

**GERMINAÇÃO E REINDUÇÃO DA
TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Bauhinia forficata* LINK
(FABACEAE)**

AMANDA CRISTIANE RODRIGUES

2010

AMANDA CRISTIANE RODRIGUES

**GERMINAÇÃO E REINDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE *Bauhinia forficata* LINK
(FABACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

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

Rodrigues, Amanda Cristiane.

Germinação e reindução da tolerância à dessecação em sementes de *Bauhinia forficata* Link (FABACEAE) / Amanda Cristiane Rodrigues. – Lavras : UFLA, 2010.

53 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.

Bibliografia.

1. Pata de vaca. 2. Resistência à seca. 3. Sementes germinadas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.521

AMANDA CRISTIANE RODRIGUES

**GERMINAÇÃO E REINDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE *Bauhinia forficata* LINK
(FABACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Marcelo Polo	UNIFAL-MG
Prof ^ª . Dra. Fernanda Carlota Nery	UFSJ
Prof ^ª . Dra. Ana Cardoso de Paula Clemente Filha	IFMG

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

“Bem aventurados os mansos, porque eles herdarão a terra” Mateus 5:5

Aos meus pais, José e Ernestina.

Aos meus irmãos Josiane, Fernanda e Alexandre.

Aos meus sobrinhos, Matheus, Ana Clara e Letícia.

Ao Fábio.

OFEREÇO

Às amigas Carla, Fabiane e Kamila.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter colocado em meus caminhos as pessoas certas para que eu pudesse ter êxito durante mais esta fase da minha vida. Agradeço a Deus por ter me abençoado a cada minuto, e por ter enchido de luz a minha caminhada.

Agradeço aos meus amados pais, José e Ernestina, por terem me ensinado que o mundo pertence aos mansos de coração. Aos meus queridos irmãos, Josiane, Fernanda e Alexandre pelo apoio constante e pela amizade. Aos sobrinhos Matheus, Ana Clara e Letícia por terem trazido mais alegria a minha vida.

Às indispensáveis e magníficas amigas Carla, Fabiane e Kamila, pelo apoio, e principalmente por terem me mostrado o que é a amizade sem limites, a amizade verdadeira. Sem vocês não sei se teria chegado até aqui. Ao Fábio pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga pela orientação, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Polo, por todos os ensinamentos transmitidos, pela amizade, apoio e por ter confiado no meu potencial. E principalmente por ter me inserido na pesquisa.

À doutoranda Sara Dousseau pelo apoio. Aos amigos do laboratório Joeferson, Túlio, Diego, Márcia, Juliana, Mariana, Fabrício, Elma, Izabel, Milene e Estefania, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos, e pela boa convivência durante o mestrado.

A todos os professores do setor de Fisiologia Vegetal pelos conhecimentos transmitidos. Aos funcionários Joyce, Joel, Odorêncio, Lena, Tina, Barrinha, Evaristo e Dartagnan pela ajuda constante.

Aos colegas do setor de Fisiologia Vegetal pelo convívio, principalmente ao querido amigo Rogério que fez os meus dias mais felizes.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade.

À Universidade Federal de Lavras pela infraestrutura, principalmente aos laboratórios do Setor de Fisiologia Vegetal, dos Departamentos de Agricultura, Fitopatologia e Ciência dos Alimentos.

Ao setor de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realizar o curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Descrições botânica, da germinação e importância da espécie.....	3
2.2 Aspectos da germinação de <i>B. forficata</i>	5
2.3 Aspectos da tolerância à dessecação em sementes	6
2.4 Sementes ortodoxas como modelo para estudos da recalcitrância.....	8
2.5 Reindução da tolerância à dessecação pós-protrusão da radícula em sementes.....	9
3 METODOLOGIA	12
3.1 Coleta, beneficiamento e caracterização de lotes das sementes.....	12
3.2 Determinação do grau de umidade, de peso de mil sementes, de curva de embebição e de superação de dormência	13
3.3 Influência dos fitormônios ABA e GA no processo germinativo	14
3.4 Curva de secagem e reindução da tolerância à dessecação após a germinação das sementes.....	15
3.5 Análise de crescimento	16
3.6 Composição química.....	17
3.7 Análises ultraestruturais do eixo embrionário de sementes germinadas.	19
3.8 Efeito do ABA e do choque quente na reindução de tolerância à dessecação.....	19
3.9 Análise estatística	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Caracterização morfológica de lotes de sementes de <i>B. forficata</i>	21
4.2 Grau de umidade, peso de mil sementes, curva de embebição e superação de dormência.....	22

4.3 Influência dos fitorreguladores ABA e GA no processo de germinação das sementes	25
4.4 Reindução da tolerância à dessecação após a germinação e curva de secagem.....	29
4.5 Análise de crescimento	35
4.6 Composição química.....	38
4.7 Análises ultraestruturais do eixo embrionário de sementes germinadas.	39
4.8 Efeito do ABA e do choque quente na reindução de tolerância à dessecação.....	42
5 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

RODRIGUES, Amanda Cristiane. **Germinação e reindução da tolerância à dessecação em sementes de *Bauhinia forficata* Link (FABACEAE)**. 2010. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Bauhinia forficata Link é uma espécie de interesse medicinal e agrônomo, conhecida popularmente como pata de vaca. Objetivou-se avaliar algumas características da germinação dessa espécie, bem como sua capacidade de manter a tolerância à dessecação após a germinação. Após beneficiadas, as sementes foram divididas em lotes, sendo utilizado o lote que apresentou maior percentual de germinação. As sementes apresentaram 20% de umidade e o peso de mil sementes foi de 88,23 gramas, essas apresentam impermeabilidade tegumentar, e não segue o padrão trifásico de embebição. Em testes para verificar a influência dos fitormônios ácido abscísico (ABA) e giberelina (GA), a fluridona (inibidor de ABA) aumentou o índice de velocidade de germinação (IVG), e o paclobutrazol (inibidor de GA) diminuiu o IVG. Ambos os inibidores não alteraram o percentual de germinação. A adição de GA não influenciou o IVG e a %G. Quanto à reindução da tolerância à dessecação, o uso de PEG -1,4 MPa possibilitou o restabelecimento da mesma em radículas de até 4 mm de comprimento. A secagem em sílica, sem incubação em PEG, proporcionou a retomada do crescimento apenas em até 3 mm de comprimento, e apresentou um alto percentual de morte da raiz primária, com posterior crescimento de raiz adventícia. Em relação ao crescimento das plântulas, após a reindução da tolerância à dessecação, a secagem em sílica apresentou menor comprimento radicular, número de folhas e massa seca. A composição química das sementes durante o crescimento radicular apresentou um aumento de lipídeos e açúcares totais, e uma diminuição das proteínas e amido. As eletromicrografias de varredura mostraram que durante a secagem na sílica, sem incubação em PEG, ocorre uma perda na conformação das células, o que não ocorre quando as sementes germinadas são incubadas em PEG. O uso de ABA e choque quente durante o processo de reindução da tolerância à dessecação foi prejudicial à mesma, diminuindo o percentual de radículas que retomaram o crescimento.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga – UFLA

ABSTRACT

RODRIGUES, Amanda Cristiane. **Germination and re-induction of desiccation tolerance in seeds of *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae)**. 2010. 53 p. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Bauhinia forficata Link is a species of medicinal and agronomic interest, popularly known as cow's paw. Aimed to evaluate some characteristics of germination of this species, as well as its ability to maintain the desiccation tolerance after germination. Once treated, seeds were divided into lots, the lot being used with the highest percentage of germination. The seeds showed 20% moisture content and thousand seed weight was 88.23 grams, they have waterproof, mucocutaneous, and does not follow the standard three-phase imbibition. In tests to check the influence of the phytohormones abscisic acid (ABA) and gibberellin (GA), the fluridone (inhibitor of ABA) increased the germination speed index (GSI) and paclobutrazol (an inhibitor of GA) decreased the IVG. Both inhibitors did not affect the germination percentage. The addition of GA did not influence the IVG and % G. As for re-induction of desiccation tolerance, the use of -1.4 MPa PEG allowed the restoration of the same in radicles up to 4 mm in length. Drying of silica, without incubation in PEG, provided the resumption of growth only up to 3 mm long and had a high percentage of death of the primary root, with subsequent growth of the adventitious root. In relation to seedling growth, after re-induction of tolerance to desiccation, drying on silica showed the lowest root length, leaf number and dry weight. The chemical composition of the seeds for root growth showed an increase of lipids and sugars, and reduced protein and starch. The scanning electron micrographs showed that during drying the silica, without incubation in PEG, a loss occurs in the conformation of the cells, which does not occur when the germinated seeds are incubated in PEG. The use of ABA and hot shock during the reinduction of tolerance to desiccation was detrimental to it, decreasing the percentage of root tips that resumed growth.

Aadvisor: Amauri Alves de Alvarenga – UFLA

1 INTRODUÇÃO

Bauhinia forficata é conhecida popularmente como pata de vaca, pertencente à sub-família Caesalpiniaceae, da família Fabaceae. Trata-se de uma espécie de grande interesse devido a sua larga utilização na medicina popular, no combate a diabetes, uso esse comprovado cientificamente quanto a sua eficácia (Cunha et al., 2010).

Além de sua importância medicinal, *B. forficata* também é utilizada em reflorestamento, por se tratar de uma espécie pioneira e de rápido crescimento (Lorenzi & Matos, 2002). Porém, os estudos dos aspectos da germinação dessa espécie estão limitados a dormência fisiológica, luz e temperatura ótimas (Lopes et al., 2007).

Quanto à capacidade de perder água, Medeiros & Eira (2006) classificam as sementes de *B. forficata* como tolerantes à dessecação. A tolerância a dessecação está ligada à capacidade de um tecido se re-hidratar após a perda de 80% a 90% da água protoplásmica (Hoekstra et al., 2001). Sementes com essa característica representam um modelo para estudos relacionados à reindução da tolerância a dessecação, ou seja, a desidratação após a perda da tolerância a dessecação durante a germinação, bem como os mecanismos que regem a falta de tolerância a dessecação em sementes recalcitrantes (Sun, 1999).

Dentre as características das sementes tolerantes a dessecação, pode-se ressaltar a composição química das sementes (Liu et al., 2009), que influencia na aquisição de tolerância a dessecação, e a síntese de ácido abscísico (ABA), ligado à formação de proteínas termorresistentes (Taiz & Zeiger, 2009).

Assim, objetivou-se com este estudo a caracterização de alguns aspectos da germinação de *B. forficata*, como a influência do ácido abscísico e giberelina, e a existência de barreira física no tegumento das sementes. Procurou-se estabelecer protocolos de reindução de tolerância a dessecação em sementes germinadas de *B. forficata*, analisar o crescimento de plantas após o

restabelecimento da tolerância a dessecação, bem como alguns aspectos estruturais e bioquímicos que regem a perda da tolerância a dessecação após a germinação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrições botânica, da germinação e importância da espécie

Espécies do gênero *Bauhinia* são Fabaceae-Caesalpinaceae, amplamente utilizadas na indústria de celulose, caixotaria, como planta apícola na produção de mel, na alimentação animal e na ornamentação de ruas e praças (Carvalho, 2003).

De acordo com Vaz & Tozzi (2005), o gênero *Bauhinia* é bastante amplo, com cerca de 300 espécies, das quais 200 são nativas do Brasil. Nesse gênero destaca-se *B. forficata*, uma espécie nativa da América do Sul, que possui distribuição na Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Brasil, sendo que no Brasil, se distribui nos Estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo.

A espécie *Bauhinia forficata* é conhecida popularmente como “pata de vaca”, “unha-de-vaca” e “bauhinia” (Lorenzi & Matos, 2002), cuja presença é observada principalmente em capoeiras, margens de estrada e em matas ciliares, com duas variedades: patypetala e forficata. São plantas pioneiras, de rápido crescimento e recomendadas para plantios mistos destinados à recomposição vegetal arbórea (Lorenzi & Matos, 2002).

B. forficata é uma árvore de médio porte (5 a 9 m), cujas folhas são bipartidas lembrando a pata de um bovino (figura 1A). A folha de *B. forficata* é alongada, com folíolos unidos em torno da metade do limbo, ápices agudos, superfície adaxial lisa e mucro entre os folíolos (Lusa & Bona, 2009). Tem flores de coloração branca (figura 1B) e frutos do tipo vagem linear, contendo de 1 a 7 sementes achatadas em forma de asa, de coloração castanha e com poros, com dimensões de 10,0 x 7,0 mm.



FIGURA 1 Aspecto geral da espécie *B. forficata*. 1A com aspectos gerais da folha bipartida e 1B com aspectos gerais das flores de coloração branca.

Estudos de natureza fitoquímica indicam a presença de glicosídeos, ácidos orgânicos, sais minerais, taninos, pigmentos e mucilagens nas espécies de *Bauhinia* (Lorenzi & Matos, 2002).

Souza et al. (2004) demonstram o efeito hipoglicemiante e potencial antioxidante do flavonóide Kaempferitrina em *B. forficata*, sendo confirmado o potencial contra diabetes por Pepato et al. (2002), Menezes et al. (2007) e por Cunha et al. (2010) através de estudos com o decocto aquoso, extrato aquoso e material seco armazenado em cápsulas, respectivamente. As folhas dessa espécie são consideradas, além de antidiabéticas, diuréticas (Silva & Cechinel Filho, 2002) e hipocolesterolemiantes (Lorenzi & Matos, 2002). Além disso, estudos com *B. forficata* (Oliveira et al., 2005) atribuem propriedades anticoagulantes e antifibrinogenolíticas à mesma, enquanto que extratos de caules e cascas mostraram efetiva ação antimicrobiana, contra fungos dermatófitos (Silva & Cechinel Filho, 2002).

2.2 Aspectos da germinação de *B. forficata*

Após coletada, sementes de *B. forficata* apresentam cerca de 19% de base úmida (Lopes et al., 2007). Quanto à germinação, essa espécie apresenta dormência fisiológica, devido à presença de um tegumento, que quando tratado, aumenta a taxa de germinação dessa espécie. Tratamentos pré-germinativos, como escarificação mecânica e imersão em ácido sulfúrico concentrado durante 5 minutos, reduzem os mecanismos de dormência das sementes de *B. forficata*, aumentando significativamente a percentagem de germinação (Rosa & Ferreira, 2001). Essa impermeabilidade do tegumento está associada a várias espécies da família Fabaceae (Carvalho, 2003).

Em trabalhos feitos com sementes coletadas em ambientes urbanos, até 99% das sementes apresentaram-se inviáveis devido ao severo ataque de brocas e outros patógenos. Assim, para esta espécie, há que se ter especial cuidado sobre a sanidade das sementes (Rosa & Ferreira, 2001). Quanto ao armazenamento, sementes de *B. forficata* em condições de laboratório ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) ou em câmara fria a 5°C , mantiveram-se com viabilidade acima de 90%, por um ano (Rosa & Ferreira, 2001). Sob temperatura de $3 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante seis meses, a germinação aumenta, porém o vigor reduz (Lopes et al., 2007). De acordo com Medeiros & Eira (2006), *B. forficata* é uma espécie cujas sementes apresentam comportamento tolerante à dessecação.

Para a espécie em questão, *B. forficata*, existe uma carência de estudos que relacionem a germinação aos fitormônios que regulam seus processos. Os hormônios ácido abscísico (ABA) e giberelina (GA) estão intimamente ligados à germinação. Cadman et al. (2006) caracterizam esses hormônios como responsáveis pela dormência e regulação do processo de germinação. As GAs estão envolvidas no controle da hidrólise de reservas, através da síntese *de novo* da α -amilase, e da hidrólise das paredes celulares durante o alongamento do eixo

embrionário, e podem atuar na indução de endo- β -mananase e endo- β -manosidase (Bewley et al., 2000; Silva et al., 2004).

2.3 Aspectos da tolerância à dessecação em sementes

A habilidade para se reidratar com sucesso depois da remoção de 80% a 90% da água protoplásmica, conduzindo o conteúdo de água abaixo de $0,3 \text{ g.g}^{-1}$ (ou 23% em base úmida), é caracterizada como tolerância à dessecação (Hoekstra et al., 2001).

As sementes ortodoxas representam grande parte das espécies, às quais suportam dessecação a graus de umidade de até 5%. As produtoras de sementes classificadas como intermediárias, toleram dessecação a graus de umidade de até 10% a 12,5%. Enquanto outras possuem sementes conhecidas como recalcitrantes, que não toleram dessecação a graus de umidade inferiores a 15% ou 20% (Hong et al., 1996). As sementes ortodoxas, intermediárias e recalcitrantes, que eram abordadas apenas qualitativamente, passaram a ter um enfoque quantitativo (Walters, 2000), levando em consideração a magnitude da tolerância à dessecação entre as sementes altamente sensíveis e as que suportam a perda de maior parte de água presente (Berjak & Pammenter, 2000).

Segundo Castro et al. (2004), na maioria das sementes denominadas ortodoxas, o desenvolvimento pode ser dividido em três fases confluentes: histodiferenciação, maturação e secagem.

As sementes ortodoxas adquirem a habilidade de germinar e tornam-se tolerantes à dessecação após a histodiferenciação. As sementes recalcitrantes sofrem histodiferenciação até certo ponto de forma semelhante às sementes ortodoxas, que é seguida por uma fase de acumulação de reservas. Porém, o padrão de desenvolvimento em sementes recalcitrantes, apresenta, de forma diferencial, com acumulação de matéria seca até o momento da dispersão (Lin & Chen, 1995).

A diminuição no conteúdo de água ao final do desenvolvimento é acompanhada por um aumento na tolerância à dessecação na maioria das sementes recalcitrantes. Isso foi demonstrado em espécies como *Acer pseudoplatanus* (Hong & Ellis, 1992), *Quercus robur* (Finch-Savage, 1992), *Aesculus hippocastanum* (Pritchard, 1991; Farrant et al., 1997), e *Machilus thunbergii* (Lin & Chen, 1995).

A água, como fator fundamental da semente, participa de vários eventos metabólicos relacionados à estabilidade de membranas, bem como na conformação de proteínas. Quando a água é removida abaixo do limite suportado pela célula, podem ocorrer, danos aos microtúbulos (Faria et al., 2005); aumento da concentração dos solutos; alteração do pH intracelular; aceleração de reações degenerativas; desnaturação de proteínas e perda da integridade de membranas (Sun & Leopold, 1997).

Berjak & Pammenter (2003) afirmam que em função da desidratação pode ocorrer perda de viabilidade das sementes devido a, basicamente, dois aspectos: desequilíbrio do metabolismo durante a desidratação e perda da integridade das estruturas intracelulares.

Alguns mecanismos de proteção têm sido reportados para aquisição de tolerância à dessecação e manutenção de viabilidade durante o armazenamento, como características físicas intracelulares. Dentre essas características, destacam-se: a redução do grau de vacuolização, ou diminuição em volume, deposição de reservas insolúveis (proteínas), operação eficiente de enzimas antioxidantes, presença de moléculas anfipáticas, revestimento de corpos lipídicos por proteínas, desdiferenciação intracelular, presença e operação de sistemas de reparo durante a embebição (Berjak & Pammenter, 2000; Hoekstra et al., 2001).

Em *Quercus robur* (Finch-Savage et al., 1992), o aumento na tolerância à dessecação durante o desenvolvimento das sementes, foi acompanhado por um

aumento na quantidade de proteínas termoresistentes, pertencentes à família das desidrinas e ABA. Entretanto, em sementes em desenvolvimento de *Machilus thunbergi*, Lin & Chen (1995) verificaram que a concentração de ABA foi reduzida ao final do desenvolvimento, enquanto a tolerância à dessecação aumentava, sugerindo que o ABA não induziu a tolerância à dessecação (Zeng et al., 2003).

Teoricamente, a tolerância à dessecação tende a aumentar com o número de mecanismos de proteção em atividade, de tal modo que, provavelmente, exista um gradiente de tolerância dependente da interação efetiva entre os mecanismos que estão presentes (Berjak & Pammenter, 2000). E ainda, a ausência ou operação ineficiente de um ou mais desses processos, ou mecanismos, poderiam determinar a sensibilidade à dessecação nas sementes recalcitrantes (Berjak & Pammenter, 2000).

2.4 Sementes ortodoxas como modelo para estudos da recalcitrância

A baixa longevidade, a dificuldade de armazenamento das sementes frescas e o fato das espécies arbóreas poderem variar a quantidade de sementes produzidas, alternando anos de produção maciça com anos de baixa ou nenhuma produção, são os processos que mais dificultam o estudo de espécies recalcitrantes (Bray, 2002).

Quando as sementes tolerantes à dessecação são embebidas, elas perdem essa habilidade e tornam-se sensíveis à dessecação como aquelas recalcitrantes, o que sugere um modelo para estudo de sementes recalcitrantes (Sun, 1999; Vieira, 2008). A radícula é a primeira parte do vegetal a perder a tolerância à dessecação, logo após a protrusão (Buitink et al., 2003).

Bruggink & Toorn (1995), Vieira (2008) e Martins (2009), trabalhando com reindução de tolerância à dessecação em sementes ortodoxas com uso de PEG e ABA, conseguiram ter sucesso, demonstrando a capacidade de sair de

uma situação de intolerância à dessecação passando para uma fase de restabelecimento da tolerância.

A vantagem de utilizar sementes ortodoxas é o contínuo suprimento de material experimental e a facilidade de restabelecimento da tolerância à dessecação após sua perda por meio de estresse osmótico controlado (Bruggink & Toorn, 1995). Muitos processos fisiológicos a nível celular e molecular que ocorrem durante a perda da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas podem ser similares àqueles responsáveis pela sensibilidade à dessecação evidenciada nas sementes recalcitrantes.

Martins (2009) e Vieira (2008) trabalharam com embriões de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata*. Depois de germinadas, as sementes foram secas a 7% de umidade relativa, e colocadas em condições ideais de germinação e tiveram 80% de sobrevivência para *T. impetiginosa* e 57,6% para *A. petiolata*. Das diferentes partes da plântula, a radícula foi a parte que sofreu remoção de água em um tempo mais curto. Porém Guimarães (2009) trabalhando com sementes de *Peltophorum dubium* e Oliveira (2009) com sementes de *Leucaena leucocephala* observaram que essas espécies, apesar de serem ortodoxas, perdem a tolerância à dessecação após germinadas.

2.5 Reindução da tolerância à dessecação pós-protrusão da radícula em sementes

Potenciais hídricos negativos, especialmente relacionados com o processo de embebição pela semente, são capazes de inviabilizarem a sequência de eventos bioquímicos durante os períodos pré e pós-germinativos dependentes da absorção de água (Hebling, 1997).

A aplicação de tratamentos osmóticos pode conduzir a um restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas sensíveis à dessecação. Bruggink & Toorn (1995) demonstraram que sementes germinadas

de *Cucumis sativus* L. e *Impatiens walleriana* Hook., e secas depois de incubadas em soluções contendo ABA e polietilenoglicol (PEG 8000), a um potencial osmótico de -1,5 MPa, durante 7 dias a 8°C, sobreviviam quando reidratadas.

O emprego de solução osmótica de PEG à -1,7 MPa destaca a capacidade das plântulas de *T. impetiginosa* e *A. petiolata* quanto à reindução de tolerância à dessecação. O efeito do ABA combinado com PEG -1,7 MPa, e choque quente aumentam a capacidade de restabelecimento da tolerância à dessecação nessas espécies (Vieira, 2008). As evidências indicam que a condição osmótica gerada pela aplicação do PEG associada ao ABA proporciona a ativação de genes relacionados aos mecanismos de tolerância, restabelecendo-a novamente (Buitink et al., 2003).

O uso de PEG como causador de estresses hídricos em embriões de sementes constitui-se numa ferramenta primordial para simular as condições ao final da maturação, reduzindo ao máximo a umidade das sementes (Stasolla et al., 2003). Essas situações de estresses, gerados pela aplicação de PEG, podem ser melhores esclarecidas através do estudo de padrões protéicos antes e depois de serem submetidas a tal condição (Boudet et al., 2006).

A aplicação de técnicas que envolvem PEG + ABA tem revelado excelentes resultados. O ABA, além de inibir o desenvolvimento do eixo embrionário (germinação precoce), contribui para a deposição de proteínas de reserva. Esses resultados podem ser comprovados por trabalhos citados na literatura relacionados à aplicação exógena de ABA em sementes recalcitrantes (Bewley & Black, 1994).

A indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas, provavelmente, esteja relacionada com a ativação de genes responsáveis por vários sistemas de reparo que agem sinergicamente (Boudet et al., 2006). Eles incluem síntese de moléculas protetoras, e habilidade de evitar injúrias causadas

por radicais livres durante a seca, reduzindo o metabolismo de forma coordenada (Leprince et al., 2000; Walters et al., 2002; Avelange-Macherel et al., 2006).

Para melhores esclarecimentos a respeito dos eventos que ocorrem em sementes recalcitrantes, as pesquisas atuais têm buscado elucidar os mecanismos moleculares que controlam esses eventos relacionados e a forma como são ativados durante o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas (Faria et al., 2005; Avelange-Macherel et al., 2006; Boudet et al., 2006; Buitink et al., 2006; Toldi et al., 2008).

3 METODOLOGIA

Os experimentos foram executados no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento do Departamento de Biologia - Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras. Foram também utilizadas as infraestruturas do Laboratório de Sementes (Departamento de Agricultura), Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (Departamento de Fitopatologia) e Laboratório Central de Ciência dos Alimentos (Departamento de Ciências dos Alimentos), todos da Universidade Federal de Lavras.

3.1 Coleta, beneficiamento e caracterização de lotes das sementes

As sementes de *B. forficata* foram coletadas de indivíduos encontrados no cerrado de Boa Esperança, a qual está localizada no sul de Minas Gerais, na microrregião do baixo Sapucaí (21°05 S e 45°35' O). Seu relevo é constituído pela serra da Boa Esperança, sobressaindo o pico do Branquinho com altitude de 1.392 metros. O clima do município é tropical úmido e a vegetação é abundante, constituída de matas, cerrados e culturas perenes e anuais. O solo é predominantemente argiloso e com alguma parte arenosa, típica do cerrado, classificado como latossolo. Os recursos hídricos de Boa Esperança são constituídos de rios e ribeirões, afluentes da represa de Furnas.

A coleta ocorreu no período de dispersão entre os meses de fevereiro e março de 2009, quando os frutos apresentavam coloração marrom. Após a coleta, procedeu-se o beneficiamento manual, retirando as sementes dos frutos, descartando as predadas, e mantendo-as sob temperatura ambiente até atingir 20% de umidade. As sementes foram armazenadas em câmara fria a 5°C com 50% de umidade, em caixas gerbox, de acordo com Rosa & Ferreira (2001).

Após o beneficiamento, as sementes foram separadas em quatro lotes, denominados lotes 1, 2, 3 e 4, seguindo critérios de peso, tamanho, coloração e

germinação. Para pesagem e medições, foi utilizado, respectivamente, uma balança de precisão e um paquímetro manual. A caracterização da cor foi feita visualmente distinguindo as sementes em verde claro, verde escuro, marrom claro e marrom escuro. Para essa classificação as sementes receberam notas de acordo com uma coloração mais clara até uma coloração mais escura. As notas variaram de 1 a 4, sendo: 1 - verde claro, 2 - verde escuro, 3 - marrom claro e 4 - marrom escuro. Os testes de germinação foram feitos a 30°C, em germinador do tipo Mangesdorf, com luz constante e 50% de umidade (Rosa & Ferreira, 2001). Para a caracterização do peso e tamanho, foram utilizados 4 repetições de 10 sementes cada, e para o teste de germinação usou-se 4 repetições de 25 sementes para cada tratamento.

Anteriormente ao teste de germinação, as sementes foram desinfestadas com álcool 70% por dez segundos, hipoclorito de sódio a 1% por três minutos e fungicida Cercobin® 1% por dez minutos (Souza, 2009). As sementes foram semeadas em placa de petri (8,5 cm) sob dupla camada de papel Germitest®, com 4 mL de H₂O destilada, mantidas em germinador Mangesdorf, a 30°C, 50% de umidade e luz constante. As sementes foram consideradas germinadas quando ocorria a protrusão radicular.

3.2 Determinação do grau de umidade, de peso de mil sementes, de curva de embebição e de superação de dormência

Para determinação do grau de umidade, as análises foram feitas em estufa a 105 ± 3 °C, durante 24 horas, segundo as instruções das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), utilizando-se quatro repetições com 1 grama de sementes cada. Os resultados foram expressos em percentagem de umidade pela base úmida.

O peso médio de mil sementes foi determinado utilizando-se oito amostras de 100 unidades cada (Brasil, 2009).

Para a obtenção da curva de embebição, as sementes de *B. forficata* foram desinfestadas, e em seguida dispostas em placas de Petri de 8,5 cm com dupla camada de papel de filtro, com 4 mL de água destilada. Foram utilizadas quatro repetições com 10 sementes. A embebição foi avaliada de hora em hora, durante as 12 primeiras horas, e nas subseqüentes horas, de 6 em 6 horas, até 48 horas.

Para verificar a presença de resistência tegumentar foi feito um tratamento pré-germinativo utilizando escarificação mecânica das sementes, retirando parte do tegumento. Como controle foram utilizadas sementes com o tegumento intacto.

Os testes de desinfestação, germinação e avaliação da germinação seguiram a metodologia descrita no item 3.1.

3.3 Influência dos fitormônios ABA e GA no processo germinativo

A influência dos fitormônios ácido abscísico e giberelina no processo germinativo foi testada incubando-se as sementes em soluções de giberelina (GA1) nas concentrações de 1 mM, 10 mM e 100 mM, paclobutrazol nas concentrações de 1 mM, 10 mM e 100 mM e fluridona nas concentrações de 1 mM, 10 mM e 100 mM.

A solução estoque de GA foi preparada em KOH, 1 N, com pH ajustado para 7 com HCl. As soluções estoque dos inibidores fluridona e paclobutrazol foram preparadas a partir da dissolução em 0,1% de acetona (v/v). Para verificar possíveis alterações no processo de germinação causadas pela acetona, utilizada na dissolução dos inibidores, foi feito um teste com água destilada e acetona 0,1%.

Para cada tratamento foram utilizadas 4 repetições de 25 sementes. Todas as sementes foram escarificadas anteriormente à instalação dos testes. A

germinação foi avaliada por 7 dias, e as sementes foram consideradas germinadas após a protrusão da radícula.

A percentagem de germinação foi calculada pela seguinte fórmula: $\%G = (\sum n_i \cdot N - 1) \cdot 100$. Em que $\sum n_i$ é o número total de sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas para germinar (N-1). O índice de velocidade de germinação foi calculado pela seguinte fórmula: $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$, em que G é o número de sementes germinadas e N é o número de dias após a sementeira.

As condições de germinação e desinfestação seguiram as especificadas no item 3.1. A escarificação seguiu a metodologia descrita no item 3.2.

3.4 Curva de secagem e reindução da tolerância à dessecação após a germinação das sementes

Para curva de secagem foram utilizadas quatro repetições de 10 sementes cada, previamente escarificadas. As sementes foram pesadas em balança de precisão, desinfestadas e colocadas para embeber em placa de petri com duas camadas de papel germitest® e 4 mL de H₂O destilada. Durante as primeiras 7 horas, as pesagens foram feitas de hora em hora, e as subsequentes feitas de oito em oito horas, até 100 horas. Após esse período as sementes germinadas foram transferidas para placas de petri contendo solução de -1,4 MPa de PEG. As pesagens foram feitas em intervalos de 24 horas, até 72 horas após incubação. Após esse período, as sementes germinadas foram retiradas do PEG -1,4MPa e colocadas em caixas plásticas de 10 x 20 x 30cm, contendo sílica, sendo o ambiente mantido a 20% de umidade. Subsequente, as pesagens foram feitas até as sementes germinadas apresentarem 20% de umidade, ou seja, sua umidade após a dispersão.

Para os estudos de reindução de tolerância à dessecação as sementes foram colocadas em placas de petri sob duas camadas de papel Germitest® com

4 mL de água destilada, mantidas em germinador Mangesdorf a 30°C, 50% de umidade e luz constante. Após protrusão radicular, foram selecionadas as radículas de 1 mm, 2 mm, 3 mm e 4 mm, com auxílio de um paquímetro, e posteriormente à seleção, as sementes germinadas foram divididas em dois lotes, ambos contendo as sementes com os quatro comprimentos radiculares.

O primeiro lote foi submetido à dessecação em placas de petri sob sílica gel, em ambiente a 20% de umidade, em caixa plástica fechada a 20°C, conforme metodologia descrita por Buitink et al. (2003), Faria et al. (2005), Viera (2008) e Martins (2009). O grau de umidade foi monitorado durante o experimento, até que as sementes apresentassem 20% de umidade.

Para o segundo lote, foram testadas três diferentes concentrações de PEG 6000 de -1,4; -1,7 e -2,0 MPa, de acordo com Michel (1983). As sementes germinadas permaneceram em PEG, em diferentes concentrações, por 72 horas, a 5°C, em ausência de luz. Após este período as sementes germinadas foram submetidas a secagem descrita anteriormente, sob sílica em ambiente a 20% de umidade, até que atingissem 20% de umidade.

As sementes germinadas secas, de ambos os lotes, foram postas para germinar conforme item 3.1. As sementes germinadas que reassumiram o processo germinativo e retomaram o crescimento normal foram consideradas tolerantes à dessecação, segundo metodologia descrita por Buitink et al. (2003). Também foram contabilizadas as sementes com morte da raiz primária e posterior desenvolvimento de raiz adventícia.

3.5 Análise de crescimento

As sementes germinadas que retomaram o crescimento após a reindução da tolerância à dessecação, provenientes da secagem direta em sílica e da secagem antecedida por PEG, foram transplantadas para bandejas de polietileno com substrato Plantmax®, e mantidas em sala de crescimento por 60 dias, com

luz constante, e umidade e temperatura ambiente. Foram avaliados: o número de folhas; tamanho de raiz e de caule; matéria seca das raízes, do caule e das folhas. Para a obtenção da matéria seca, o material vegetal fresco foi acondicionado em sacos de papel, mantidos em estufa sob ventilação forçada a 65°C durante 72 horas, e posteriormente pesado em balança de precisão.

3.6 Composição química

Para a determinação da composição química foram utilizadas sementes germinadas com radículas de comprimentos 2 mm, 3 mm e 4 mm, secas em estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas. Os componentes químicos analisados foram: amido, açúcares totais, proteínas e lipídeos. Essas análises seguiram as metodologias descritas na sequência.

3.6.1 Determinação do teor de amido

A determinação do teor de amido foi realizada a partir de quatro repetições de 2 gramas de sementes moídas em moinho do tipo WILLEY. Após lavagem em etanol, as amostras foram centrifugadas para a obtenção de extrato alcoólico. Com o resíduo da centrifugação, realizou-se a hidrólise ácida para a determinação do teor de amido segundo o método descrito por McCready et al. (1950).

3.6.2 Determinação do teor de açúcares

Os açúcares totais foram extraídos pelo método de Lane-Enyon (Association of Official Agricultural Chemists – AOAC, 1990) e determinados pela técnica de Somogy, adaptada por Nelson (1944). Para a determinação dos açúcares, foi realizada a hidrólise ácida da sacarose, acidificando o filtrado anterior com 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado. Em seguida, as amostras foram levadas para banho-maria fervente por 15 minutos e, posteriormente,

neutralizadas em solução saturada de carbonato de sódio. Seguiu-se a desproteínização do extrato com água destilada, solução de hidróxido de bário 0,3 N e solução de sulfato de zinco 5%. Os tubos foram agitados em vórtex e seus conteúdos filtrados, para leitura de absorvância feita a 510 nm.

3.6.3 Determinação do teor de proteína

Na determinação da fração proteica, pesaram-se quatro repetições de 0,1 grama de material desengordurado, sendo a amostra transferida para tubo de digestão aos quais foram adicionados 1,5 gramas de sulfato de potássio e 0,3 grama de sulfato de cobre, sendo, posteriormente, acrescentados 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram levados para o bloco digestor a 50 °C, com aumento progressivo lento da temperatura até atingir 370 °C. A mistura permaneceu no bloco digestor até a solução apresentar cor verde-clara. Após esfriamento, foram adicionados 30 mL de água destilada, seguindo-se de agitação até dissolver o resíduo. Na determinação do teor de nitrogênio total, foi utilizado o método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1990), aplicando-se o fator 6,25 para o cálculo do teor de proteína bruta em base de matéria seca.

3.6.4 Determinação do teor de lipídeos em extrato etéreo

Para a determinação da fração lipídica foram utilizadas quatro repetições de 2 gramas de sementes frescas. A extração foi realizada com éter etílico em extrator contínuo de Soxhlet, utilizando reboiler previamente seco e pesado. Após a extração, o reboiler contendo o resíduo foi levado para a estufa a 65 °C, por 24 horas, sendo posteriormente pesado, e os resultados foram expressos em percentagem de lipídeos por matéria seca (AOAC, 1990).

3.7 Análises ultraestruturais do eixo embrionário de sementes germinadas

A avaliação ultraestrutural das células da radícula foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo EVO 40). Para as análises foram selecionadas sementes sem germinar; germinadas; germinadas com posterior secagem em sílica; germinadas e incubadas em PEG; germinadas, incubadas em PEG e secas em sílica. As sementes germinadas foram coletadas com 2 mm de comprimento, devido a maior expressividade quanto a reindução de tolerância à dessecação, descrita no item 4.4. Os tratamentos descritos anteriormente foram coletados e fixados em solução Karnovsky. Após fixação realizou-se criofratura retirando-se cerca de 1 mm do ápice radicular. Os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, desidratados em gradiente progressivo de acetona pelo ponto crítico, e metalizados em evaporador de ouro.

3.8 Efeito do ABA e do choque quente na reindução de tolerância à dessecação

Foram testadas três concentrações de ABA (1 mM, 10 mM e 100 mM), em conjunto com PEG -1,4 MPa. No tratamento controle, as sementes germinadas foram incubadas apenas em PEG -1,4 MPa. A escolha dessa concentração foi devido a sua maior expressividade quando a reindução da tolerância à dessecação, descrita no item 4.4. As sementes germinadas, com diferentes comprimentos de radícula (2 mm, 3 mm e 4 mm), foram embebidas nas soluções durante 72 horas, a 5°C no escuro.

A dessecação foi efetuada sob condições controladas de umidade e temperatura, 20% e 5°C, respectivamente, até que as sementes germinadas atingissem 20% de umidade, próxima da original, ou seja, aquela verificada após a dispersão.

Depois de desidratadas, as sementes foram distribuídas em placas de Petri com 4 mL de água destilada contendo uma camada dupla de papel Germitest® e colocadas para germinar conforme item 3. 1.

O efeito do choque quente na sobrevivência de sementes germinadas foi determinado incubando as sementes com diferentes comprimentos de radícula (2 mm, 3 mm e 4 mm) durante uma ou duas horas, a 45°C seco, e uma hora em 45°C em PEG -1,4 MPa. Em seguida, as sementes germinadas foram transferidas para solução de PEG -1,4 MPa, a 5°C, por 72 horas. Após, as sementes germinadas foram secas a 20% de umidade em ambiente a 20°C. Posteriormente à secagem, as sementes germinadas foram submetidas às condições ótimas de germinação para verificação da retomada do processo germinativo (Buitink et al., 2003).

3.9 Análise estatística

Os dados de germinação e IVG de todos os testes, bem como dos testes de reindução de tolerância à dessecação, foram submetidos à análise de variância (ANAVA) seguidos de teste de Skott Knott a 5% de significância (Sokal & Rohlf, 1981). A análise de crescimento e a composição química das sementes foram submetidas a ANAVA seguidas de teste de Tukey a 5% de significância. Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica de lotes de sementes de *B. forficata*

Foram observadas variações nas sementes de *B. forficata* em relação a peso, tamanho, coloração e germinação (%G) (Tabela 1). O lote 1 destaca-se em relação ao peso e tamanho das sementes, porém, nesse lote, a %G é baixa quando comparada ao lote 2. As características de tamanho e de peso da semente são de grande importância, pois fornecem informações sobre o acúmulo de reservas durante a maturação das sementes, estando esse acúmulo de reservas estreitamente ligado à tolerância à dessecação (Chin & Roberts, 1989; Leprince et al., 1993).

O lote 2 apresenta sementes com menor acúmulo de biomassa, ou seja, menor peso (Tabela 1) em relação ao lote 1, no entanto em função da maior %G esse lote foi utilizado nos experimentos posteriores.

TABELA 1 Diferentes lotes de sementes de *B. forficata* avaliados quanto a coloração, tamanho, peso e percentagem de germinação (%G).
Legenda: 1- marrom escuro; 2- marrom claro; 3- verde escuro e 4- verde claro.

Variáveis Analisadas	Classificação dos Lotes			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Coloração	1	2	3	4
Tamanho (mm)	9,3 ^a	6,9 ^c	8,64 ^b	4,90 ^d
Peso (g)	0,94 ^a	0,40 ^b	0,12 ^c	0,04 ^d
%G	45 ^b	80 ^a	12,5 ^c	0 ^c

*As médias seguidas pelas mesmas letras, na linha, não diferem entre si pelo teste Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

4.2 Grau de umidade, peso de mil sementes, curva de embebição e superação de dormência

O grau de umidade das sementes de *B. forficata* foi determinado, tomando-se por referência a base úmida, em 20%. Utilizando-se desse dado, as sementes de pata de vaca seriam classificadas como recalcitrantes (Hong et al., 1996). Porém, para essa classificação não são considerados apenas dados quantitativos, mas também dados qualitativos, como a capacidade de ser armazenada ou de ser tolerante à dessecação. Medeiros & Eira (2006) classificaram as sementes de *B. forficata* como tolerantes à dessecação, e Rosa & Ferreira (2001) demonstraram que mesmo quando armazenadas por 1 ano as sementes matem-se viáveis quanto à germinação.

O percentual de umidade das sementes observado neste trabalho, 20%, é semelhante ao encontrado por Lopes et al. (2007) que foi de 19%.

O peso de mil sementes foi de 88,23 gramas, o que corresponde a cerca de 11.300 sementes por quilograma. Esses dados diferem dos encontrados por Lopes et al. (2007), onde o peso de mil sementes equivale a 155 gramas, com 6.400 sementes por quilo, e de Rosa & Ferreira (2001), que encontraram valores de peso de mil sementes de 160 gramas. Essas diferenças podem ser devido a diferenças no grau de umidade e maturidade fisiológica das sementes entre os diferentes trabalhos. Outro fato que poderia explicar essas diferenças seria a região de coleta. Lopes et al. (2007) adquiriu suas sementes nas regiões de Viçosa (MG), Aracruz e Ibitirama (ES), e Rosa & Ferreira (2001) em Porto Alegre (RS). Martins (2009) trabalhando com *T. impetiginosa* demonstrou que existe uma estreita relação entre o local de coleta e o peso das sementes, e que o regime hídrico da região é um fator que pode levar a um maior ou menor acúmulo de biomassa. Observando dados de comprimento das sementes utilizadas no presente estudo (6,9 mm), verifica-se que essas são menores que as sementes utilizadas por Lopes et al. (2007), com cerca de $10 \pm 0,5$ mm.

A curva de embebição (Figura 2) não apresentou padrão trifásico, comum na maioria das Fabáceas. As sementes utilizadas para a determinação dessa curva não foram submetidas a qualquer tratamento visando a quebra de dormência. Assim, com 48 horas haviam germinado cerca de 40% das sementes, e o restante das sementes ainda encontrava-se na fase II da embebição. Porém após 48 horas de embebição é possível observar uma inclinação ascendente na curva, o que indica que provavelmente o padrão de embebição desta espécie siga o padrão trifásico.

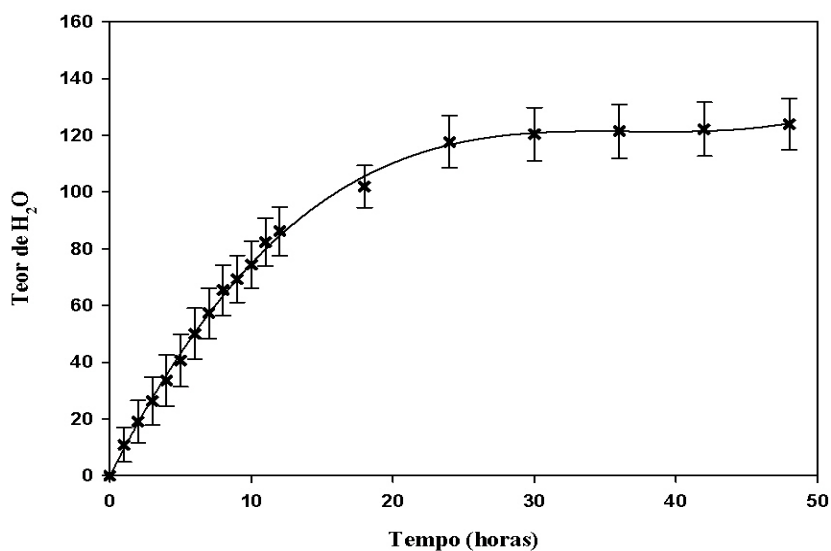


FIGURA 2 Curva de embebição de sementes de *B. forficata* a 30°C, durante 48 horas. As barras indicam o desvio padrão da média.

Os resultados obtidos para *B. forficata* corroboram com Santos et al. (2008), que trabalharam com *Senna carymbosa* (fedegoso), da família das Fabaceae, onde os autores também não observaram o padrão trifásico na curva

de embebição, sendo que sementes de fedegoso também possuem impermeabilidade tegumentar.

As sementes de *B. forficata* apresentaram impermeabilidade tegumentar (Figura 3). O método de escarificação mecânica empregado proporcionou uma germinação de 76%, enquanto as sementes intactas apresentaram apenas 44% de germinação (Figura 3). Na família das Fabaceae, as sementes apresentam, em sua maioria, a dormência tegumentar, fato controlado geneticamente e que varia entre espécies e variedades, sob influência das condições ambientais durante a maturação e o armazenamento das sementes (Guerra et al., 1982).

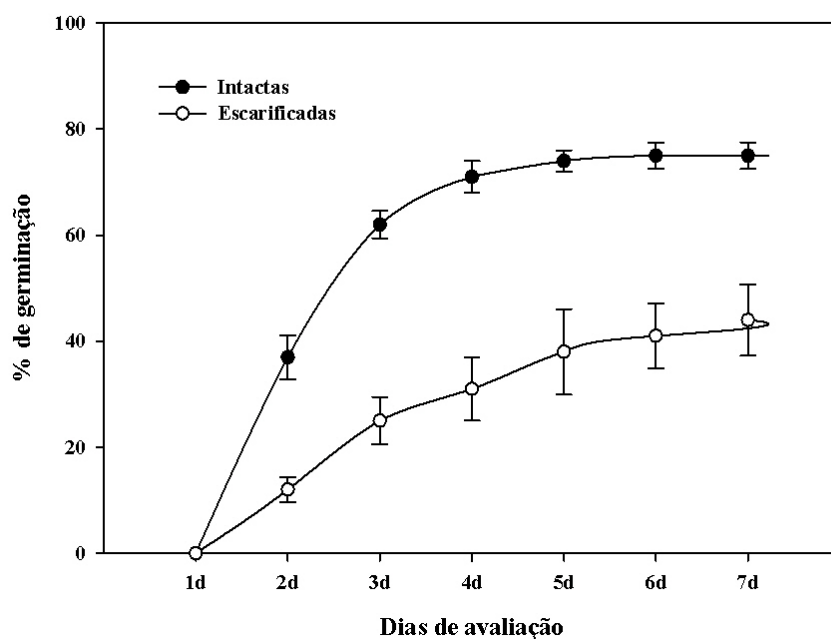


FIGURA 3 Percentagem de germinação, após sete dias, em sementes intactas e sementes com escarificação do tegumento. As barras indicam o desvio padrão das médias.

O IVG também apresentou diferença entre os tratamentos, sendo de 23,73 para sementes escarificadas e 10,7 para sementes intactas.

Lopes et al. (2007) encontrou percentagens de germinação próximas às encontradas neste estudo, sendo de 44% para sementes intactas e 76% para sementes escarificadas. Contudo, o IVG foi menor, 2,34 e 1,36 para sementes escarificadas e sementes intactas, respectivamente. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de Lopes et al. (2007) ter feito observações em intervalos de 72 horas, por um período de até 21 dias.

4.3 Influência dos fitorreguladores ABA e GA no processo de germinação das sementes

A fluridona é um inibidor da síntese de carotenóides, clorofilas e do ácido abscísico (Benschop et al., 2005). Seu efeito na germinação de *B. forficata* não foi significativo quanto a %G nas concentrações testadas (Figura 4); entretanto, o IVG foi superior ao controle em todas as concentrações testadas (Tabela 2).

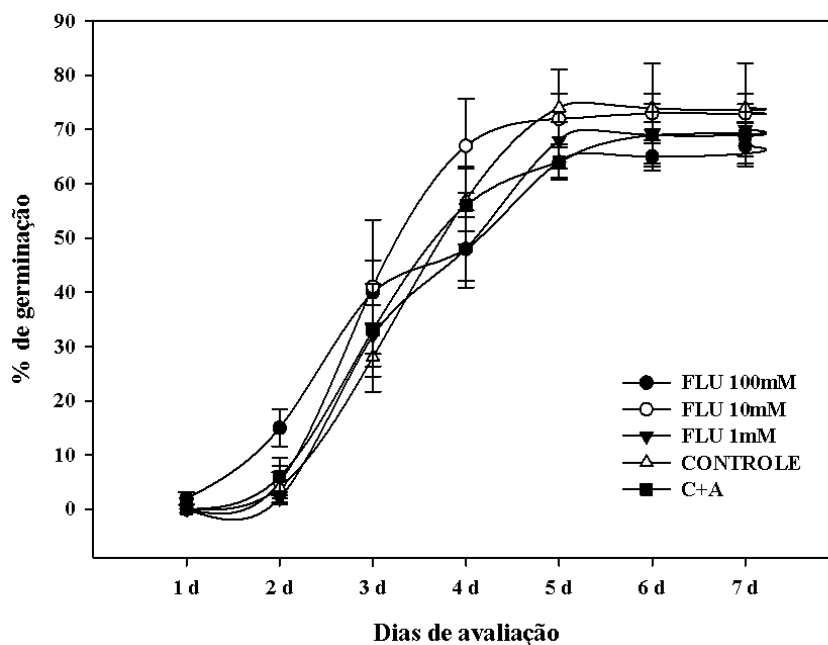


FIGURA 4 Influência de diferentes concentrações de Fluridona (1 mM, 10 mM e 100 mM) na germinação de sementes de *B. forficata*. Legenda: FLU- fluridona; Controle- água destilada; C+A- água destilada mais acetona 0,1%. As barras indicam o desvio padrão das médias.

TABELA 2 Índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *B. forficata* tratadas com Paclobutazol (PAC), Giberelina (GA), Fluridona (FLU) e em água destilada (controle), nas concentrações 1 mM, 10 mM e 100 mM.

Tratamento	Concentração		
	1mM	10mM	100mM
PAC	12,2 ^b	10,9 ^b	11,2 ^b
GA	16,9 ^a	18,2 ^a	18,3 ^a
FLU	14,7 ^a	17,5 ^a	15,6 ^a
Controle	13,6 ^b	13,6 ^b	13,6 ^b

*Letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O ABA é o hormônio responsável pela dormência de sementes em muitas espécies, e durante o processo de maturação das sementes, ele é transportado da planta mãe via floema ou sintetizado pela mesma, e se distribui em todos os tecidos das sementes (Nambara & Marion-Poll, 2003).

Vieira (2008) relata que durante o armazenamento ocorre uma diminuição dos níveis de ABA na semente. No presente estudo, as sementes permaneceram armazenadas por cerca de nove meses. As diferenças observadas entre os valores de IVG para o tratamento controle e a fluridona sugerem que havia a presença do hormônio nas sementes de *B. forficata* mesmo após o armazenamento.

A aplicação de paclobutrazol, um inibidor da biossíntese de giberelina, promoveu uma redução do IVG em relação ao controle, em todas as concentrações testadas (Tabela 2).

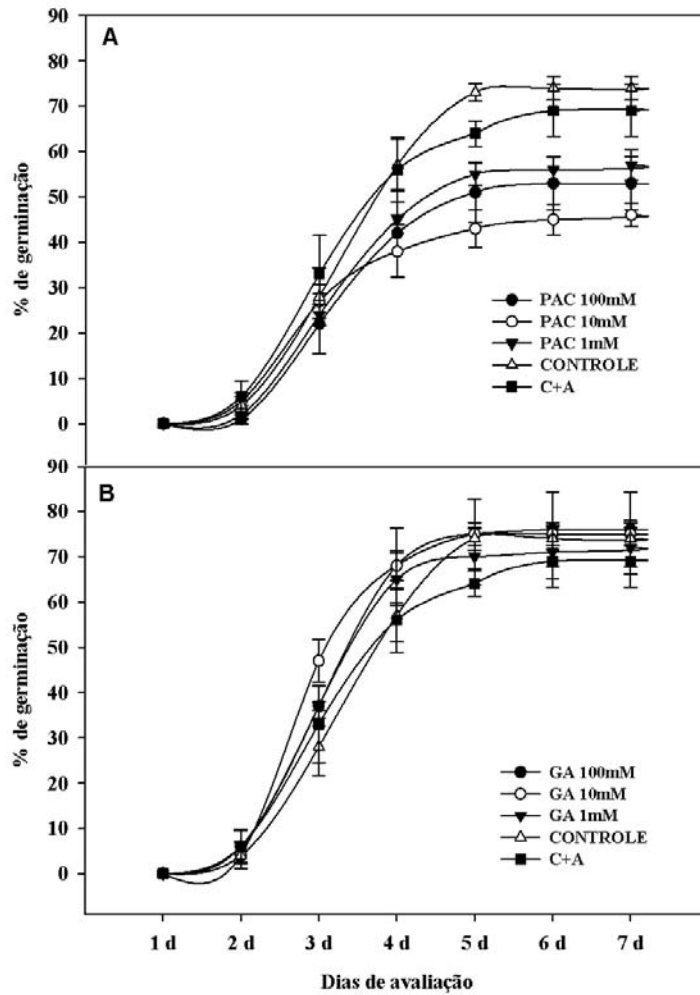


FIGURA 5 Influência do inibidor paclobutrazol (A) e da giberelina (B) na germinação das sementes de *B. forficata*. Legenda: paclobutrazol (PAC); giberelina (GA).

Debeaujon & Koornneef (2000) relatam que a síntese *de novo* de giberelina, durante o processo germinativo, ocorre após 24 horas de embebição. Apesar do paclobutrazol ter diminuído a %G (Figura 5A), as concentrações utilizadas não foram capazes de inibir completamente a germinação.

A ocorrência de germinação mesmo após a aplicação do inibidor de giberelina pode indicar a presença de giberelinas pré-existentes nas sementes de *B. forficata*. Embora o paclobutrazol iniba a biossíntese de giberelina, esse inibidor não impede a ativação de GAs pré-existentes nas sementes.

Quando adicionada giberelina, o IVG e a %G não diferiram do controle (Tabela 2 e Figura 5B). Os hormônios, de forma geral, devem estar presentes em concentrações ideais para exercerem influência no desenvolvimento das plantas e sementes (Taiz & Zeiger, 2009). Alguns mutantes deficientes em GA ou em plantas transgênicas, ocorre o abortamento das sementes logo no início da embriogênese e, mesmo com a aplicação de GA exógena, não é possível reverter essa situação devido à falta de receptores para esse hormônio (Swain & Singh, 2005). Portanto, a existência de receptores livres também constitui um fator necessário para ação da giberelina.

O fato de não ter sido observado influência da giberelina na germinação das sementes, provavelmente possa ser explicado pela presença e produção desse hormônio pela semente (Tabela 2 e Figura 5B). Portanto, quando as sementes de *B. forficata* foram submetidas a tratamentos com GA não se observou diferenças na germinação, pois toda GA necessária para esse processo foi metabolizada pela própria semente.

4.4 Reindução da tolerância à dessecação após a germinação e curva de secagem

Na Figura 6 estão representados os resultados referentes à percentagem de sobrevivência da raiz primária, após as sementes terem sido germinadas e

secas diretamente em sílica, ou secas em sílica após a incubação em PEG com concentrações osmóticas diferentes. As sementes germinadas que foram secas diretamente em sílica, em ambiente a 20% de umidade, apresentaram retomada de crescimento da radícula, considerando-se os tamanhos de até 3 mm. Todavia, a retomada do crescimento ocorreu em baixas percentagens e, apenas as sementes com radícula de 1 mm de comprimento apresentaram reindução de tolerância à dessecação acima de 50%. Em relação aos métodos de secagem empregados, o PEG a -1,4 MPa foi o que apresentou os melhores resultados quanto a reindução da tolerância à dessecação.

Teoricamente, as sementes quando embebidas, tendem a perder a tolerância à dessecação, ou seja, sua viabilidade é comprometida, de forma que, quando ocorre a protrusão da radícula, se surgir uma condição adversa no ambiente, tal como períodos de seca (desidratação), as plântulas caminham para um processo de morte do meristema radicular, como consequência da perda de tolerância à dessecação (Hong & Ellis, 1992; Buitink et al., 2003).

Entretanto, algumas pesquisas têm mostrado sucesso no restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas, em espécies como *T. impetiginosa* (Vieira, 2008; Martins, 2009), *Alliaria petiolata* (Vieira, 2008), *Medicago trunculata* (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005), *Cucumis sativus* e *Impatiens walleriana* (Bruggink & Toorn, 1995).

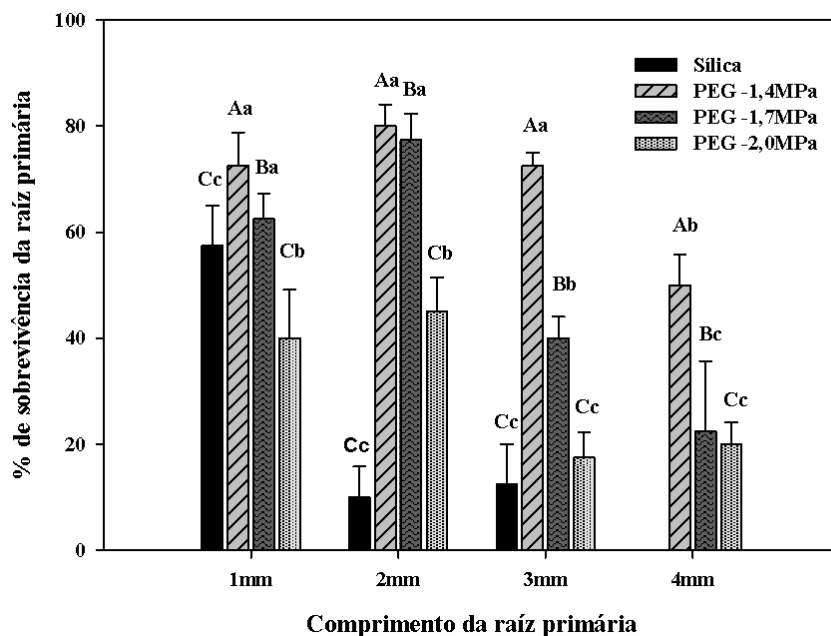


FIGURA 6 Percentagem de sobrevivência da raiz primária de *B. forficata* que retomaram o crescimento após secagem em sílica, PEG -1,4 MPa, PEG -1,7 MPa e PEG -2,0 MPa. As letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. As letras maiúsculas representam os tratamentos e as minúsculas os tamanhos de radículas, para cada comprimento de radícula. As barras indicam o desvio padrão das médias.

A solução de PEG a -1,4 MPa proporcionou a retomada do crescimento radicular primário até 4 mm, com percentagens superiores a 50%. Quanto mais negativo for o potencial osmótico da solução, mais rápida será a perda de água da semente germinada para a solução. Se a secagem ocorrer de forma lenta e nas condições ideais, aumentam as possibilidades de ocorrer a retomada do crescimento radicular após a secagem. A secagem lenta também propicia maior

homogeneidade na perda de água, proporcionando um tempo adequado e necessário para que as sementes germinadas possam fazer síntese *de novo* de moléculas e substâncias que atuam na proteção dos tecidos durante a secagem (Vieira, 2008).

Algumas espécies perdem a tolerância à dessecação durante a embebição, mesmo antes que ocorra a protrusão radicular. Esse fato caracteriza algumas espécies com elevado grau de adaptação à sobrevivência (Daws et al., 2007), ou seja, aquelas que toleram a secagem mesmo após a germinação, poderão tornar-se mais aptas a ambientes inóspitos. Guimarães (2009) e Oliveira (2009) demonstraram a incapacidade de reindução de tolerância à dessecação em sementes ortodoxas de *Peltoforum dubium* e *Leucaena leucocephala* após a germinação e secagem. Mesmo utilizando-se diferentes protocolos, não foi possível o restabelecimento da tolerância à dessecação.

Entre os potenciais osmóticos testados, a solução de PEG a -2,0 MPa proporcionou resultados inferiores quanto à sobrevivência das sementes germinadas após a desidratação, não diferindo estatisticamente da secagem direta na sílica. Alguns trabalhos utilizam o potencial -1,7 MPa (Martins, 2009; Vieira, 2008; Buitink et al., 2003), o que difere dos resultados encontrados no presente trabalho.

Faria et al. (2005) relatam em seus estudos com *Medicago trunculata* que respostas a diferentes comprimentos de radícula variam de espécie para espécie, podendo também ser em função dos procedimentos experimentais adotados, especificamente da taxa de secagem e do potencial osmótico da solução utilizada.

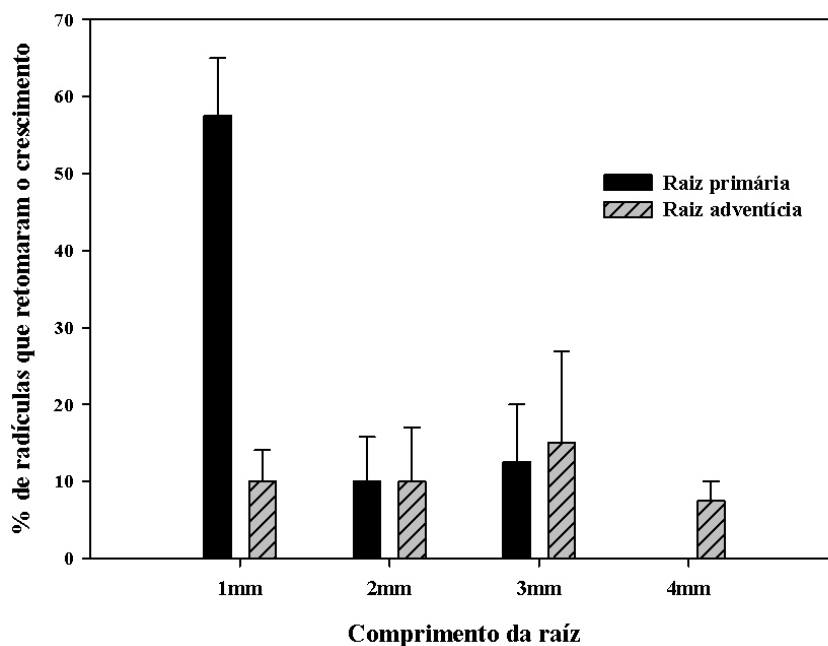


FIGURA 7 Percentagem de radículas de *B. forficata* que retomaram o crescimento da raiz primária, e percentagem de formação de raiz adventícia após a secagem direta em sílica. As barras indicam o desvio padrão das médias.

A tolerância à dessecação em sementes germinadas é considerada, quando após a secagem há retomada do crescimento da raiz primária. Essa condição foi vista em baixa percentagem quando as sementes germinadas foram secas na ausência de PEG. Na Figura 7, estão apresentados os dados de retomada do crescimento da raiz primária e da morte da raiz primária com o aparecimento de raiz adventícia. A raiz adventícia foi visualizada apenas quando as sementes foram secas diretamente em sílica, sem prévia incubação em PEG.

Na curva de secagem (Figura 8) é possível observar como ocorre, primeiramente, a embebição e depois a secagem, nos três primeiros pontos em PEG -1,4 MPa, com posterior secagem em sílica. Durante a incubação em PEG -1,4 MPa, houve uma perda de aproximadamente 15% do conteúdo de água da semente durante as 72 horas. Nas subsequentes pesagens, na secagem em sílica, observou-se uma perda de 35% de água, e a semente germinada retomou seu peso inicial.

De acordo com Guimarães (2009) e Oliveira (2009) não ocorrem diferenças significativas quanto à secagem em comprimentos radiculares de diferentes tamanhos.

A curva de embebição apresentada na Figura 8 revela um padrão diferente do observado na curva de embebição contida na Figura 4, fato esse decorrente do uso de sementes previamente escarificadas. Embora, utilizando-se sementes escarificadas, não foi possível verificar um padrão trifásico para germinação de sementes de *B. forficata*.

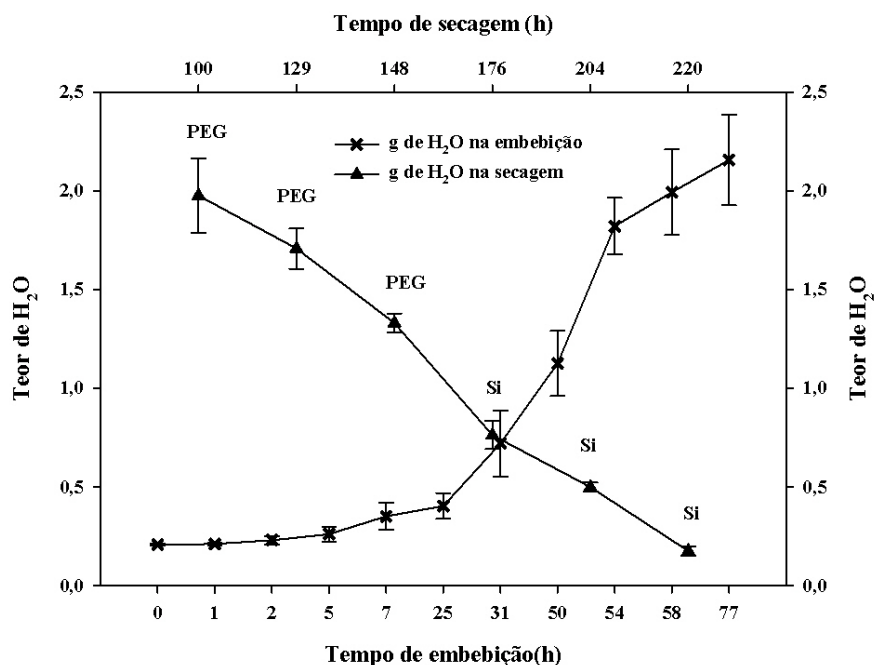


FIGURA 8 Curva de embebição e secagem de *B. forficata* em sementes com escarificação do tegumento. As barras indicam o desvio padrão das médias. Legenda: PEG- polietilenoglicol; Si- sílica.

4.5 Análise de crescimento

Nas Figuras 9 e 10 estão contidos os dados de crescimento das plantas, por 60 dias, provenientes das sementes germinadas, que retomaram o seu crescimento após a secagem em sílica e secagem em sílica precedida por incubação em PEG -1,4 MPa.

Na Figura 9, observa-se que não houve diferença significativa entre o tamanho do caule na secagem direta em sílica e na pré-incubação em PEG -1,4 MPa. Contudo, o número de folhas e o tamanho da raiz do tratamento sílica foram significativamente inferior ao tratamento PEG.

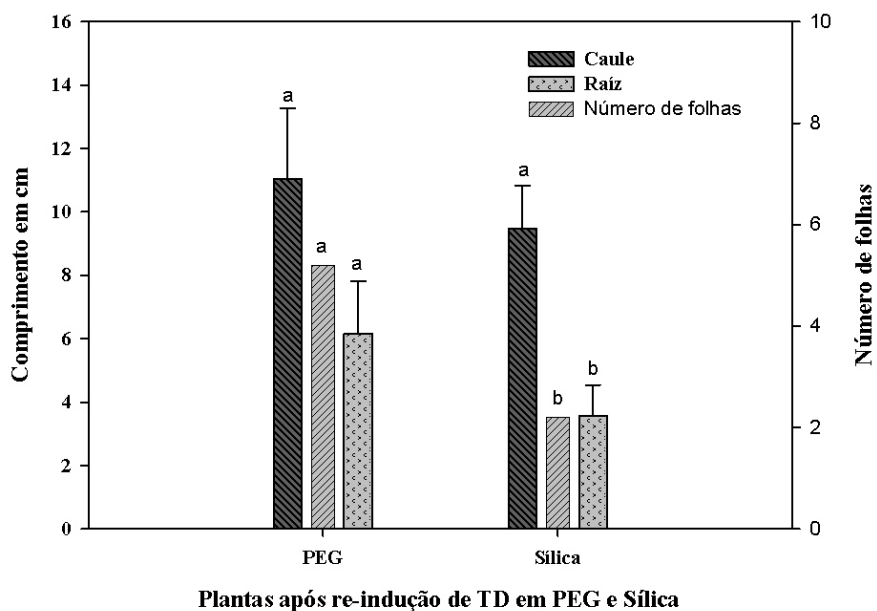


FIGURA 9 Número de folhas, tamanho do caule e da raiz em plantas provenientes de sementes secas em sílica, e secas em PEG e posteriormente em sílica. As letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As barras indicam o desvio padrão das médias.

Os valores de massa seca do caule, da raiz e das folhas encontram-se na Figura 10. Nessa característica, verifica-se que todos os dados provenientes da secagem em sílica e PEG -1,4 MPa diferiram entre si, sendo os valores de massa seca em PEG superiores aos dados de secagem em sílica.

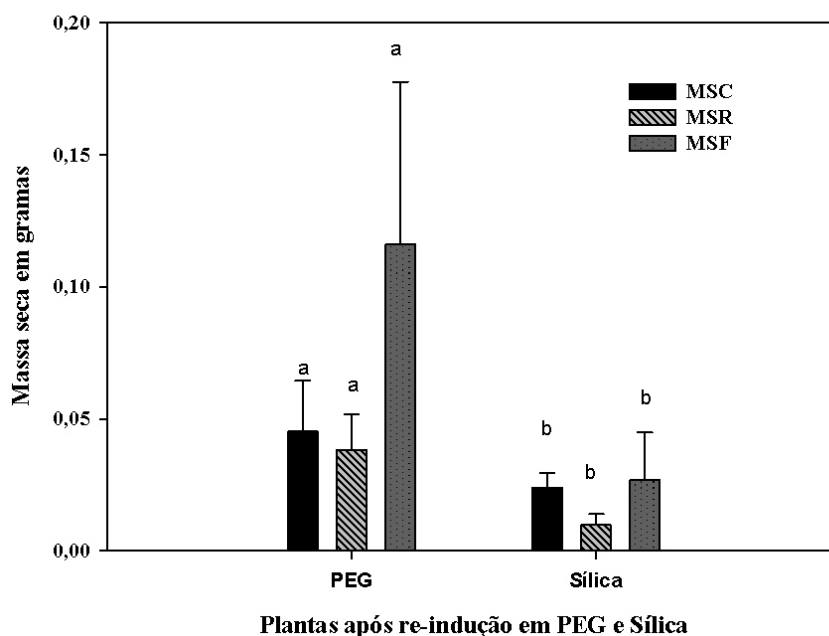


FIGURA 10 Quantidade em grammas de matéria seca acumulada na raiz, caule e folhas aos 60 dias de crescimento após a reindução da tolerância à dessecação. As letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As barras indicam o desvio padrão das médias. Legenda: MSC- massa seca do caule; MSR- massa seca da raiz; MSF- massa seca das folhas.

Kermode (1995) atribuiu a aquisição da tolerância à dessecação como parte do programa de maturação da semente, e afirma ainda que a mesma é perdida progressivamente durante a germinação, sendo a radícula o primeiro órgão a perder a tolerância à dessecação (Buitink et al., 2003). Na maioria das espécies, essa perda é irreversível após a protrusão radicular, tornando as plântulas altamente vulneráveis às flutuações hídricas do ambiente (Bruggink & Toorn, 1995; Buitink et al., 2003).

Essas afirmações poderiam explicar as diferenças encontradas na análise de crescimento de plantas de *B. forficata* originadas de sementes germinadas e secas em diferentes condições.

A secagem em sílica leva a uma diminuição do conteúdo de água de forma rápida, conforme observado na curva de secagem. Essa perda, em um curto período, pode levar a semente a um colapso de suas funções celulares, e impedir a síntese de compostos que atuam na preservação dos tecidos. Esses danos, quando causados no sistema radicular, podem alterar a absorção de água e nutrientes. Conforme citado anteriormente, a raiz é o primeiro órgão a responder às consequências da dessecação.

As raízes com menor comprimento conseguem absorver menos água e solutos. Sem disponibilidade adequada desses recursos a planta acumula menor quantidade de biomassa e, conseqüentemente, cresce menos. Dessa maneira, tem-se uma planta com menor número de folhas e menor acúmulo de matéria seca.

Com um tratamento em solução osmótica, os danos citados acima poderão ser minimizados, o que provavelmente poderia explicar as diferenças entre as plantas avaliadas.

4.6 Composição química

Na Tabela, 3 estão representados os valores de teores de proteínas, lipídeos, açúcares e amido das sementes germinadas de *B. forficata*. Com 3 mm de comprimento houve um acréscimo na quantidade de proteínas, porém com 4 mm houve uma diminuição na quantidade desse composto. Em relação aos lipídeos, o comprimento de 4 mm foi o que apresentou a maior quantidade desse composto.

Durante o crescimento da radícula houve um decréscimo da quantidade de amido, acompanhado por um aumento na quantidade de açúcares totais

(Tabela 3). Quanto à tolerância à dessecação, é possível que o aumento de açúcares totais e lipídeos, e a diminuição de proteínas e amido, estejam ligados à diminuição da tolerância à dessecação das radículas de *B. forficata* ao longo de seu crescimento.

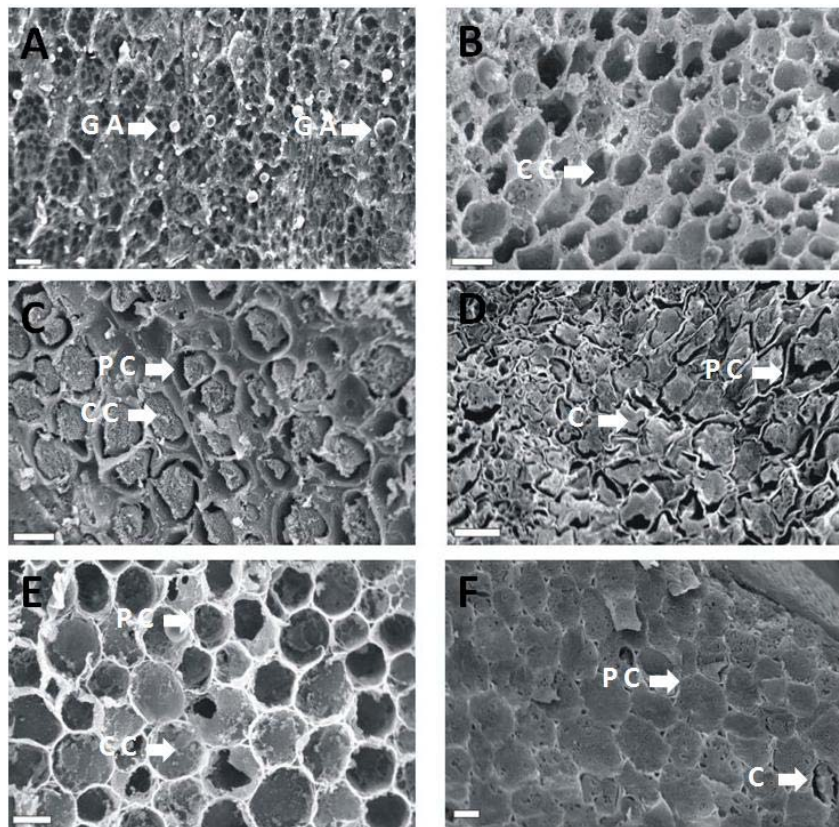
TABELA 3 Teores de proteínas, lipídeos, amido e açúcares totais em sementes germinadas com 2 mm, 3 mm e 4 mm de comprimento de radícula. Os componentes químicos estão expressos em g/100g de massa seca.

Comprimento	Proteína	Lipídeo	Amido	Açúcar Total
2 mm	22,8 ^c	8,9 ^b	7,9 ^{ab}	4,1 ^{ab}
3 mm	27,3 ^a	8,7 ^b	8,2 ^a	3,8 ^b
4 mm	24,2 ^b	9,6 ^a	6,6 ^b	4,3 ^a

*As letras iguais, na linha, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

4.7 Análises ultraestruturais do eixo embrionário de sementes germinadas

A Figura 11 contém eletromicrografias do ápice do embrião de sementes sem germinar e sem embeber (11A). Nesta figura pode ser observado grãos de amido e depressões que poderiam estar ocupadas anteriormente por grãos de amido. Durante a criofratura, esses grãos podem ter se deslocado deixando apenas sua marca. Observa-se também que o conteúdo celular encontra-se bem estruturado, bem como as paredes celulares.



FÍGURA 11 Eletromicrografias de varredura do ápice radicular de sementes germinadas de *B. forficata* de 2,0 mm. A- antes da germinação; B e C- após a germinação D- após secagem direta em sílica até 20% de umidade; E- após incubação em PEG -1,4 MPa; F- incubação em PEG -1,4 MPa com posterior secagem até 20% de umidade. Legenda: PC- parede celular; CC- conteúdo citoplasmático; GA- grãos de amido; C- colapso celular. Barras = 10 µm.

Nas Figuras 11B e 11C é possível observar que algumas células apresentam o conteúdo celular uniformemente distribuído ou conteúdos celulares retraídos, porém com a manutenção da forma da parede celular.

Na secagem direta em sílica (Figura 11D), observa-se que o conteúdo celular encontra-se retraído e a parede celular adquiriu um formato desuniforme, deixando assim as células desestruturadas.

Após a incubação em PEG -1,4 MPa (Figura 11E), as células assumem uma conformação parecida com as células das sementes germinadas. Na secagem em sílica, após a incubação (Figura 11F), a conformação das células também se encontra próxima a de uma semente sem germinar, porém, sem a presença de grãos de amido, ou depressões que indiquem que os mesmos estavam presentes na estrutura da radícula. A falta desses grãos de amido se deve à possível utilização dessa reserva durante o processo germinativo. Nessa imagem, observa-se a presença de colapso celular, que, provavelmente, seja proveniente da secagem.

Martins (2009) reporta que durante a incubação de sementes de *T. impetiginosa* em PEG ocorre a síntese de ABA, fitormônio relacionado com a ativação de vários mecanismos protetores contra a dessecação, dentre eles, o relaxamento da membrana celular, que aumenta a possibilidade de redução do volume citoplasmático sem a ocorrência de danos ultraestruturais (Creelman & Mullet, 1991). Sreedhar et al. (2002) constatou que os embriões somáticos de *Medicago sativa* somente se mostraram tolerantes à dessecação e mantiveram a membrana celular íntegra quando tratados com ABA.

4.8 Efeito do ABA e do choque quente na reindução de tolerância à dessecação

A Figura 12 mostra a influência de diferentes concentrações de ABA juntamente com PEG -1,4 MPa durante a reindução de tolerância a dessecação.

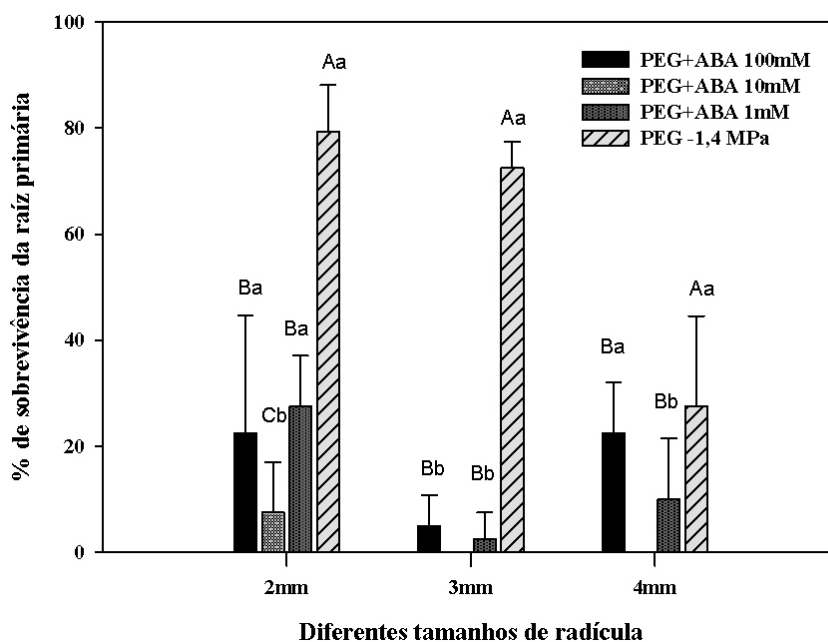


FIGURA 12 Percentagem de sobrevivência da raiz primária em função de diferentes soluções (PEG -1,4 MPa+ABA100mM; PEG -1,4 MPa+ABA10mM; PEG -1,4 MPa+ABA1mM; PEG -1,4 MPa) na reindução de tolerância à dessecação em sementes germinadas com comprimento de radícula de 2 mm, 3 mm e 4 mm. Os dados foram comparados pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, estando representados pelas letras maiúsculas que comparam os tratamentos, e as letras minúsculas que comparam os tamanhos das radículas. As barras indicam o desvio padrão entre as médias.

Para as três concentrações testadas observou-se um decréscimo significativo na percentagem de radículas que retomaram o crescimento após a secagem. Em *T. impetiginosa*, Vieira (2008) observou um acréscimo na percentagem de radículas que retomaram o crescimento após a dessecação, precedidas de incubação em PEG -1,4 MPa combinado com ABA em concentrações de 1 mM, 10 mM e 100mM. Entretanto, Martins (2009), também trabalhando com *T. impetiginosa* observou que em radículas com 3 mm de comprimento houve um decréscimo na capacidade de retomada do crescimento.

No que diz respeito à aplicação de ABA exógeno, pode haver respostas diferenciais entre espécies. Alguns estudos relatam a relação entre ABA e os mecanismos de tolerância à dessecação (Vieira, 2009), porém, nas concentrações testadas não foi possível observar melhorias no restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas.

Quanto à aplicação de choque quente em sementes germinadas de *B. forficata*, verificou-se que a resposta a esse tratamento foi praticamente nula. Após o choque quente, nas três condições propostas, a resposta foi nula para os tratamentos a 2 horas a 45°C em calor seco e 1 hora a 45°C em solução de PEG - 1,4 MPa. O tratamento de 1 hora em calor seco proporcionou uma retomada do crescimento de 2,5% das radículas com 2 mm de comprimento. Esses protocolos mostraram-se ineficientes ao restabelecimento da tolerância à dessecação.

Vieira (2008) alcançou percentagens superiores na reindução de tolerância à dessecação em *T. impertiginosa* após aplicação do choque seco, a mesma metodologia utilizada no presente estudo. Conforme discutido acima, esse comportamento diferencial e discrepante pode ocorrer em decorrência de serem espécies diferentes.

Um fato observado na aplicação desses protocolos foi o amolecimento da estrutura da radícula, favorecendo o ataque de fungos. Para o choque quente,

esse amolecimento pode caracterizar a morte dos tecidos causada pela alta temperatura.

5 CONCLUSÕES

Quanto à caracterização dos lotes, o lote 2 apresenta maior percentagem de germinação, e o lote 1 maior peso e tamanho. As sementes de *B. forficata* apresentam 20% de umidade e peso de mil sementes de 88,23 gramas. A curva de embebição não apresenta padrão trifásico. A escarificação aumenta a germinação em cerca de 30%.

O uso de fluridona proporciona um aumento no IVG, enquanto o Paclobutrazol diminui a percentagem de germinação e o IVG das sementes de *B. forficata*. A giberelina não altera a percentagem de germinação e o IVG.

Quanto à reindução de tolerância à dessecação, o uso de PEG -1,4 MPa é o mais adequado para radículas de até 4 mm de comprimento. Para secagem em sílica, a reindução ocorre apenas nas radículas de até 3 mm de comprimento.

A incubação em PEG -1,4 MPa leva a uma perda de 15% do conteúdo de água da semente germinada.

Nas plantas oriundas de sementes germinadas e secas diretamente em sílica ocorre uma diminuição da massa seca, do número de folhas e do comprimento da raiz. A secagem em sílica após a germinação prejudica o crescimento da planta.

Há um aumento de lipídeos e açúcares totais, e uma diminuição das proteínas e amido durante o crescimento radicular.

Quando as sementes são secas diretamente em sílica ocorre a retração do conteúdo citoplasmático e deformação na parede celular das células da radícula. A incubação em PEG com posterior secagem mantém a estrutura celular inalterada.

O uso de ABA e choque quente é prejudicial a reindução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *B. forficata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of the Agricultural Chemists**. 15. ed. Washington, 1990. 1094 p.

AVELANGE-MACHEREL, M. H.; LY-VU, B.; DELAUNAY, J.; RICHOMME, P.; LEPRINCE, O. NMR metabolite profiling analysis reveals changes in phospholipid metabolism associated with the reestablishment of desiccation tolerance upon osmotic stress in germinated radicles of cucumber. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 471-482, Apr. 2006.

BENSCHOP, J. J.; JACKSON, M. B.; GÜHL, K.; VREEBURG, R. A. M.; CROKER, S. J.; PEETERS, A. J. M.; VOESENEK, L. A. C. J. Contrasting interactions between ethylene and abscisic acid in *Rumex* species differing in submergence tolerance. **Plant Journal**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 756-768, Dec. 2005.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Orthodox and recalcitrant seeds. In: VOZZO, J. A. **Tropical tree seed manual**. [S.l.], United States Department of Agriculture Forest Service's/Reforestation, Nurseries and Genetics Resources, 2003. chap. 4, p. 137-147.

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

BEWLEY, J. D.; BANIK, M.; BOURGAULT, R.; FEURTADO, J. A.; TOOROP, P. E.; HILHORST, H. W. M. Endo- β -mannanase activity increases in the skin and outer pericarp of tomato fruits during ripening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 344, p. 529-538, Mar. 2000.

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

BOUDET, J.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A.; ROGNIAUX, H.; LARRE, C.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. 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**, Washington, v. 140, p. 1418-1436, Feb. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 365 p.

BRAY, E. A. Abscisic acid regulation of gene expression during waterdeficit stress in the era of the Arabidopsis genome. **Plant Cell Environment**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 153-161, Feb. 2002.

BRUGGINK, T.; TOORN, P. van der. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Wellington, v. 13, n. 4, p. 273-286, Mar. 1995.

BUITINK, J.; LEGER, J. J.; GUIBLE, I.; VU, B. L.; WUILLÈME, S.; LAMIRAULT, G.; BARS, A. L.; MEUR, N. L.; BECKER, A.; KÜSTER, H.; LEPRINCE, O. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **The Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 735-750, Sept. 2006.

BUITINK, J.; VU, B. L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The reestablishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 4, p. 273-286, Apr. 2003.

CADMAN, C. S. C.; TOOROP, P. E.; HILHORST, H. W. M.; FINCHSAVAGE, W. E. Gene expression profiles of *Arabidopsis Cvi* seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. **The Plant Journal**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 805-822, June 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 1039 p.

CASTRO, R. D. de; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149-162.

CHIN, H. F.; ROBERTS, E. H. (Ed.). **Recalcitrant crop seeds**. Kuala Lumpur: Tropical SDN/BHD, 1989. 152 p.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Abscisic acid accumulates at positive, turgor potential in excised soybean seedling growing zones. **Plant Physiology**, Washington, v. 95, n. 4, p. 1209-1213, Aug. 1991.

CUNHA, A. M. da; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A. G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M. W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, Muenchen, v. 17, p. 37-41, Jan. 2010.

DAWS, M. I.; BOLTON, S.; BURSLEM, D. F. R. P. Loss of desiccation tolerance during germination in neo-tropical pioneer seeds: implications for seed mortality and germination characteristics. **Seed Science Research**, Wellington, v. 17, n. 4, p. 273-281, Dec. 2007.

DEBEAUJON, I.; KOORNNEEF, M. Gibberellin requirement for arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 2, p. 415-424, Feb. 2000.

FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. A. M. van; HILHORST, H. W. M. Changes in DNA and microtubules during loss and reestablishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, Aug. 2005.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; WALTERS, C. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, p. 135-144, June 1997.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 4.3**. 1999. Disponível em:
<<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em: 01 fev. 2010.

FINCH-SAVAGE, W. E. Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: germinability and desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, p. 17-22, Mar. 1992.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; REIS, A.; GRANDO, J. L. Comportamento da canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) em viveiro, submetida a diferentes métodos de quebra de dormência e semeadura. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 5, p. 1-15, dez. 1982.

GUIMARÃES, C. C. **Perda da tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium* durante e após a germinação**. 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

HEBLING, S. A. **Aspectos ecofisiológicos da germinação de sementes de *E. contortisiliquum* (Vellozo) Morong**. 1997. 143 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 431-438, Sept. 2001.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. The survival of germinating orthodox seeds after desiccation and hermetic storage. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 247, p. 239-247, Feb. 1992.

HONG, T. D.; LININGTON, S.; ELLIS, R. H. **Seed storage behaviour: a compendium**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 104 p. (Handbooks for Genebanks, 4).

KERMODE, A. R. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: M. Dekker, 1995. p. 273-332.

LEPRINCE, O.; HARREN, F. J. M.; BUITINK, J.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during rehydration of germinating radicles. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, n. 2, p. 597-608, Feb. 2000.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 4, p. 231-246, 1993.

LIN, T. P.; CHEN, M. H. Biochemical characteristics associated with the development of the desiccation-sensitive seeds of *Machilus thunbergii* Sieb e Zucc. **Annals of Botany**, London, v. 76, n. 4, p. 381-387, June 1995.

LIU, X.; WANG, Z.; WANG, L.; WU, R.; PHILLIPS, J.; DENG, X. LEA 4 group genes from the resurrection plant *Boea hygrometrica* confer dehydration tolerance in transgenic tobacco. **Plant Science**, Oxford, v. 176, p. 90-98, Jan. 2009.

LOPES, J. C.; BARBOSA, L. G.; CAPUCHO, M. T. Germinação de sementes de *Bauhinia* spp. **Floresta**, Curitiba, v. 37, n. 2, p. 265-274, out. 2007.

- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 576 p.
- LUSA, M. G.; BONA, C. Análise morfoanatômica comparativa da folha de *Bauhinia forficata* Link e *B. variegata* Linn. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 196-211, jul. 2009.
- MARTINS, J. R. **Estudos ecofisiológicos da germinação e da reindução da tolerância à dessecação em plântulas de ipê-roxo**. 2009. 99 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MCCREADY, R. M.; GUGGOLZ, A.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables: application to peas. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 22, n. 9, p. 1156-1158, Sept. 1950.
- MEDEIROS, A. C. de S.; EIRA, M. T. S. da. **Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 13 p. (Circular Técnica, 127).
- MENEZES, F. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S.; KUSTER, R. M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, p. 8-13, mar. 2007.
- MICHEL, B. E. Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, n. 1, p. 66-70, Jan. 1983.
- NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. ABA action and interactions in seeds. **Trends in Plant Science**, London, v. 8, n. 5, p. 213-217, May 2003.
- NELSON, N. A. A photometric adaptation of Somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 135, n. 2, p. 136-175, May 1944.
- OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S. D.; SANT'ANA, C. D.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 98, p. 213-216, Apr. 2005.

OLIVEIRA, J. M. **Tolerância à dessecação em sementes de *Leucaena leucocephala* durante a germinação.** 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PEPATO, M. T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 81, n. 2, p. 191-197, 2002.

PRITCHARD, H. W. Water potential and embryonic axis viability in recalcitrant seeds of *Quercus rubra*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 67, p. 43-49, June 1991.

ROSA, S. G. T.; FERREIRA, A. G. Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. **Acta botanica brasílica**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 147-154, abr. 2001.

SANTOS, F. dos; SCHLINDWEIN, G.; ROSSONI, M. G.; AZAMBUJA, A. C. de. Influência de processos de escarificação na embebição e germinação de *Senna corymbosa* (Lam.) H.S. Irwin & Barneby. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 14, n. 1, p. 57-61, 2008.

SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; FARIA, R. M. J.; MELO, D. L. B.; ABREU, G. B. Germination studies on *Tabebuia impetiginosa* Mart. seeds. **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 1-9, jan./jun. 2004.

SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 449-454, maio 2002.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 2. ed. San Francisco: W. H. Freeman, 1981. 219 p.

SOUZA, E. S. **Desenvolvimento de sementes e crescimento inicial de *Vernonanthura phosphorica* (Vell) H. Rob.** 2009. 88 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOUZA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. M. B. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of Kaempferol-3,7-*O*-(*r*)- dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. **Journal Natural Products**, Washington, v. 67, p. 829-832, May 2004.

SREEDHAR, L.; WOLKERS, W. F.; HOEKSTRA, F. A.; BEWLEY, J. D. In vivo characterization of the effects of abscisic acid and drying protocols associated with the acquisition of desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 4, p. 391-400, 2002.

STASOLLA, C.; ZYL, L.V.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; LIU, W.; SEDEROFF, R. R. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. **Plant Physiology**, Washington, v. 131, p. 49-60, Jan. 2003.

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrant seeds. In: IUFRO SEED SYMPOSIUM, 1., 1998, Kuala Lumpur. **Proceedings...** Kuala Lumpur: FRIM, 1999. p. 29-42.

SUN, W. Q.; LEOPOLD, A. C. Cytoplasmic vitrification and survival anhydrobiotic organisms. **Comparative Biochemistry Physiology**, Ottawa, v. 117A, n. 3, p. 327-333, July 1997.

SWAIN, S. M.; SINGH, D. P. Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. **Trends in Plant Science**, London, v. 10, n. 3, p. 123-129, Mar. 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TOLDI, O.; TUBA, Z.; SCOTT, P. Vegetative desiccation tolerance: is it a goldmine for bioengineering crops? **Plant Science**, Oxford, v. 176, p. 187-199, Oct. 2008.

VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. Sinopse de *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) D.C. (Leguminosae: Caesalpinoideae: Cercideae) no Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 477-491, jul./set. 2005.

VIEIRA, C. V. **Re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata***. 2008. 99 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WALTERS, C.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Desiccation stress and damage. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallington: CABI, 2002. p. 263-282.

WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 7-21, ago. 2000. Edição Especial.

ZENG, Y.; RAIMOND, N.; KERMODE, A. R. Role of *ABI3* homologue in dormancy maintenance of yellow-cedar seeds an in the activation of storage proteins and gene promoters. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, p. 39-49, Jan. 2003.