

Os frutos de *S. virgata* quando maduros são indeiscentes e nucóides, em forma de legume. Araújo et al. (2004) os descrevem como secos, de superfície rugosa, com brusco afinamento na base e na extremidade, que é pontiaguda. O fruto ainda apresenta bordo ondulado, havendo sutura a partir do pedúnculo se estendendo até o ápice. O pedúnculo é lenhoso, o pericarpo é fino, o mesocarpo é branco acinzentado com consistência semelhante à cortiça, e o endocarpo é liso de cor marfim. O número de sementes por fruto varia de um a seis.

Na Figura 1B pode-se observar sementes de *S. virgata* em diferentes estádios de maturação. As sementes apresentam coloração bege/amarelado nos estádios iniciais até atingirem a metade do processo de maturação, e à medida que vão se desenvolvendo, vão ganhando uma tonalidade bege escuro. A semente madura é reniforme, com testa lisa polida, impermeável à água.

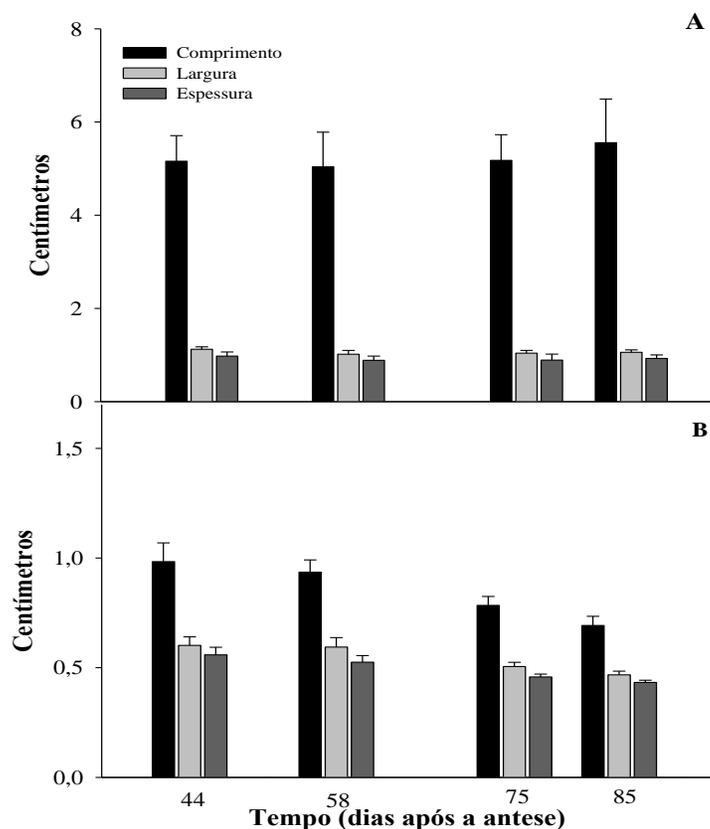


Figura 2 Valores médios das dimensões de frutos (A) e sementes (B) de *Sesbania virgata* em diferentes estádios de maturação a partir do ponto de maturidade fisiológica.

Também foram analisadas as estruturas internas das sementes. Aos 24 DAA, as estruturas internas começam a ser evidenciadas. O endosperma já ocupa uma grande parte do interior das sementes, que se apresenta com um aspecto brilhoso e gelatinoso, devido ao alto nível de umidade em que se encontram as sementes. Também é possível evidenciar os cotilédones, de cor

verde e alongados, com cerca de 2 mm de comprimento. Aos 36 DAA, toda estrutura interna já se tornam visíveis. O hipocótilo torna-se bem pronunciado, unido aos cotilédones, que já apresentam um significativo crescimento em relação ao estágio anterior. Todo embrião é envolvido pelo endosperma.

Sementes atingem seu maior tamanho aos 44 DAA, devido ao máximo ganho de massa seca e acúmulo de água, com os cotilédones ocupando a maior parte do espaço interno das sementes, juntamente com o hipocótilo completamente desenvolvido, ambos envolvidos pelo endosperma. A partir deste estágio, a semente entra na fase de dessecação, onde todas as suas estruturas internas começam a perder água, adquirindo uma coloração amarelada para todo o embrião (Figura 3), sendo evidenciada uma redução nas dimensões das sementes dos 44 aos 85 DAA. Dentro deste intervalo, o comprimento médio das sementes variou de 0,9 para 0,6 cm. A largura e a espessura variaram respectivamente de 0,5 para 0,4 e 0,6 para 0,4 cm (Figura 2B).

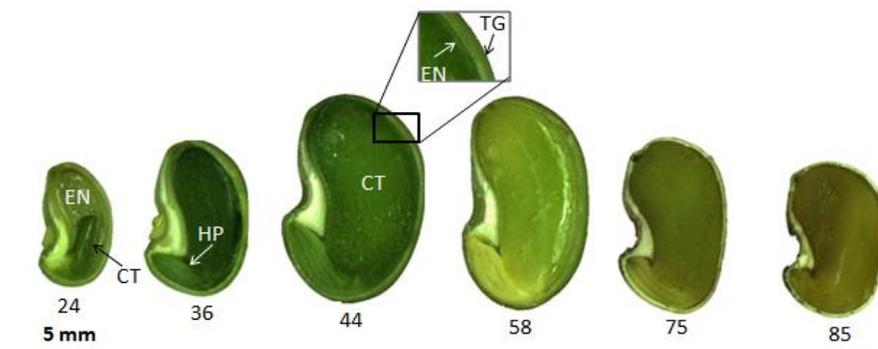


Figura 3 Fotomicrografias de seções de sementes de *Sesbania virgata* em diferentes estádios de maturação. Os números abaixo das sementes representam dias após a antese (DAA). CT = cotilédones; EN = endosperma; HP = hipocótilo; TG = tegumento.

O padrão de desenvolvimento durante a maturação é caracterizado pelo rápido aumento de tamanho das sementes, atingindo um valor máximo que pode coincidir com a metade de seu processo de maturação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). O aumento de tamanho das sementes até a metade da maturação pode estar relacionado com a necessidade que as sementes têm de manter em níveis altos seu conteúdo de água, devido a altas taxas metabólicas, coincidindo com um maior acúmulo de massa fresca.

No início do processo de maturação, as sementes de *S. virgata* se encontravam com um alto conteúdo de água (75,9%), este valor foi decrescendo simultaneamente ao aumento de massa seca, sendo de 0,01g aos 24 DAA, atingindo seu máximo (0,07g) aos 44 DAA, com conteúdo de água de 61,4% (Figura 4). Após os 44 DAA, houve uma intensa redução no conteúdo de água das sementes, juntamente com a massa fresca, atingindo respectivamente 6,29% e 0,08g aos 85 DAA. Já a massa seca permaneceu constante até o fim do processo de dessecação. O alto conteúdo de água nas sementes auxilia nas intensas divisões celulares, assim como na promoção de interações entre hormônios de crescimento (LULSDORF et al., 2013).

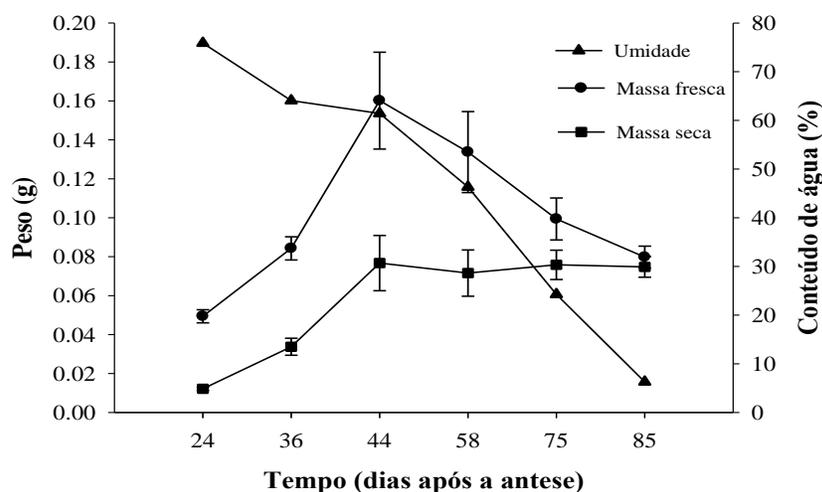


Figura 4 Conteúdo de água, massa fresca e massa seca em sementes de *Sesbania virgata* em diferentes estádios de maturação.

O comportamento das sementes de *S. virgata* durante a maturação seguiu o padrão clássico das ortodoxas, onde a redução do conteúdo de água é contínua, sendo mais acentuada ao final do processo de maturação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Trabalhando com o desenvolvimento morfológico em sementes de *Handroanthus serratifolia* (Vahl) Nich, Carvalho et al., (2008) observaram o mesmo comportamento durante a maturação, com índices iniciais de conteúdo de água de aproximadamente 90% em sementes com 10 DAA, sendo este valor reduzido para cerca de 30% aos 53 DAA.

Alguns autores associado o conteúdo de água e a massa seca a outros fatores das sementes, determinaram o ponto de maturidade fisiológica em espécies florestais como *Anadenanthera macrocarpa* (SOUZA; LIMA, 1985), *Eucalyptus grandis* (AGUIAR et al., 1988), *Dalbergia nigra* (MARTINS; SILVA, 1997), *Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl (GEMAQUE et al., 2002),

Mimosa caesalpinifolia (ALVES et al., 2005), *Handroanthus serratifolia* (Vahl) Nich (CARVALHO et al., 2008), além da herbácea *Lotus japonicus* (DAM et al., 2009).

4.2 Caracterização estrutural do Tegumento

Por meio de cortes transversais na região do tegumento em sementes de *S. virgata*, é possível notar camadas distintas de células compostas inicialmente por cutícula cerosa, linha lúcida, camada de macroesclereídes, composta por uma camada de células paliçádicas e perpendicularmente alongadas à superfície (Figura 5). Kelly et al. (1992) e Miller et al. (1999) Caracterizaram a hipoderme como uma única camada de células em forma de ampulheta denominada de osteoesclereides, onde são separadas por lacunas intercelulares e uma camada de células parenquimáticas com aspecto condensado, como o observado neste trabalho para *S. virgata*.

Durante os estádios de maturação em sementes de *S. virgata*, seu desenvolvimento anatômico foi acompanhado para a descrição de suas alterações morfofisiológicas na região do tegumento. Foi possível observar alterações nos tecidos, em decorrência da reação do corante azul de toluidina, que, por ser metacromático, exibe coloração diferente de acordo com o tecido vegetal com o qual reage. Na presença de parede delgada e parede secundária, apresenta respectivamente tons em azul e vermelho.

Em sementes colhidas aos 24 DAA, é possível evidenciar a camada de macroesclereides (Figura 5A) apresentando inicialmente parede primária. Sementes nos estádios iniciais de maturação, possuem tamanho reduzido, um alto conteúdo de água e baixo valor de massa seca, indicando que intensas

divisões celulares ainda estão ocorrendo. Células recém divididas apresentam em um primeiro momento apenas parede primária, as quais são compostas por celulose (BUCHANAN et al., 2000), o que justifica a observação apenas da coloração azul encontrada em sementes de *S. virgata* neste estágio.

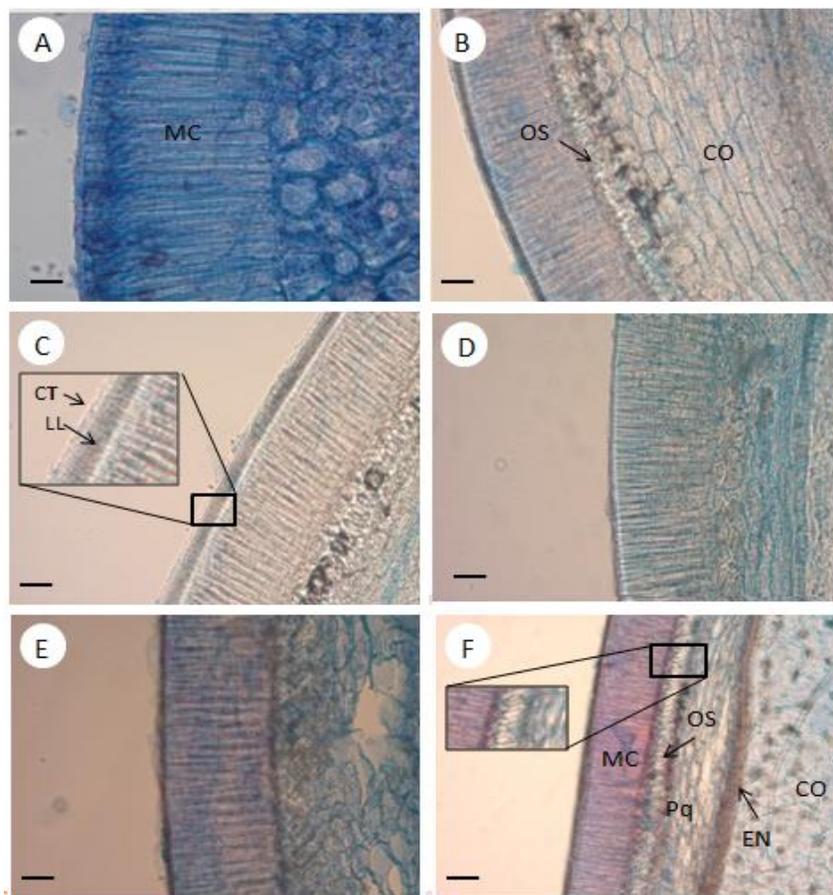


Figura 5 Fotomicrografia de seções transversais de região do tegumento em sementes de *Sesbania virgata* em diferentes estádios de maturação corados com Azul de Toluidina. CT = cutícula; EN = endosperma; LL =

linha lúcida; MC = macroesclereide, OS = osteoesclereide; Pq = parênquima; CO = cotilédone. Barra em preto em A = 10 μm ; B,C,D e E = 20 μm ; F = 50 μm . A = 24; B = 36; C = 44, D = 58, E = 75; F = 85 DAA.

Nos estádios seguintes de desenvolvimento do tegumento, a coloração do tecido vegetal muda drasticamente, adquirindo tons claros em azul, o que pode ser observado até as sementes atingirem seus 58 DAA (Figura 5 B, C e D). Já nos dois últimos estádios de maturação (75 e 85 DAA), a presença de lignina é caracterizada pela cor vermelha, (Figura 5 E e F).

Após a formação da parede primária, inicia-se a formação da parede secundária, as quais são ricas em lignina. Essa deposição torna as paredes celulares mais espessas, acarretando entre outros fatores, no aumento da massa seca das sementes (BUCHANAN et al., 2000). Paralelamente, também é possível observar mais externamente a cutícula e a linha lúcida (Figura 5 C), que juntamente com as demais estruturas, devido à dessecação, vai se tornando mais enrijecida, e gradativamente impermeável, formando uma barreira para a entrada de água nas sementes, até o momento da completa aquisição da dormência.

Sementes de *S. virgata* apresentam dormência física, caracterizada pela impermeabilidade do tegumento (SILVA et al., 2011). Essa dormência certamente está relacionada com a deposição de lignina ao final do processo de maturação, associada com a queda do conteúdo de água, auxiliando no enrijecimento da camada de macroesclereides. Para Kelly; Van Staden; Bell (1992), os componentes que promovem a aquisição da dormência em sementes são tanto de caráter estruturais quanto químicos, estando presentes na camada de macroesclereides (BASKIN et al., 2000), muito frequente em sementes de espécies da família Fabaceae (BASKIN, 1998; BASKIN et al., 2000).

Durante a dessecação, as células reduzem seu tamanho em função da perda de água e os espaços intercelulares entre os osteoesclereides se tornam visíveis (MOLIZANE, 2012). O mesmo autor, ao trabalhar a nível celular com o processo de maturação em sementes de *Erythrina speciosa*, observou aspecto similar dos osteoesclereides. Jayasuriya et al., (2007) ao trabalharem com sementes de *Ipomoea lacunosa* L. observaram espaços pronunciados na região dos osteoesclereides e de células parenquimáticas, em estádios finais de maturação, como consequência da drástica queda nos valores de conteúdo de água, o que também foi observado em sementes de *S. virgata* no presente trabalho (Figura 5 F).

4.3 Histoquímica

Há evidências de grânulos proteicos nos cotilédones de sementes de *S. virgata* ao longo da maturação. Esses grânulos presentes em sementes aos 24 e 36 DAA (Figura 6 A e B) aparecem em quantidade reduzida e dispersos no interior do citoplasma, devido ao alto conteúdo de água nas células. Ao decorrer do processo de maturação, esse acúmulo vai se intensificando até atingir seu máximo, em sementes entre os 44 e 58 DAA (Figura 6 C e D).

Notou-se um ganho de tamanho dos grânulos proteicos, ocupando a maior parte do citoplasma. Essa quantidade de material, entre outros fatores já discutidos, ajudam a explicar o maior ganho de massa seca das sementes. Os diferentes aspectos dos materiais proteicos encontrados em sementes em diferentes estádios de maturação podem estar relacionados com a variação do grau de hidratação destas moléculas (AMARAL; PEREIRA; CORTELAZZO, 2001). Os mesmos autores encontraram diferenças no aspecto proteico em

sementes de *Bixa orellana* L. em diferentes estádios de maturação, concordando com os resultados obtidos no presente trabalho para o conteúdo de água.

As proteínas de reserva em sementes foram classificadas em relação a sua solubilidade por Osborne (1924) como albuminas, prolaminas, glutelinas e globulinas. Em sementes de espécies da família Fabaceae, as globulinas representam a maior parcela de proteínas de reserva, sendo solúveis em solução salina (DERBYSHIRE et al., 1976), estando entre os componentes celulares com maior taxa de absorção de água nas sementes, tendo como principal função, o fornecimento, tanto de aminoácidos quanto de nitrogênio, para a formação de plântulas (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989).

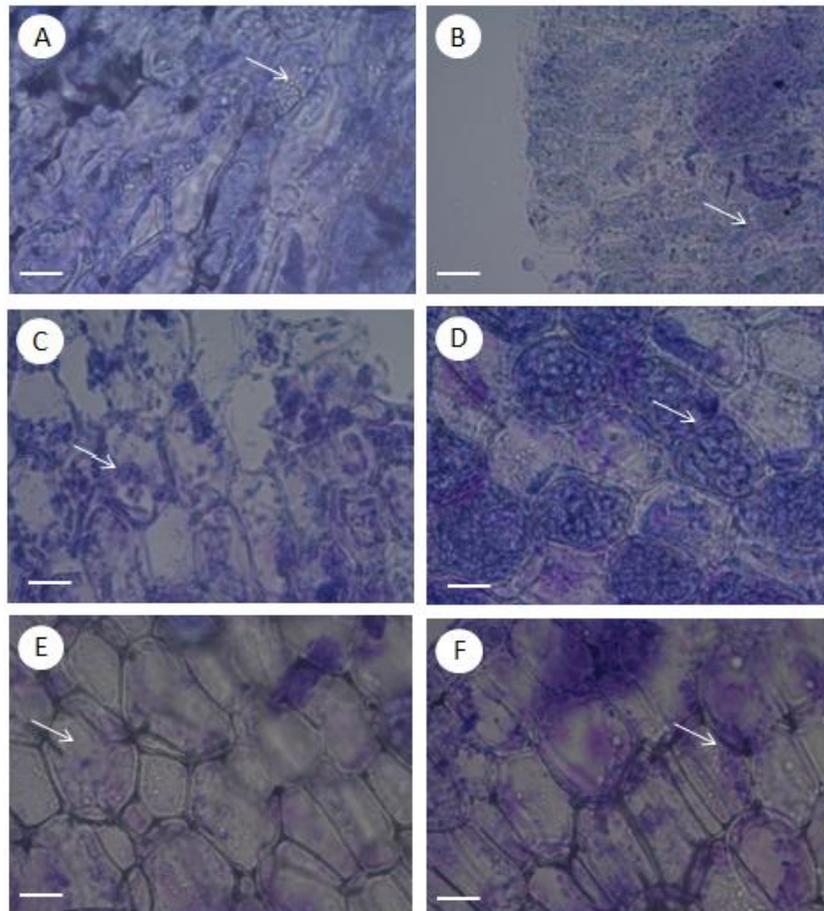


Figura 6 Fotomicrografias de seções transversais em cotilédones de sementes de *Sesbania virgata* em diferentes estádios de maturação, corados com azul brilhante de Coomassie, evidenciando os grânulos proteicos corados de azul. Barras em branco representam o comprimento de 10 μm . A = 24; B = 36; C = 44, D = 58, E = 75; F = 85 DAA.

Sementes de *S. virgata* aos 44 DAA não mais acumularam material proteico, pois neste estágio, todo seu material de reserva já se encontra formado

(Figura 6 C e D). Houve uma redução de material proteico em sementes aos 75 e 85 DAA (Figura 6 E e F), sendo possível observar uma baixa ocorrência de grânulo proteicos no interior das células. Para Barros (1986), Após atingir o ponto de maturidade fisiológica, as sementes se desligam da planta-mãe, dando início ao consumo de seu material de reserva devido o processo respiratório. Essa redução no material proteico também pode estar relacionada com a manutenção do vigor das sementes, proporcionando condições fisiológicas favoráveis para a germinação (KALEMBRA; PUKACKA 2008).

4.4 Aquisição da tolerância à dessecação

Por meio de testes preliminares, sementes aos 24 e 36 DAA não apresentaram germinação (dados não apresentados), pois, nos estádios iniciais de maturação, algumas de suas estruturas ainda não estavam completamente formadas, em termos de tamanho, o que pode ter comprometido suas respectivas funções (Figura 2). Neste momento, seu metabolismo está voltado para o crescimento, com divisão celular e acúmulo de reservas. Kalemba e Pukacka (2008) afirmam que estes eventos metabólicos durante a maturação das sementes, são os responsáveis por prepara-las para a germinação.

Na Figura 7 estão os resultados obtidos no teste de germinação de sementes de *S. virgata* em diferentes estádios de maturação a partir de 44 DAA. Na ausência de secagem, nota-se que houve um aumento nos valores de germinação à medida que as sementes avançavam nos estádios de maturação até seu máximo, aos 85 DAA, sendo esse, seu ponto de maturidade fisiológica. O mesmo foi observado em sementes que passaram pela secagem, com exceção de sementes aos 75 DAA, onde houve um decréscimo neste valor (Figura 7A). Na

comparação com e sem secagem, as sementes atingiram maiores porcentagens de germinação quando foram submetidas à secagem, sendo observada interação entre DAA e secagem (Tabela 1).

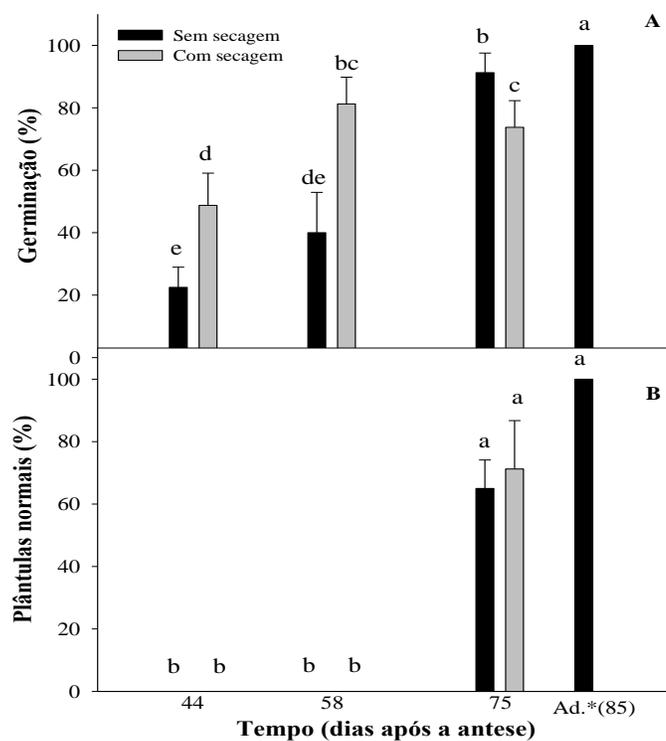


Figura 7 Percentagem de germinação (A) e plântulas normais (B) em sementes de *Sesbania virgata* em diferentes estádios de maturação. Ad tratamento adicional, composto por sementes aos 85 DAA sem secagem artificial. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 1 Desdobramento da interação DAA x secagem para o teste de germinação em sementes de *Sesbania virgata* em diferentes estádios de maturação.

Secagem	Dias após a antese (DAA)		
	44	58	75
Com secagem	48,75 Ab	81,25 Aa	73,75 Ba
Sem secagem	22,5 Bc	40 Bb	91,25 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A formação de plântulas normais só foi observada a partir de 75 DAA, não havendo interação entre os fatores DAA e secagem. O percentual de formação de plântulas normais não foi diferente estatisticamente, quando comparadas as médias apresentadas por sementes aos 75 DAA (independente da secagem) e aquelas aos 85 DAA. (Figura 7 B). Para formar uma plântula normal, ou seja, com presença de folhas e sistema radicular com raízes secundárias, a semente deve ter um metabolismo ativo e possuir material de reserva suficiente para nutrir essa plântula até que seu sistema radicular possa iniciar suas funções, juntamente com a capacidade fotossintética da parte aérea (DAPONT et al., 2014). Em sementes de *S. virgata*, fica evidente este comportamento ao final da maturação. Em sementes intermediárias, este comportamento pode ocorrer de forma inversa, como observado por do Prado et al. (2014) em sementes de *Achras sapota*, quando maior a redução do conteúdo de água das sementes, menor foi a percentagem de plântulas normais.

Em sementes ortodoxas, a secagem no estágio final de maturação é um processo que vai rumo à germinação (BEWLEY et al., 2013). Entretanto, para preparar as sementes para a dessecação, mecanismos de tolerância à dessecação

começam a ser ativados de forma gradativa ao longo do processo de maturação (WALTER et al., 2013). A capacidade destas sementes em tolerar a redução natural de seu conteúdo de água está relacionada com complexos mecanismos envolvendo o acúmulo de açúcares solúveis, proteínas LEA e a ativação de sistemas antioxidantes, todos eles regulados por um balanço hormonal (WALTER, 2000; BERJAK ;PAMMENTER, 2008).

Em *S. virgata* esses mecanismos certamente foram os responsáveis pela aquisição da tolerância à dessecação nas sementes, sendo evidenciada inicialmente aos 44 DAA (Figura 7 A), onde após atingirem 7% de seu conteúdo de água foi possível obter 49% de germinação. Aos 75 DAA, a queda nos valores de germinação das sementes secas em relação as não secas pode estar relacionadas com danos oriundos do processo de embebição, devido as sementes estarem com baixa umidade e ainda não atingirem seu ponto de maturidade fisiológica.

Vários autores constataram aumento na germinação em espécies de diferentes famílias à medida que as sementes avançavam nos estádios de maturação, como observado por Delgado e Barbedo (2007) com Myrtaceae, Carvalho et al. (2008) com Bignoniaceae, Vidgal et al. (2009) com Solanaceae, Corsato; Ferreira; Barbedo (2012) com Annonaceae, Molizane et al (2013) com Bromeliaceae e de Brito et al. (2015) com Euphorbiaceae.

Para uma semente ser considerada ortodoxa, além da capacidade de tolerar a redução de seu conteúdo de água a níveis extremamente baixos e suportar o armazenamento em baixas temperaturas por longos períodos, ainda é necessário que essa semente mantenha potencial germinativo após a dessecação, sendo este processo um condicionante para a ativação de rotas metabólicas da germinação (ROBERTS, 1973). Sementes de *S. virgata* aos 44 e 58 DAA, após

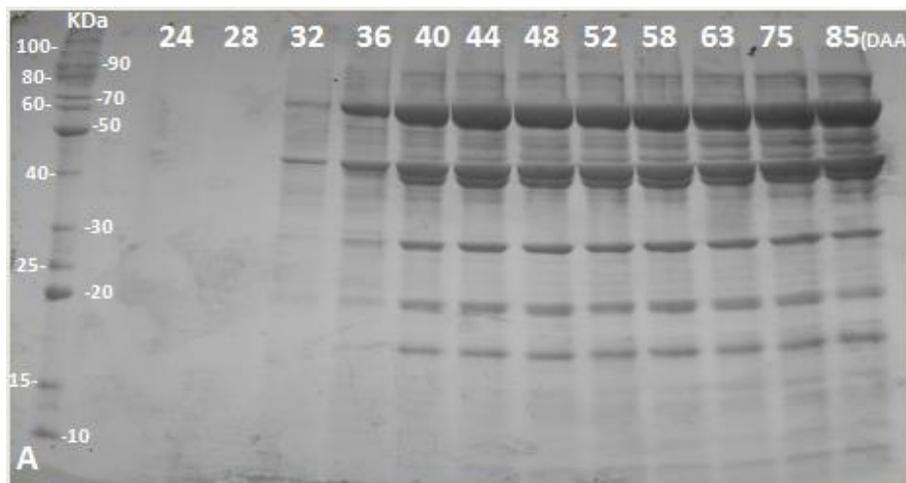
passarem pela secagem artificial até 7% de seu conteúdo de água, apresentaram maior porcentagem de germinação em relação às sementes não secas, respectivamente 49% e 81% contra 23% e 40%. Entretanto, sementes aos 75 DAA após a secagem apresentaram um desempenho inferior em relação às sementes não secas, com valores de 74 e 91% respectivamente (Figura 7 A). Corsato, Ferreira e Barbedo (2012) estudando a germinação de *Annona emarginata*, obtiveram valores superiores a 70% de germinação em sementes em estádios avançados de maturação após secagem até 5%.

A sobrevivência à dessecação está condicionada a ativação de sistemas que garantam a integridade das membranas, a presença de mecanismos antioxidantes, a desdiferenciação de organelas, a formação do estado vítreo, entre outros mecanismos, que, somados, vão promover a tolerância à dessecação em sementes (CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004; FARIA et al., 2005). Delgado e Barbedo (2007) afirmam que a velocidade de secagem está intimamente ligada ao limite de tolerância à dessecação em sementes. Quanto mais rápido o processo de secagem, maior o grau de desidratação suportado pelas sementes, reduzindo a possibilidade de danos oriundos do processo. Em uma secagem lenta, as sementes permanecem por um período maior em uma zona de dessecação propícia a ocorrência de danos, entre eles a ação de radicais livres, que acarretam em grandes danos às estruturas das membranas (BERJAK; PAMMENTER, 2000).

4.5. Perfil eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor

Foi investigada por meio de imagens dos perfis proteicos de proteínas totais e resistentes ao calor, em sementes de *S. virgata* em diferentes estádios de

maturação. Não foram observadas bandas aos 24 e 28 DAA nos géis de proteínas totais e resistentes ao calor. Sementes em estádios iniciais de maturação apresentam estruturas de reservas ainda no início de seu desenvolvimento (Figura 2), consequentemente com pouco material acumulado, e paralelamente, o material quantificado em espectrofotômetro pode ser basicamente constituído por enzimas que, após o processo de quantificação pode ter sofrido degradação, e por isso, não foi possível observar bandas nos géis nos dois primeiros pontos de coleta.



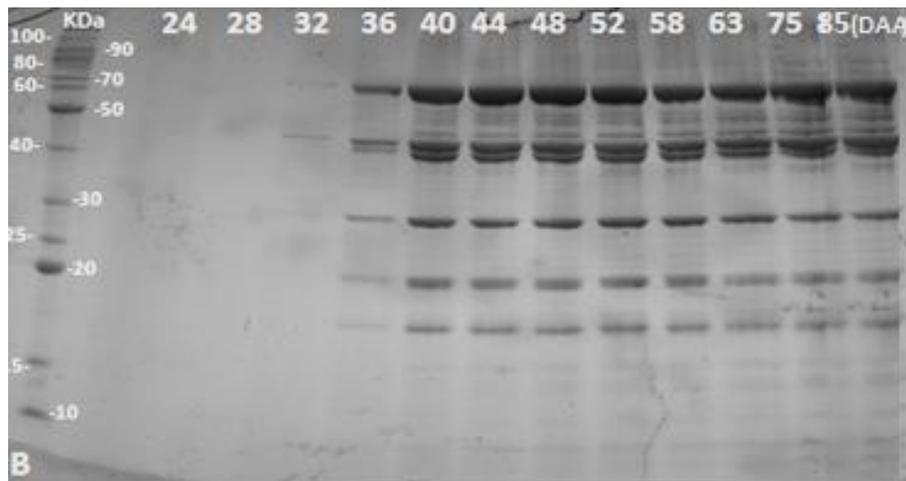


Figura 8 Perfil eletroforético em gel descontínuo de poliacrilamida SDS-PAGE de proteínas totais (A) e resistentes ao calor (B), de sementes de *Sesbania virgata* em diferentes estádios de maturação.

Houve diferença em relação à intensidade das bandas de proteínas totais em relação às resistentes ao calor, o que já era esperado. Em sementes de algumas espécies da família Fabaceae, as proteínas são os principais componentes de reserva (KALEMBA; PUKACKA, 2008). Nessas sementes, parte dessas proteínas será armazenada, após acúmulo durante a maturação, para nutrir o embrião na fase de plântula. Outra fração de proteínas possui função de proteção, evitando danos causados por estresses ambientais e auxiliam na montagem e manutenção de estruturas celulares (SANTINE; MARTOREL, 2013). Estas diferentes proteínas pertencem a grupos distintos e, por sua vez, apresentam uma ampla variação em relação ao seu peso molecular (Figura 8).

Para as proteínas totais, é possível observar bandas a partir dos 32 DAA, apresentando peso molecular entre 70 e 30 KDa, evidenciando um aumento na intensidade das bandas até os 44 DAA, também sendo observado o aparecimento

de bandas com baixo peso molecular. É possível constatar, por meio das imagens dos géis, que o acúmulo de material de reserva em sementes de *S. virgata* se dá em um curto intervalo de tempo, entre 32 e 58 DAA. Deste último estágio em diante, a intensidade das bandas permaneceu constante, com pouca variação, e peso molecular entre 90 e 15 KDa (Figura 8A). Durante a maturação, as sementes passam por processos metabólicos com o intuito de prepara-las para a germinação. Além da redução do conteúdo de água, após atingir seu ponto de maturidade fisiológica, não há mais acúmulo de material de reserva em sementes ortodoxas, permanecendo constante até o fim da maturação.

O mesmo padrão de distribuição das bandas também foi observado em proteínas resistentes ao calor, a partir de 40 DAA, quando as bandas não apresentaram mais variação até 85 DAA, contrariando Hand et al. (2011), que afirmam que proteínas resistentes ao calor somente ocorreriam ao final do processo de maturação. Esse perfil proteico correlaciona-se com os resultados de tolerância à dessecação, que não foi adquirida pelas sementes antes dos 44 DAA (Figura 8A), reforçando a relação dessas proteínas com a tolerância à dessecação.

As proteínas resistentes ao calor atuam impedindo a desnaturação, e promovem a agregação de outras proteínas. Também podem atuar em situações de estresse, aumentando sua abundância e preparando a semente para a dessecação (WANG et al., 2004), até atingir uma estabilidade durante a maturação. Moore et al. (2009) relacionou a participação de proteínas resistentes ao calor em sementes de *Annona. emarginata* com a obtenção de tolerância à dessecação. Vários fatores promovem um aumento de proteínas resistentes ao calor, um deles é a síntese de ácido abscísico - ABA (TAIZ; ZEIGER, 2013), hormônio vegetal presente nas sementes e que está relacionado com a síntese e

acúmulo de substâncias que permitem a redução de água ao fim da maturação, sem que haja danos ao sistema de membranas (FINKELSTEIN, 2013).

Estes resultados reforçam ainda mais a relação entre proteínas resistentes ao calor com a aquisição da tolerância à dessecação, que, atuando juntamente com outros fatores, proporcionaram às sementes ortodoxas eficientes estratégias de sobrevivência.

5 CONCLUSÕES

Sementes de *S. virgata* atingiram o ponto de maturidade fisiologia aos 85 DAA.

Foi possível descrever as estruturas internas das sementes, e observar a deposição de lignina ao final da maturação.

Fisiologicamente, a aquisição da tolerância à dessecação foi adquirida em sementes a partir dos 44 DAA.

A aquisição da tolerância à dessecação está relacionada com a expressão de proteínas resistentes ao calor.

6 REFERÊNCIAS

AGUIAR, I. B.; PERECIN, D.; KAGEYAMA, P. Y. Maturação fisiológica de sementes de *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden. **IPEF**, Piracicaba, v. 38, p. 41-49, 1988.

ALPERT, P. Constraints of tolerance: why are desiccation tolerant organisms so small or rare? **The Journal of Experimental Biology**, Massachusetts, v. 209, n.9, p. 1575-84, 2006.

ALVES, E. U. et al. Maturação de sementes de sabiá. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 01-08, 2005.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxidase-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.

ARAÚJO, E. C. et al. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pres. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 105-110, 2004.

BARBEDO, C. J.; MARCOS-FILHO, J. Tolerância à dessecação de sementes. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, p. 145-164, 1998.

BARROS, A. S. R. Maturação e colheita de sementes. In: Cícero, S. M.; Marcos Filho, J.; Silva, W.R. (Coord.). **Atualização em produção de sementes**. Fundação Cargill, Campinas, p.34-107, 1986.

BARROSO, M. B. et al. **Frutos e sementes**. morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: UFV, 1999, 443p.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 1998.

BASKIN, J. M. et al. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. **Plant Species Biology**, London, v. 15, n. 2, p. 139-152, 2000.

BELTRATI, C. M. Morfologia e anatomia das sementes de *Trichilia elegans* A. Juss (Meliaceae). **Naturalia**, São Paulo, v.9, p.35-42, 1984.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 2, p. 213-228, 2008.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Fortaleza, v. 12, p. 22-55, 2000.

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

BEWLEY, J.D. et al. **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 392p. 2013.

BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. London, CABI, 2002. 422 p.

BOUDET, J. et al. Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 4, p. 1418-1436, 2006.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 2009. 339 p.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, 2000.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 788-795, 2008.

CALDATO, S. L. et al. Estudo da regeneração natural, banco de sementes e chuva de sementes na reserva genética florestal de Caçador, SC. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 6, n. 1, p. 27-38, 1996.

CARVALHO, M. L. M. et al. Morphophysiological development of *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. seeds. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v. 65, n. 6, p. 643-651, 2008.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5 Ed. Funep, Jaboticabal, 2012, p. 590.

CARVALHO, Y. **Caracterização fenológica, genética e simbiótica de Azorhizobium SP de Sesbania virgata (Cav.) Pres.** 2002. 86 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2002.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p.51-67, 2004.

CHAVE, L. L. B. et al. Efeitos da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada na produção de mudas de *Sesbania* em substrato constituído de resíduos agroindustriais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 443-449, 2003.

CORSATO, J. M.; FERREIRA, G.; BARBEDO, C. J. Desiccation tolerance in seeds of *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer and action of plant growth regulators on germination. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes v. 24, n. 4, p. 253-260, 2012.

COUTINHO, M. P. Crescimento de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers em cavas de extração de argila. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 231-239, 2005.

CUMMINGS, S. P. et al. Nodulation of *Sesbania* species by Rhizobium (Agrobacterium) strain IRBG74 and other rhizobia. **Environmental Microbiology**, Washington, p. 2510-2525, 2009.

DAM, S. et al. The proteome of seed development in the model legume *Lotus japonicas*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 3, p. 1325-1340, 2009.

DAPONT, E. C. et al. Métodos para acelerar e uniformizar a emergência de plântulas de *Schizolobium amazonicum*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 3, p. 598-605, 2014.

DE BRITO, C. D. et al. Perfil morfofisiológico da maturação de frutos e sementes de *Jatropha curcas* L. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 6, p. 3615-3628, 2015.

DELARMELINA, W. M. et al. Diferentes Substratos para a Produção de Mudas de *Sesbania virgata*. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 21, n. 2, p. 224-233, 2014.

DELGADO, L. F.; BARBEDO, C. J. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 265-272, 2007.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D. J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage protein of legume seeds. **Phytochemistry**, Washington, v. 15, p. 3-24, 1976.

DO AMARAL, L. I.; PEREIRA, M. D. F. D.; CORTELAZZO, Â. L. Formação de substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L. – Bixaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 125-132, 2001.

DO PRADO, N. B. et al. Dessecação de sementes de *Achras sapota* l. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 4, p. 1009-1017, 2014.

FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. Fenologia do milho. **Tecnologia da produção de milho**. Piracicaba, p. 131-140, 1997.

FARIA et al. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation-tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.56, n.418, p.2119-2130, 2005.

FARRANL, L. M.; BERJAK, P.; PAMMENLER, N. W. Proclins in developlilenl and gcrminalion 01' a desiccation sensilive (recalcilranl) seed species. **Plant Growth Regulation**, Nebraska. p. 257-265, 1992.

FARRANT, J. M.; MOORE, J. P. Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. **Current opinion in plant biology**, Wallingford, v. 14, n. 3, p. 340-345, 2011.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Recalcitrance: a current assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 16, n. 1, p. 155-166, 1988.

FINKELSTEIN, R. Abscisic Acid Synthesis and Response. **The Arabidopsis Book**, The American Society of Plant Biologists, Washington, 2013.

FONSECA, J. R. et al. **Descrição morfológica, agronômica, fenológica e culinária de alguns tipos especiais de arroz (Oryza sativa L.)**. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, 2007.

FONSECA, J. R. et al. Descritores morfoagronômicos e fenológicos de cultivares tradicionais de arroz coletados no Maranhão. **Ceres**, Lavras, v. 51, n. 293, 2015.

FREITAS, W. E. D. S. et al. Ação das Proteínas de Choque Térmico em frutos. **Agropecuária científica no semiárido**, Campina Grande, v. 8, n.2, p. 24-31, 2012.

FUKUDA, H. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht v. 44, n. 3, p. 245-253, 2000.

GALLARDO, K. et al. Proteomics of Medicago truncatula Seed Development Establishes the Time Frame of Diverse Metabolic Processes Related to Reserve Accumulation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, p. 664–682, 2003.

GEMAQUE, R. C. R.; DAVIDE, A. C.; MARCOS, J. M. F. Indicadores de maturidade fisiológica de sementes de Ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Cerne**, Lavras, v. 8, n. 2, p.84-91, 2002.

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24-Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-**

AVHRR. 2000. 70 p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2000.

HAND, S. C. et al. LEA protein during water stress: not just for plants anymore. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 73, p. 115-134, 2011.

HARA-NISHIMURA, I; HATSUGAI, N. The role of vacuole in plant cell death. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 18, n. 8, p. 1298-1304, 2011.

JAMES, E. K. et al. Flooding-tolerant legume symbioses from the Brazilian Pantanal. **New Phytologist**, London, n. 150, p. 723-738, 2001.

JAYASURIYA, K. M. et al. Seed development in *Ipomoea lacunose* (Convolvulaceae), with particular reference to anatomy of the water gap. **Annals of botany**, New York, v. 100, n. 3, p. 459-470, 2007.

JOSÉ, A.C. et al. Protein Expression upon Desiccation and Imbibition of *Magnolia ovata* A. St.-Hil seeds. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, Curitiba, v. 1.54, n. 3: p. 465-476, 2011.

KALEMBA, E. M.; PUKACKA, S. Changes in late embryogenesis abundant proteins and a small heat shock protein during storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. **Environmental and Experimental Botany**, Wallingford, v. 63, p. 274 - 280. 2008.

KRANNER, I. What is stress? Concepts, definitions and application in seed science. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 188, n. 3, p. 655-673, 2010.

KERMODE, A. R.; FINCH-SAVAGE, B. E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. London: CABI, p. 149-184, 2002.

KELLY, K. M.; STADEN, J.; BELL, W. E. Seed coat structure and dormancy. **Plant Growth Regulation**, Nebraska, v. 11, n. 3, p. 201-209, 1992.

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

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

KOSTER, K. L., REISDORPH, N., RAMSAY, J. L. Changing desiccation tolerance of pea embryo protoplasts during germination. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 54, 1607–1614. 2003.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, p. 231-246, 1993.

LULSDORF, M.M.; YUAN, H.Y.; SLATER, A.M.H.; VANDENBERG, A. Endogenous hormone profiles during early seed development of *C. arietinum* and *C. anatolicum*. **Plant Growth Regulation**, Nebraska, v.71, p.191–198, 2013.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

MARCOS FILHO, J. Maturação de sementes de soja da cultivar Santa Rosa. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 49-63, 1979.

MARCOS FILHO, J. Maturidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 4, p. 447-460, 1980.

MARTINS, S. S.; SILVA, D. D. Maturação e época de colheita de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell) Fr. All. Ex Benth. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 96-99, 1997.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. Pergamon Press, McMillan, New York, 1989.

MENTER, N. W.; BERJAK, P. WALTERS, C. The effect of drying rate on recalcitrant seeds: “lethal water contents”, causes of damage, and quantification of recalcitrance. In: BLACK, M.; BRADFORD, K. J.; VAZQUEZ-RAMOS, J. (Ed.) **Seed biology: advances and applications**. Wallingford: CABI, p. 215-221, 2000.

MILLER, S. S. et al. Early Development of the Seeds Coat of Soybean (*Glycine max*). **Annals of botany**, Oxford, v. 84, p. 297-304, 1999.

MOLIZANE, D. M. **Estabelecimento e superação de dormência em sementes de *Erythrina speciosa* Andrews**. 2012. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.

MOLIZANE, D. M. et al. Seed maturation of *Aechmea bromeliifolia* and *Vriesea paraibica* (Bromeliaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 619-625, 2013.

MOORE, J.P., LE, N.T., BRANDT, W.F., DRIOUICH, A. & FARRANT, J.M. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v. 14, p.110-117, 2009.

NAMBARA, E. et al. The role of ABI3 and FUS3 loci in *Arabidopsis thaliana* on phase transition from late embryo development to germination. **Developmental Biology**, Boston, v. 220, n. SN, p.412–423. 2000.

NAMBARA, E. et al. A regulatory role for the ABI3 gene in the establishment of embryo maturation in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, Southbridge, v.121, p.629-636, 1995.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination – still a mystery. **Plant Science**, Limerick, v. 179, n. 6, p. 574-581, 2010.

NTULI, T. M. Increased drying rate lowers the critical water content for survival in embryonic axe of English Oak (*Quercus robur* L.) seeds. **Journal of Integrative Plant Biology**, Pequim, v. 53, p. 270-280, 2011.

OBENDORF, R.L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, p. 63-74, 1997.

OLIVEIRA, E. C.; PEREIRA, T.S. Morfologia dos frutos alados em Leguminosae-Caesalpinioideae-*Martiodendron* Gleason, *Peltophorum* (Vogel) Walpers, *Sclerolobium* Vogel, *Tachigalia aublet* e *Schizolobium* Vogel. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v.36, n. 60, p. 35-42, 1984.

OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, n. 1, p. 85-100, 2000.

OSBORNE, T. B. **The Vegetable Proteins**, London, Longmans Green and Co., 2nd Edn., 1924.

PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, London, p.13-37, 1999.

POTOMATI, A.; BUCKERIDGE, M. S. Effect of abscisic acid on the mobilization of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae – Faboideae). **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 303-310, 2002.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA/CPAP/SPI, 1994. 320 p.

PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E. Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acersaccharinum* seed. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 163, n. 12, p. 1259-1266, 2006.

REN J.; TAO L. Effect of hydration–dehydration cycles on germination of seven *Calligonum* species. **Journal of Arid Environments**, Sharjah, v.55, p.111–122, 2003.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, London, p. 499-514, 1973.

RODRIGUES, L.A.; MARTINS, M. A.; SALOMÃO, M. S. M. B. Usos de micorrizas e rizóbio em cultivo consorciado de eucalito e sesbania. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 27, n. 4, p. 583-591, 2003.

SAHI, S. V. et al. Accumulation speciation and cellular localization of copper in *Sesbania drummondii*. **Chemosphere**, Wallingford, n.67, p. 2257-2266, 2007.

SANTINI, B.A.; MARTORELL, C. *Does retained-seed priming drive the evolution of serotiny in drylands? An assessment using the cactus Mammillaria hernandezii.* **American journal of botany**. St. Louis, v. 100, n. 2, p. 365 - 373. 2013.

SANTOS, D. R.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fósforo, fungo micorrízico e rizóbio no crescimento, nodulação e fixação biológica do nitrogênio em *Sesbania virgata* (Cav.) e *Sesbania rostrata* (Bram). In: FERT' BIO. **Anais...** Caxambu, 1997. p. 772.

SHARMA, R. S. et al. Diversity in a promiscuous group of rhizobia from three *Sesbania* spp. Colonizing ecologically distinct habitats of the semi-arid Delhi region. **Research in Microbiology**, Paris, n. 156, p. 57-67, 2005.

SHUGUANG, J; WEIJUN, S; YANG ZHONGYI. Enhanced adaptability of *Sesbania rostrata* to Pb/Zn tailing via stem nodulation. **Journal of Environmental Sciences**, Pequim, n. 21, p. 1135-1141, 2009.

SILVA, P.E.M. et al. Quebra da dormência em sementes de *Sesbania virgata* (Car.) Pres. **Idesa**, Arica, v. 29, n. 2, Ago. 2011.

SOUZA, S. M.; LIMA, P.C.F. Maturação de sementes de angico (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brensn). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 93-99, 1985.

STONE, S. L. et al. Leafy cotyledons encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. **PNAS**, Washington , v.98, n.20, 2001.
TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

TANG, W. Peroxidase activity of desiccation tolerant loblolly pine somatic embryos. **In Vitro Cellular e Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 36, n. 6, p. 488-491, 2000.

TUNNACLIFFE, A.; WISE, M. L. The continuing conundrum of the LEA proteins. **Naturwissenschaftler**, Berlin, v. 94, p. 791-812, 2007.

TWEDDLE, J. C. et al. aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 294-304, 2003.

VIDIGAL, D. de S. et al. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 129-136, 2009.

WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seeds, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12 (Edição especial), p. 7-21, 2000.

WALTERS et al. Preservation of Recalcitrant Seeds. **Science**, New York, v. 339, n. 6122, p. 915-936, 2013.

WANG, W. et al. Role of plant heat shock proteins and molecular chaperons in the abiotic stress response. **Trends Plant Science**, London, v. 9, p. 1360-1385, 2004.

WECHSBERG, G. E.; BRAY, C. M.; PROBERT, R. J. Expression of 'dehydration-like' proteins in orthodox seeds of *Ranunculus sceleratus* during development and water stress. **Seed Science Research**, London, p. 241-246, 1994.

YANG, B. et al. Growth and metal accumulation in vetiver and two *Sesbania* species on lead/zinc mine tailings. **Chemosphere**, Wallingford, v. 52, n. 15, p. 93-106, 2003.

ZANANDREA, I. et al. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding.
Australian Journal of Botany, Melbourne, n.57, p. 661-669, 2009.