



**JANAÍNA GUARIEIRO RIBEIRO DE ASSIS**

**EXPRESSÃO DE ENZIMAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE  
SEMENTES DE SEMPRE- VIVAS**

**LAVRAS - MG  
2017**

**JANAÍNA GUARIEIRO RIBEIRO DE ASSIS**

**EXPRESSÃO DE ENZIMAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE  
SEMPRE-VIVAS**

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

Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho

Orientadora

**LAVRAS - MG  
2017**

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

Assis, Janaína Guarieiro Ribeiro de.

Expressão de enzimas durante a germinação de sementes de  
sempre-vivas/ Janaína Guarieiro Ribeiro de Assis. - 2017.

51 p. : il.

Orientador(a): Maria Laene Moreira de Carvalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. sempre-viva. 2. atividade enzimática. 3. análise de imagem.  
I. Carvalho, Maria Laene Moreira de. . II. Título.

**JANAÍNA GUARIEIRO RIBEIRO DE ASSIS**

**EXPRESSÃO DE ENZIMAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE  
SEMPRE-VIVAS**

**ENZYME EXPRESSION DURING SEED GERMINATION OF SEMPRE-VIVAS**

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

APROVADA em 16 de fevereiro de 2017

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Dra. Marcela Carlota Nery

UFLA  
UFVJM

Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho

Orientadora

**LAVRAS - MG  
2017**

*Aos meus Pais; José Carlos Ribeiro de Assis e Margaret Guarieiro Ribeiro de Assis, por todo amor incondicional, dedicação, incentivo, apoio e exemplos de honestidade e amor ao trabalho bem feito.*

**Dedico**

*Ao meu noivo Mayko Arnhold Carvalho pelo amor, paciência e toda força, às minhas irmãs, Moema Guarieiro Ribeiro de Assis e Moysa Guarieiro ribeiro de Assis pela amizade, aos meus sobrinhos Julia Guarieiro Ribeiro Garcia e Caio Guarieiro Ribeiro Carvalho pelo carinho e em especial à minha querida e amada avó Dona Tina (in memoriam) que jamais irei esquecer e agradecer por tudo e principalmente pelo exemplo de mulher guerreira.*

*À minha orientadora Maria Laene Moreira de Carvalho pela oportunidade, ensinamentos, dedicação, incentivo, paciência e por acreditar em mim.*

**Agradeço**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, sobretudo, por me guiar e dar forças para seguir em frente!

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Agricultura/Fitotecnia (Setor de Sementes), pela oportunidade.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

A minha orientadora, professora Maria Laene Moreira de Carvalho, por seu exemplo profissional, dedicação e incentivo durante a minha jornada acadêmica.

A Dra. Elizabet Rosemeire Marques pela ajuda e presteza em todos os momentos.

Aos membros da banca examinadora: professores Maria Laene Moreira de Carvalho, Édila Vilela de Resende Von Pinho, Marcela Carlota Nery obrigada por toda ajuda e ensinamento.

Aos professores do Setor de Sementes, Édila, Renato e João Almir e aos pesquisadores Antônio Rodrigues Vieira (FAPEMIG) e Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa (EMBRAPA) pela disponibilidade e contribuição na minha formação.

A Marli, Viviana, e aos funcionários do Laboratório de Sementes, Geraldo, Dalva e Jaqueline, por toda a ajuda e amizade. Aos funcionários do laboratório de cultura de tecidos pela ajuda e ensinamentos.

Aos colegas e amigos Dayliane, Rucyan, Diego, Camila, Vivi, Bárbara, Maria Alice, Raquel, Tati, Aline, Noêmia, Marcela, Stefania, Hellismar, Heloísa, Carla, Michele, Valquíria, Édila, Fernanda, por toda ajuda, amizade e incentivo.

Ao pessoal do NeSem por todo aprendizado e amizade.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desta pesquisa. Muito Obrigado!

*" Se enxerguei mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes." (Isaac Newton).*

## RESUMO

Eriocaulaceae é uma família de plantas que são popularmente conhecidas como sempre-vivas e amplamente distribuídas, principalmente nas regiões tropicais. A Cadeia do Espinhaço, que abrange Minas Gerais e Bahia, é o principal centro de diversidade dessa família que inclui as espécies *Comanthera elegans* (Bong.) L.R.Parra & Giul e a *Comanthera bisulcata* (Koern.) L.R.Parra & Giul, dentre as mais conhecidas. Devido ao extrativismo desordenado nas últimas décadas, principalmente pelo alto valor comercial que as inflorescências representam como plantas ornamentais, algumas espécies já estão ameaçadas de extinção. Neste contexto, estudos que envolvam o conhecimento do processo germinativo dessas espécies são de fundamental importância para que se consiga uma produção comercial de inflorescências que venha amortizar o efeito dessa coleta indiscriminada. O objetivo nesta pesquisa foi avaliar a expressão de enzimas durante o processo de germinação de sementes de sempre-vivas das espécies *Comanthera elegans* e *Comanthera bisulcata*, utilizando a técnica de eletroforese. Para a avaliação do potencial fisiológico das sementes, foram realizados o teste de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes mantidas nas temperaturas de 25-15 °C e fotoperíodo de 16-8 horas para a espécie *Comanthera elegans* e 20-15 °C com fotoperíodo de 16-8 horas para *Comanthera bisulcata*. Foram avaliadas as expressões das enzimas esterase (EST), malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e da endo- $\beta$ - mananase durante o processo de germinação. A expressão destas foi avaliada em sementes secas (S), na protrusão (Pro), no aparecimento da folha primordia (FP), no início da formação de plântula normal (Pla) e em sementes dormentes (SD) ao final do processo de germinação. A análise de imagem para a quantificação das enzimas foi feita com o auxílio do software ImageJ<sup>®</sup> mensurado em pixel<sup>2</sup>. Os maiores valores de germinação e viabilidade foram observados em sementes da espécie *C. elegans*. À medida em que o processo de germinação ocorre nas espécies *C. bisulcata* e *C. elegans* há maior expressão da enzima CAT e menor da enzima EST. Há variação de expressão das enzimas SOD, ADH e MDH nas sementes de ambas as espécies durante o processo de germinação. A enzima endo- $\beta$ -mananase apresenta maior atividade em sementes com protrusão radicular, nas duas espécies.

**Palavras-chave:** Sempre-vivas. Atividade enzimática. Análise de imagem

## ABSTRACT

The Eriocaulaceae is a family of plants that are popularly known as sempre-vivas and widely distributed, mainly in the tropics. The Espinhaço Mountain Range which covers Minas Gerais and Bahia, is considered as the main center of diversity of this family that includes the species *Comanthera elegans* (Bong.) L.R.Parra & Giul and *Comanthera bisulcata* (Koern.) L.R.Parra & Giul among the most known. Due to the disorganized extractivism in the last decades, mainly due to the high commercial value that the inflorescences represent as ornamental plants, some species are already endangered. In this context, studies that involve the knowledge of the germinative process of these species are of fundamental importance in order to obtain a commercial production of inflorescences that will amortize the effect of this indiscriminate collection. It was the purpose of the study to evaluate the expression of enzymes during the germination process of the sempre-vivas seeds using the electrophoresis technique. For the evaluation of the physiological potential of seeds, the germination test and the germination speed index (IVG) of seeds maintained at temperatures of 25-15 °C and photoperiod of 16-8 hours were performed for *Comanthera elegans* and 20 -15 °C with photoperiod of 16-8 hours for *Comanthera bisulcata*. The expression of the enzymes esterase (EST), malate dehydrogenase (MDH), alcohol dehydrogenase (ADH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and endo- $\beta$ -mannanase were evaluated during the germination process. The expression of these seeds was evaluated in dry seeds (S), protrusion (Pro), at the appearance of the primordial leaf (FP), at the beginning of normal seedling formation (Pla) and dormant seeds (SD) at the end of the germination process. The image analysis for the quantification of the enzymes was done using ImageJ® software measured in pixel<sup>2</sup>. The highest values of germination and viability were observed in *C. elegans* seeds. As the germination process occurs in *C. bisulcata* and *C. elegans* species is observed the increase in the expression of the enzyme CAT and reduction of EST. There is a variation in the expression of the enzymes SOD, ADH and MDH in seeds of both species during the germination process. The enzyme endo- $\beta$ -mannanase exhibit the highest activity levels in seeds with root protrusion in both species.

**Keywords:** Sempre-viva, enzymatic activity, image analysis

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Processo de beneficiamento das inflorescências para extração das sementes de sempre-viva.....  | 22 |
| Figura 2 - Sementes de <i>Comanthera</i> sp. com indicação da protrusão radicular (A) e plântula normal (B) avaliadas no teste de germinação.....   | 23 |
| Figura 3 - Expressões da enzima esterase (EST) em sementes de sempre-vivas, das espécies <i>C. bisulcata</i> (A) e <i>C. elegans</i> (B), nas diferentes fases durante o processo de germinação. ....             | 28 |
| Figura 4 - Expressões da enzima catalase (CAT) em sementes de sempre-vivas, das espécies <i>C. bisulcata</i> (A) e <i>C. elegans</i> (B), nas diferentes fases durante o processo de germinação. ....             | 29 |
| Figura 5 - Expressões da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de sempre-vivas, das espécies <i>C. bisulcata</i> (A) e <i>C. elegans</i> (B), nas diferentes fases durante o processo de germinação. .... | 31 |
| Figura 6 - Expressões da enzima malato desidrogenase (MDH) em sementes de sempre-vivas, das espécies <i>C. bisulcata</i> (A) e <i>C. elegans</i> (B), nas diferentes fases durante o processo de germinação. .... | 33 |
| Figura 7 - Expressões da enzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes de sempre-vivas, das espécies <i>C. bisulcata</i> (A) e <i>C. elegans</i> (B), nas diferentes fases durante o processo de germinação. .... | 35 |
| Figura 8 - Expressões da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes de sempre-vivas, das espécies <i>C. bisulcata</i> e <i>C. elegans</i> , nas diferentes fases durante o processo de germinação. ....           | 37 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Valores médios de sementes duras, dormentes, mortas e de plântulas normais obtidos no teste de germinação (%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de sempre-vivas..... | 27 |
|--|----|

## SUMÁRIO

|                |  |           |
|----------------|--|-----------|
| <b>1</b>       | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>2</b>       | <b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2.1</b>     | <b>Características, importância, manejo e dispersão das sempre-vivas .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2.2</b>     | <b>Germinação de sementes.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>3</b>       | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.1</b>     | <b>Condução do experimento .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.1.1</b>   | <b>Perfil dos lotes .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>3.1.1.1</b> | <b>Determinação do teor de água.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>3.1.1.2</b> | <b>Teste de germinação .....</b>   | <b>23</b> |
| <b>3.1.1.3</b> | <b>Tetrazólio .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>3.1.1.4</b> | <b>Índice de velocidade de germinação (IVG) .....</b>                            | <b>24</b> |
| <b>3.1.2</b>   | <b>Avaliação da expressão enzimática.....</b>                                    | <b>24</b> |
| <b>3.1.2.1</b> | <b>Análises da expressão de enzimas por meio da técnica de eletroforese.....</b> | <b>25</b> |
| <b>3.2</b>     | <b>Análise dos resultados .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>4</b>       | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>4.1</b>     | <b>Perfil dos lotes de sementes utilizados .....</b>                             | <b>26</b> |
| <b>4.2</b>     | <b>Análise das expressões enzimáticas.....</b>                                   | <b>27</b> |
| <b>5</b>       | <b>CONCLUSÕES .....</b>  | <b>38</b> |
|                | <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>38</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As sempre-vivas, da espécie *Comanthera elegans* (Bong.) L.R.Parra & Giul e *Comanthera bisulcata* (Koern.) L.R.Parra & Giul, popularmente conhecidas como pé-de-ouro e chapadeira, respectivamente, pertencem à família Eriocaulaceae. De ocorrência natural no Brasil, em campos rupestres, principalmente na região de Diamantina - MG, possuem grande interesse comercial para a população da sua área, pelo fato de as flores dessa espécie ao serem colhidas conservarem a cor e forma por um longo período. Devido ao extrativismo desordenado, por apresentarem alto valor principalmente no mercado internacional, algumas espécies desse gênero estão incluídas na lista de espécies ameaçadas de extinção, tornando-se necessárias medidas que garantam a sua conservação.

Um fator preocupante que tem contribuído para a diminuição da população de algumas dessas espécies é a forte pressão econômica exercida que faz com que os coletores necessitem de grande quantidade de inflorescências, sendo estas removidas de forma predatória. As raízes são arrancadas juntamente com os escapos e as flores retiradas antes da formação das sementes não deixando assim um número mínimo de indivíduos nas áreas, o que inviabiliza tanto a sua regeneração quanto a produção de novas sementes.

Existe atualmente um grande interesse no estudo sobre as estratégias de vida das sempre-vivas, que compreendem desde o desenvolvimento das sementes até à formação da planta adulta. Sendo assim, torna-se de fundamental importância o conhecimento do processo de germinação no qual ocorrem transformações metabólicas no embrião até a formação da plântula estabelecida, mediante condições apropriadas de umidade, temperatura, luz e oxigênio. Além de fatores extrínsecos relacionados à germinação, devem ser considerados também os intrínsecos como a expressão de enzimas durante este processo.

No caso das sementes, o estudo da expressão enzimática tem auxiliado no conhecimento dos processos bioquímicos que estão associados à sua qualidade. Como exemplo, pode-se citar as enzimas que participam das reações de oxidação lipídica como as esterases. Existem também as que atuam na respiração como a malato desidrogenase e a álcool desidrogenase e ainda as enzimas com função antioxidante como as catalases e superóxido dismutase.

Assim, compreender as enzimas que estão envolvidas nas reações metabólicas reponsáveis pela síntese e degradação de moléculas, pode fornecer subsídios para entender os mecanismos envolvidos na germinação de sementes, como atividades relacionadas aos

processos bioquímicos.

Tem sido observado baixa qualidade fisiológica de sementes de sempre-vivas. Há, no entanto, a necessidade de estudar as causas as quais podem ser elucidadas por meio de estudos de expressão de enzimas.

Neste contexto, o objetivo nesta pesquisa foi avaliar a expressão de enzimas durante o processo de germinação de sementes de sempre-vivas das espécies *Comanthera elegans* e *Comanthera bisulcata*, utilizando a técnica de eletroforese.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Características, importância, manejo e dispersão das sempre-vivas

Eriocaulaceae é uma família com uma distribuição pantropical encontrada ao longo da Cadeia do Espinhaço, nos estados de Minas Gerais e Bahia (ECHTERNACHT; TROVÓ; SANO, 2010; GIULIETTI; HENSOLD 1990). Composta por cerca de 1100 espécies reunidas em 10 gêneros (GIULIETTI et al., 2012) das 548 espécies de Eriocaulaceae que ocorrem no Brasil, mais de 400 ocorrem na Cadeia do Espinhaço, ou seja, aproximadamente 73% das espécies dessa família estão localizadas nessa região (GIULIETTI et al., 2005).

*Comanthera* L.B. Sm. é um dos gêneros mais conhecidos dessa família e foi classificado novamente por Parra et al. (2010), que antes era nomeado de *Syngonanthus*: *S.* sect. *Eulepis* (Bong) Ruhland e *S.* sect. *Thysanocephalus* (Koern.) Ruhland (Giulietti; Hensold, 1990), como subgênero: *Comanthera* subg. *Comanthera* e *C.* subg. *Thysanocephalus*.

As plantas de Eriocaulaceae são perenes e popularmente conhecidas como sempre vivas pois uma vez secas elas mantêm a aparência das estruturas vivas conservando assim sua cor e forma por um período mais longo de tempo sendo comumente utilizadas para ornamentação, especialmente na decoração de interiores dentro e fora do Brasil (BARRETO; ECHTERNACHT; GARCIA, 2013; GIULIETTI et al., 1988; GIULLIETTI, 1996; MENDONÇA; LINS, 2000). Essas plantas ocorrem em solos predominantemente arenosos e de baixa fertilidade (NUNES et al., 2008c). Normalmente, os solos dos locais onde ocorre a maior população de plantas permanecem úmidos durante a maior parte do ano, embora possam ocorrer em regiões com solos alagados ou extremamente secos (NUNES et al., 2008b).

O solo, relevo, clima da região da Serra do Cipó- MG propiciam o estabelecimento de uma flora típica que representa um mosaico de diferentes comunidades vegetais intimamente associadas (GIULIETTI et al., 1987), dentre elas os campos rupestres (SCATENA; MENEZES, 1996) onde sempre vivas vivem.

Sob a denominação de "sempre-viva" estão espécies de plantas dos campos e cerrados pertencentes às famílias Cyperaceae, Eriocaulaceae, Poaceae, Rapateaceae e Xyridaceae, cujas inflorescências permanecem inalteradas em sua forma e coloração após serem colhidas e secadas (PARRA et al., 2010; SCATENA; VICH; PARRA, 2004).

Isto confere às sempre-vivas um alto valor comercial, principalmente no mercado internacional (GIULIETTI et al., 1988). A cidade de Diamantina é considerada o maior pólo de produção, comercialização e distribuição destas e o maior centro de diversidade de espécies do país (NUNES et al., 2008a). A coleta destes tipos de plantas na região de Diamantina, constitui uma das principais fontes de renda para as comunidades que delas sobrevivem (GIULIETTI et al., 1988).

Dentre as espécies de erioaláceas a *Comanthera elegans* (Bong.) L.R.Parra & Giul conhecida como sempre-viva-pé-de-ouro (PARRA et al., 2010) é uma das espécies que possui maior valor comercial e que está ameaçada de extinção, colocada na categoria "em perigo" pelo fato de serem colhidas antes da produção e maturação das sementes e conseqüentemente havendo uma redução no tamanho da população (MENDONÇA; LINS, 2000; BRASIL, 2014; SANO et al., 2013).

Segundo Giulietti et al. (1988) no início dos anos 80 houve redução das populações de algumas espécies endêmicas, diminuição da área de ocorrência de várias espécies e uma nítida fase de declínio do volume comercializado foram documentadas.

O declínio das populações de várias erioauláceas tem sido atribuído tanto ao aumento da frequência de queimadas realizadas no Cerrado para renovar pastagens afim de preparar o solo para a agricultura como ao manejo extrativista (NEVES; BEDÊ; MARTINS, 2011). Saturnino Saturnini e Brandão. (1977) e Giulietti et al. (1988) afirmaram que as causas relacionadas ao declínio das populações de sempre vivas podem ser devido a coleta de grande quantidade de escapos e capítulos antes mesmo que as sementes sejam dispersadas ou pela queima indiscriminada empregada no manejo extrativista para estimular a floração.

O fogo é utilizado por extrativistas que sobrevivem principalmente da coleta de sempre-vivas e é ateado logo após as primeiras chuvas, no final de setembro ou em outubro.

De acordo com os coletores, essa prática tem por objetivo limpar a área para evitar possível competição desfavorável das sempre-vivas com outras espécies que ocorrem associadas a elas. Essa prática é baseada na crença de que o fogo tem efeito positivo sobre a produção de inflorescências (BEDÊ 2006). Neves; Bedê; Martins (2011) associaram a queima dos campos à maior produção de flores.

Queimar as savanas e os campos é uma prática bastante comum em regiões tropicais e subtropicais, embora a mesma seja por vezes criticada no meio científico, pois ainda dispõe-se de pouca informação de caráter experimental sobre os efeitos ecológicos do fogo (NEVES; BEDÊ; MARTINS, 2011).

Embora a exploração excessiva e indiscriminada seja citada como uma das principais causas da redução das populações de sempre-vivas no campo, pode-se dizer que a falta de normativas que estabeleçam os procedimentos de coleta e comercialização tem contribuído, pelo menos em parte, para o manejo inadequado nas áreas de ocorrência. Geralmente, a coleta em Diamantina e região ocorre nos meses de março e abril, quando os capítulos apresentam as brácteas alvas e glabras, porém as sementes ainda não atingiram a completa maturação (DIAS, 2006; SÁ, 2007)

A colheita de *Comanthera elegans* (Bong.) L.R.Parra & Giul e *Comanthera bisulcata* (Koern.) L.R.Parra & Giul começa na segunda metade de abril até a última de maio, que se estende em alguns casos para a primeira semana de junho (OLIVEIRA et al., 2015). Segundo Nunes et al. (2008a) os colhedores de sempre-viva, em Diamantina, realizam a colheita dos escapos florais nos meses de março a abril. Após as etapas de secagem, limpeza e seleção para a exportação, o material a ser descartado (varredura - constituído de escapos, capítulos pequenos e com defeitos ou somente capítulos), é armazenado no próprio armazém. De acordo com Giulietti (1996) em alguns casos, as inflorescências escuras e que não servem para comercialização são tingidas com corantes artificiais. O restante do material, não selecionado para exportação (descarte), é beneficiado em picadeiras e o macerado é lançado ao solo antes do início da estação chuvosa (NUNES et al., 2008a).

Informações técnicas para a exploração das sempre-vivas, principalmente *Comanthera elegans*, como época de colheita de sementes e plantio, armazenamento, manejo da irrigação, entre outras, são escassas e muito variáveis (NUNES et al., 2008c).

Informações como o período de produção e dispersão das sementes de *C. elegans* são importantes para o conhecimento do hábito dessa espécie e servem de base para o

desenvolvimento de estratégias de manejo e multiplicação (NUNES et al., 2008b).

O início da dispersão das sementes de *C. elegans* foi observada na colheita das inflorescências realizada em junho e o final em outubro (última colheita das sementes). Partindo-se da informação de que a dispersão das sementes ocorre nos meses de junho a outubro, ou seja, muito depois do início das colheitas realizadas, quando os capítulos se destacam pela alvura (março e abril), conclui-se que esta antecipação antes da dispersão é danosa, porque poucas plantas terão chances de produzirem sementes e, afeta, portanto, fortemente o recrutamento de novos indivíduos na população (BEDÊ, 2002).

Identificar e implementar formas de manejo que contribuam para a sustentabilidade econômica e ecológica das sempre vivas, são ações essenciais para garantir a efetividade destas unidades em promover a conservação de áreas naturais (SCHMIDT; FIGUEIREDO; SCARIOT, 2007).

A qualidade fisiológica de sementes de *C. elegans* varia em função da época e local de colheita. No entanto, estratégias de manejo devem ser realizadas como a colheita após o início do período de dispersão das sementes (junho a outubro) e com os capítulos totalmente abertos (NUNES et al., 2008b).

Oliveira et al. (2015) afirmam que a maior taxa de germinação de *C. elegans*, à temperatura de  $25\text{ °C} \pm 2$ , foi de 23.33% para sementes coletadas no mês de setembro. Nas coletas realizadas nos períodos que antecedem ou sucedem este mês, a porcentagem de germinação não passou de 11, 72%. Ainda os mesmos autores afirmam que os resultados da germinação variam com o dia da colheita, com o local e com a floração. Além disso, Oliveira e Garcia (2005) e Nunes et al. (2008a) afirmaram que outros fatores também poderiam estar associados como variações climáticas, que influenciam o início e duração das colheitas. Segundo Taiz; Zeiger (2010) o que pode também influenciar, é o estado fisiológico dos propágulos como o período de maturação das sementes ou de acordo com Oliveira e Garcia (2011) as condições climáticas e/ou as microcondições edáficas do local em que as plantas se encontra.

A semente constitui o mais complexo e bem sucedido método de reprodução sexuada em plantas vasculares e representa uma adaptação para a rápida dominância das angiospermas. O aumento da fase esporofítica e a redução da fase gametofítica e a ampla variedade de adaptações morfológicas (raízes, folhas, cutícula, estômatos, etc.) permitem às

plantas com sementes ocorrerem em uma extensa variedade de habitats e dominar a flora terrestre (LINKIES et al., 2010).

## 2.2 Germinação de sementes

Uma das principais características que contribuem para o sucesso comercial de uma espécie, é sua capacidade de germinação a qual pode sofrer variações de acordo com o ano e local de produção (OLIVEIRA; GARCIA, 2005).

Sementes de *Comanthera* são muito pequenas, contendo massa seca e comprimento menor ou igual a 0,1 mg e 1 mm. Independente do seu tamanho, tem reservas nutricionais suficientes para completar a germinação (OLIVEIRA; GARCIA, 2011).

Fatores ambientais como luz e temperatura são considerados os principais fatores no controle da germinação, principalmente em sementes pequenas (BEWLEY; BLACK 1994).

Scatena, Lemos Filho e Lima (1996) estudando a germinação em sementes de *Comanthera elegans* e *Comanthera niveus* observaram que houve maior porcentagem de germinação na presença de luz e em temperaturas mais altas, sendo assim classificadas como fotoblásticas positivas. Houve maior porcentagem para *C. elegans* em relação a *C. niveus* e os autores justificam pelo fato de os capítulos de *C. elegans* serem coletados na fase de dispersão, enquanto as de *C. niveus* foram coletados em um estágio anterior de desenvolvimento, na fase final de maturação.

Para o gênero *Comanthera*, devido ao reduzido tamanho das sementes e a necessidade de luz para a germinação, pode ser considerada uma estratégia adaptativa para semeadura em ambientes abertos e expostos ao sol, como por exemplo, os campos rupestres (OLIVEIRA; GARCIA, 2005). Pereira et al. (2014) afirmam que não somente a luz mas a alternância de temperatura parece ser necessária para as sementes alcançarem altas taxas de germinação para *C. elegans* e também para outras espécies de *Comanthera*. Corroborando com esses autores, Oliveira e Garcia (2005) confirmaram que alternâncias de temperaturas com valores mais elevados durante o dia e mais baixos durante a noite, podem favorecer a germinação de *C. elegans* (ambientes xéricos), enquanto temperaturas mais elevadas durante o dia reduzem a germinação de *C. elegantulus* e de *C. venustus* (ambientes úmidos).

Scatena; Cardoso e Giulietti (1999) afirmam que espécies de *Comanthera* crescem em diferentes condições edáficas, habitando em solos secos, úmidos e até alagados e sempre expostos ao sol e que estas espécies ao se desenvolverem e produzirem sementes em habitats

xéricos, podem favorecer a germinação de sementes sob temperaturas mais elevadas, ou seja, no final do ciclo de produção (outubro).

Uma característica que está relacionada a exigência de luz é o fato de que após a emergência do eixo embrionário, algumas espécies de Eriocaulaceae desenvolvem primeiramente as folhas para depois desenvolverem as raízes (DIAS, 2006; SCATENA; GIULIETTI; CARDOSO, 1999). Outros fatores que podem alterar o desenvolvimento das plantas e formação das sementes além da temperatura e luz, segundo Nunes et al. (2008a), estão diretamente ligados às mudanças na morfologia decorrentes das adaptações aos diferentes microclimas, como também ao local e época em que as sementes foram colhidas e às diferenças de solo e umidade.

A germinação pode ser entendida como a emergência de uma nova planta a partir da semente. Esse evento começa quando o embrião, contido numa semente, retoma as atividades após a embebição sob condições favoráveis e se completa com a protrusão radicular através dos tecidos circundantes como tegumento e endosperma (RAJJOU et al., 2012). Sementes com tegumento permeável geralmente exibem três fases durante a germinação: (I) embebição com intensificação da atividade respiratória; (II) ativação dos processos metabólicos e limitada absorção de água; (III) protrusão da radícula embrionária devido à acentuada atividade mitótica (BEWLEY et al., 2012).

Fisiologicamente, a germinação é caracterizada por processos metabólicos complexos que levam à retomada do crescimento do eixo embrionário, culminando com a protrusão da radícula através do tegumento da semente (LABOURIAU, 1983). A germinação pode ocorrer logo após a dispersão das sementes se as condições ambientais forem favoráveis; caso contrário, as sementes permanecem em um estado de baixa atividade metabólica, denominado quiescência. Quando as condições para a germinação são aparentemente favoráveis e, mesmo assim a semente não germina, fala-se que ela está dormente (BEWLEY; BLACK, 1994). Em síntese, tendo-se uma semente viável em repouso, por quiescência ou dormência, quando são satisfeitas uma série de condições externas (ambientais) e internas (intrínsecas do órgão), ocorrerá o crescimento do embrião, o qual conduzirá à germinação (BORGES; RENA, 1993).

A disponibilidade de água para a embebição é o fator inicial e essencial que determina a germinação de sementes viáveis e não- dormentes (BEWLEY; BLACK, 1994). A absorção de água resulta na hidratação dos tecidos, com a consequente retomada das atividades metabólicas do embrião, que culmina com o fornecimento de energia e nutrientes necessários

para a retomada do crescimento do eixo embrionário (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). A água ainda atua indiretamente no tegumento, hidratando enzimas que irão amolecê-lo, favorecendo a penetração do oxigênio e a transferência de nutrientes solúveis para as diversas partes da semente (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989; BEWLEY; BLACK, 1994). A velocidade com que a semente absorve água depende de vários fatores como por exemplo a espécie, permeabilidade do tegumento, disponibilidade de água, temperatura, pressão hidrostática, área de contato semente/água, forças intermoleculares, composição química e condição fisiológica da semente (POPINIGIS 1985).

Sendo o oxigênio indispensável à respiração das sementes, a atividade respiratória é rapidamente iniciada uma vez que a semente começa a embeber, a partir de um conteúdo de água em geral em torno de 20% (BEWLEY; BLACK, 1994). A quantidade de adenosina trifosfato (ATP) em sementes secas é extremamente baixa, mas aumenta rapidamente durante a embebição, seguindo a atividade respiratória aeróbia, que é a principal fonte de energia (ATP) para a semente antes da emergência da radícula (CASTRO et al., 2004).

A temperatura influencia principalmente na velocidade e percentual de germinação por mudar a velocidade de absorção de água e alterar a velocidade das reações químicas que mobilizam ou degradam as reservas armazenadas e a síntese de diversas substâncias para o crescimento das plântulas (BEWLEY; BLACK 1994). Como a germinação ocorre em determinada faixa de temperatura, cuja amplitude é relativamente grande, as temperaturas mais apropriadas para a germinação, assim como temperaturas limitantes, podem variar entre indivíduos e populações (BASKIN; BASKIN, 1998; RAMOS; VARELA, 2003). A faixa de temperatura em que as sementes germinam é uma característica individual de cada espécie, mas o tempo necessário para ser alcançada a máxima germinabilidade varia com a temperatura (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989; BEWLEY; BLACK, 1994).

Há sementes que são capazes de germinar após a colheita, basta que sejam fornecidos requisitos básicos, entretanto, para outras sementes a germinação é desuniforme ou simplesmente não acontece, mesmo que todas as condições sejam favoráveis e são conhecidas assim como dormentes. Embora estejam vivas e sob condições ambientais que favorecem o processo germinativo, as sementes não germinam por terem alguma restrição interna impedindo o desenvolvimento do embrião. A germinação somente ocorre quando tal restrição for superada naturalmente ou se forem utilizados tratamentos específicos capazes de promover a superação da dormência (NASCIMENTO; FREITAS, 2006).

Os mecanismos de dormência podem ser físicos, relacionada à impermeabilidade do envoltório da semente à água, fisiológico, relacionada aos processos fisiológicos que bloqueiam o crescimento do embrião e morfológico, relacionado à imaturidade do embrião (MARCOS FILHO, 2005).

De acordo com Garcia; Oliveira e Duarte (2014), algumas espécies de *Comanthera* apresentam dormência secundária durante a estação chuvosa (temperaturas altas) que foi reduzida durante a estação seca (temperaturas baixas). Foi verificado que sementes que não germinaram no começo da estação chuvosa (como as sementes que não foram expostas à luz) desenvolveram dormência secundária e mantiveram-se nesse estado até que a estação seca chegasse.

Durante a germinação das sementes, as reservas insolúveis de alto peso molecular são degradadas e convertidas em formas solúveis, que são rapidamente transportadas aos tecidos em crescimento e utilizadas em reações de síntese ou de produção de energia. As modificações metabólicas que ocorrem nesses estágios são resultados da atividade de várias enzimas de hidrólise e síntese (BEWLEY; BLACK, 1994).

No processo de germinação, ocorre reações catabólicas e/ou anabólicas que envolvem tanto a reativação de organelas e macromoléculas preexistentes nas sementes, formadas durante a maturação, quanto a quebra de reservas que geram ATP como fonte de energia e esqueletos de carbono para o crescimento da plântula.

Tem-se como principais biomoléculas de reserva em sementes os carboidratos, lipídeos e proteínas. Os carboidratos de reserva são bastante diversificados como a sacarose, os oligossacarídeos, os amidos e os polissacarídeos de parede celular (BUCKERIDGE et al., 2004).

Existem duas vias catabólicas de amido, uma hidrolítica e a outra fosforolítica. O amido é a reserva de carboidrato mais comum em sementes e são formados por polímeros de glicose, como a amilose e a amilopectina, que são hidrolisados pela enzima  $\alpha$ -amilase e quebradas pela  $\beta$ -amilase (BEWLEY; BLACK, 1994).

A atividade da amilase constitui um importante evento, podendo ser detectado no início da germinação das sementes, sendo seu principal papel, disponibilizar substratos para utilização da plântula até que ela se torne fotossinteticamente auto-suficiente (NEDEL, ASSIS; CARMONA, 1996).

Durante o processo de germinação das sementes de milho, segundo Kigel e Galili (1995), o embrião produz e secreta giberilinas naturais ao endosperma, induzindo o desenvolvimento de enzimas hidrolíticas na camada de aleurona, como enzimas alfa amilase e beta amilase, que são responsáveis pela degradação das reservas encontradas no endosperma. Normalmente as enzimas alfa amilase não são encontradas em sementes secas. Segundo Wang et al. (2012) estas enzimas estão diretamente relacionadas a qualidade das sementes.

Já no catabolismo de lipídeos, os triglicerídeos (TAGs) são a principal forma de armazenamento em sementes (YEN et al., 2008). Os TAGs são formados por um éster de glicerol ligado a três grupos de ácidos graxos (grupo acil) (KARANTONIS; NOMIKOS; DEMOPOULOS, 2009). Alguns dos ácidos graxos encontrados nos TAGs estão presentes em lipídeos de membrana, como por exemplo o esterato (VOELKER; KINNEY, 2011).

Os corpos lipídicos, que contém os TAGs, estão próximos de organelas conhecidas como glioxissomos, um maquinário bioquímico que converte os ácidos graxos derivados dos TAGs em compostos de quatro carbonos, que por sua vez são transformados em açúcares solúveis (GRAHAM, 2008).

Os triglicerídeos são armazenados no citosol, em corpos lipídicos (ou oleossomos) enquanto os ácidos graxos estão localizados nos peroxissomos (glioxissomos) (THEODOULOU; EASTMOND, 2012). Os ácidos graxos são transportados para o glioxissomo para ser catalizado via  $\beta$ -oxidação. Os produtos finais da  $\beta$ -oxidação são  $H_2O_2$ , NADH e acetil-CoA (HU et al., 2012).

O acetil-CoA, derivado da  $\beta$ -oxidação, é metabolizado via ciclo do glioxilato que produz succinato e malato (GRAHAM, 2008) na presença de duas enzimas, a isocitrato liase (ICL) e a malato sintase (MLS) que estão localizadas nos peroxissomos. Estas podem ser convertidas a oxaloacetato, e, enquanto uma das moléculas restabelece o ciclo, a outra pode ser convertida a fosfoenolpiruvato, que é a primeira etapa da gliconeogênese, e se transforma em açúcar (PRACHAROENWATTANA; CORNAH; SMITH, 2007) que mantém o crescimento do embrião após a germinação (QUETTIER, EASTMOND, 2009).

Já o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é altamente tóxico para a célula, é quebrado em água e oxigênio pela enzima catalase presente na matriz peroxisomal.

Os Glioxissomos foram identificados nos cotilédones de sementes secas em diversas espécies e geralmente contém algumas enzimas dentro de organelas. Autores afirmam que a maioria ou senão, todas as enzimas são sintetizadas em polissomos livres no citosol, dentro de

transcritos recém-formados inseridos nos glioxissomos em expansão. Nas sementes em desenvolvimento, mesmo que pequenas e imaturas, os mRNA para a enzima malato sintase já estão presentes e expressos. Em contrapartida, no glioxissomo, a enzima isocitrato liase não está presente nas sementes em desenvolvimento e o mRNA é ausente (BEWLEY; BLACK, 1994).

A esterase (EST) é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres e está diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, como os fosfolipídios totais de membrana (HENNING et al., 2009; SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005). Ainda segundo Henning et al. (2009) em sementes com menor vigor houve incremento na expressão dessa enzima.

No grupo das ESTs estão as lipases, fosfatases, sulfatases e as esterases propriamente ditas (REJON et al., 2012). Primeiramente a quebra dos lipídeos é catalisada por enzimas, lipases, que hidrolisam os triglicerídeos na interface água-óleo (QUETTIER; EASTMOND, 2009). Os triglicerídeos são convertidos em ácidos graxos livres e glicerol para que sejam transformados em açúcares por reações de  $\beta$ -oxidação (BOREK; RATAJCZAK; RATAJCZAK, 2006) os quais serão utilizados como fonte de energia para que ocorra a germinação.

Análise de vários mutantes de *Arabidopsis thaliana*, tem revelado funções essenciais para oxidação na degradação dos trigliceróis de reserva durante o desenvolvimento, germinação das sementes e crescimento pós-germinação antes mesmo do estabelecimento da fotossíntese. A  $\beta$ -oxidação também tem considerável importância durante a fase do crescimento vegetativo e crescimento reprodutivo, como aparecimento da radícula da casca da semente, desenvolvimento do embrião e da flor, síntese do ácido jasmônico envolvido em resposta ao estresse e do fitohormônio, ácido indoleacético (POIRIER et al., 2006).

O acetil-CoA derivado da  $\beta$ -oxidação é metabolizado pela via do ciclo do glioxilato pelas enzimas isocitrato liase (ICL) e malato sintase (MLS) (PRACHAROENWATTANA; CORNAH; SMITH, 2007) e os produtos formados pela ação dessas enzimas vão ser utilizados pela gliconeogênese para a produção de açúcares (THEODOULOU; EASTMOND, 2012).

Enzimas que atuam em várias vias metabólicas estão envolvidas com a biossíntese e acúmulo de lipídeos de reserva em sementes oleaginosas a partir de açúcares (JIANG et al., 2012).

A atividade lipásica pode também ser observada em sementes dormentes de algumas espécies oleaginosas antes da germinação, como por exemplo, em mamona e pinhão-manso (DE SOUZA et al., 2010), que corroboram com os resultados encontrados neste trabalho.

Em algumas sementes, há a necessidade que os tecidos do endosperma se enfraqueçam para que haja a protrusão radicular (DA SILVA, et al, 2004). Alguns autores, estudando a mobilização de polissacarídeos de reserva de parede celular, relacionam o enfraquecimento do endosperma à atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, à produção de etileno e à germinação das sementes de alface sob altas temperaturas (NASCIMENTO; CANTLIFFE; HUBER, 2001). Groot e Karssen (1987); Nonogakii; Matsushima e Morohashi (1992); Toorop; Van e Hilhorst (2000) avaliando a atividade da endo- $\beta$ -mananase em sementes de tomate, corroboram com Nascimento; Cantliffe e Huber (2001) em relação ao enfraquecimento do endosperma está diretamente ligado ao aumento da atividade dessa enzima.

O estresse hídrico é um dos mais importantes fatores ambientais que induz mudanças fisiológicas, como diminuição do potencial de água na célula, o fechamento dos estômatos e o desenvolvimento de processos oxidativos mediante a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radical superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (VASCONCELOS et al., 2009), que corroboram com Berjak; Pammenter (2008); Smirnof, (1993), que afirmam que a desidratação desencadeia um desequilíbrio no metabolismo de sementes no qual ocasiona a produção de Eros como  $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,  $1O_2$  (oxigênio atômico) e radical hidroxila (HO). Segundo Wang et al. (2015) a produção de EROs pode ser uma das principais causas de perda no vigor das sementes. As enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) são eficientes eliminadores das EROs (VASCONCELOS et al., 2009).

Durante a fase II da respiração, fase lag, a absorção de  $O_2$  está estabilizada ou há um pequeno aumento. A hidratação das sementes, em parte, está completa e enzimas pré-existentes são ativadas. A fase lag, em algumas sementes, pode ocorrer por diversos fatores, como por exemplo, pelo fato da casca ou tecidos de reserva conduzirem a condições anaeróbicas ou pela ativação da via glicolítica, durante a germinação, ser mais rápida que o desenvolvimento da mitocôndria. Assim há a acumulação de piruvato justamente por causa da deficiência do ciclo do ácido cítrico ou pela fosforilação oxidativa, conseqüentemente alguns piruvatos podem ser desviados, mesmo que temporariamente, para a via anaeróbica (Bewley; Black 1994). Durante os estágios iniciais da germinação, a degradação do amido é realizada

através de um processo quase que totalmente anaeróbico, até que a casca da semente é rompida pela saída do eixo embrionário (ALDASORO; NICOLÁS, 1980).

No metabolismo anaeróbico (fermentação alcoólica) o piruvato, primeiramente produzido na glicólise, é convertido a acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase, sendo o acetaldeído reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase (ADH) (GADOTTI; MENEGHELLO; TILLMANN, 2013), ou seja, a ADH atua no processo respiratório removendo essas substâncias tóxicas que são produzidas quando as células passam a respirar anaerobicamente (LIMA, 2008). Segundo Zhang et al. (1994) essa enzima fica mais susceptível à ação deletéria do acetaldeído quando sua atividade é diminuída.

A ADH está presente tanto nas sementes em processo germinativo quanto em sementes secas e depois que a germinação está completada e as condições são mais aeróbicas, a ADH torna-se desnecessária (Bewley; Black, 1994).

A enzima malato desidrogenase (MDH), responsável pela respiração aeróbica nas mitocôndrias, catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, tendo importante função na produção de NADH para o Ciclo de Krebs (TUNES et al., 2011) que é um produto fundamental na produção de ATP e de compostos intermediários essenciais ao funcionamento das células (TAIZ; ZEIGER, 2013). A MDH, no citoplasma, tem o papel inverso ao que acontece nas mitocôndrias, catalisa a reação de oxaloacetato em malato e produz  $\text{NAD}^+$ , necessário para a glicólise. Outra função que a MDH desempenha é na oxidação da malato em oxaloacetato, no ciclo do glioxilato, que se liga a acetil-CoA nos glioxissomos para produzir citrato. Já no citosol, oxida malato, transportado da mitocôndria, à oxaloacetato que será convertido a fosfoenolpiruvato e produzirá sacarose pela gliconeogênese (TAIZ; ZEIGER, 2013)

Estudar as enzimas é tentar entender quais os produtos gerados da expressão gênica que são conseqüentemente influenciadas pelo ambiente, pois os genes que controlam a sua expressão manifestam-se em determinados estádios do desenvolvimento, em órgãos e tecidos específicos, ou ainda sob um determinado estímulo (RAMÍREZ; CALDERON; ROCCA, 1991).

Há a expressão de enzimas específicas ao processo de germinação que já foram estudadas, no entanto, em sementes de sempre vivas, há a necessidade de se estudar as principais enzimas envolvidas com a germinação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Condução do experimento

A coleta das inflorescências das sempre-vivas (*Comanthera elegans* e *Comanthera bisulcata*) foi realizada no município de Diamantina-MG entre os meses de maio a agosto de 2015 em locais representativos da área de produção. Após a coleta, as inflorescências foram levadas ao Laboratório Central de Análise de Sementes, da Universidade Federal de Lavras, UFLA, onde foi realizada a extração e a obtenção das sementes.

Para extração das sementes, foram selecionadas inflorescências com o capítulo todo aberto e os escapos retirados com o auxílio de tesoura. As inflorescências foram colocadas dentro do liquidificador por 30 segundos e as sementes foram classificadas em 2 peneiras (mais utilizadas na classificação de sementes florestais) medindo 425  $\mu\text{m}$  e 600  $\mu\text{m}$ . Sementes e impurezas que ficaram retidas entre essas duas peneiras foram separadas por densidade, sendo agitadas em bandeja durante 5 minutos, e com a ajuda de um pincel trincha (Figura 1).

**Figura 1** - Processo de beneficiamento das inflorescências para extração das sementes de sempre-viva



Fonte: Do autor (2017)

Após a classificação, foram determinados o teor de água, a germinação e o índice de velocidade de germinação, conforme metodologias descritas abaixo:

### 3.1.1 Perfil dos lotes

#### 3.1.1.1 Determinação do teor de água

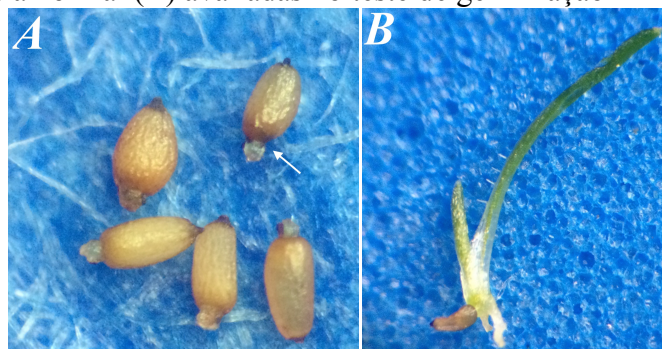
Determinado pelo método de estufa em alta temperatura a 130 °C durante uma hora, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foram utilizadas duas repetições de 0,1 grama de sementes, para cada tratamento, acondicionadas em recipientes de papel alumínio. Após esse período, as sementes foram acondicionadas em dessecadores até o resfriamento das amostras e em seguida foi efetuado o peso seco. Os resultados foram indicados em base úmida e expressos em porcentagens de água.

#### 3.1.1.2 Teste de germinação

Foi conduzido com quatro repetições de 100 sementes. A semeadura foi realizada em papel de germinação tipo mata borrão e umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 ml.g<sup>-1</sup> vezes o peso do substrato seco e colocadas em caixas plásticas tipo gerbox. As sementes foram mantidas em câmaras germinadoras tipo BOD sob regime alternado de temperatura e luz durante 35 dias, sendo 25 °C/16 horas na presença de luz e 15°C/8 horas no escuro para a espécie *Comanthera elegans* segundo Pereira et al. (2014) e para *Comanthera bisulcata* foi de 20 °C/16 horas na presença de luz e 15°C/8 horas no escuro segundo Oliveira e Garcia (2011).

A protrusão radicular e a germinação (percentual de plântulas normais) foram avaliadas com auxílio de lupa e os resultados foram expressos em porcentagem média (Figura 2).

**Figura 2** - Sementes de *Comanthera sp* com indicação da protrusão radicular (A) e plântula normal (B) avaliadas no teste de germinação



Fonte: Do autor (2017)

### **3.1.1.3 Tetrazólio**

As sementes remanescentes de cada tratamento do teste de germinação foram submetidas ao teste tetrazólio. Essas sementes foram colocadas em recipientes de plástico, cor âmbar, por causa da solução de tetrazólio que é fotossensível e se reduz com a presença de luz, imersa em solução de sal de tetrazólio a 1% durante 24 horas em temperatura constante de 25 °C em germinador (DUARTE; GARCIA, 2015). Após a coloração, a avaliação foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópico e bisturi para determinação da viabilidade.

### **3.1.1.4 Índice de velocidade de germinação (IVG)**

Efetuada em conjunto com o teste de germinação, realizado em contagens diárias do número de sementes com protrusão radicular até o final do teste de germinação e o índice calculado conforme Maguire (1962).

### **3.1.2 Avaliação da expressão enzimática**

Além das análises fisiológicas, foram avaliadas as atividades enzimáticas durante o processo de germinação por meio da técnica de eletroforese. Para a obtenção das sementes e plântulas normais nas diferentes fases durante o processo de germinação, estas foram semeadas no substrato papel e classificadas como 1) protrusão radicular, 2) folha primordial, 3) plântula normal e 4) sementes dormentes. Assim, as fases foram definidas como: sementes que não foram embebidas – semente seca (S), início da protrusão (Pro), aparecimento da folha primordial (FP), início da formação de plântula normal (Plt) e sementes dormentes ao final do processo de germinação (SD), totalizando 5 tratamentos.

Durante o processo de germinação, de acordo com as respectivas fases, as sementes e plântulas normais foram extraídas manualmente com o auxílio de microscópio estereoscópico e bisturi, pesadas e colocadas em eppendorf. A extração das sementes e plântulas normais nas 4 fases descritas durante a germinação foram respectivamente aos 6, 9, 20 e 35 dias após embebição para *C. elegans* e 9, 13, 25 e 35 dias para *C. bisulcata*.

Para obtenção do volume total de 100 mg em cada eppendorf de cada fase, foram efetuadas várias semeaduras. As sementes e plântulas normais foram armazenados em deep freezer (-86° C) para as análises eletroforéticas.

### 3.1.2.1 Análises da expressão de enzimas por meio da técnica de eletroforese

Para a extração das enzimas **catalase, superóxido dismutase, esterase, malato desidrogenase e álcool desidrogenase**, as sementes e plântulas foram maceradas na presença de polivinilpirrolidona (PVP) e nitrogênio líquido em mortar de porcelana. Em seguida, foram tomadas amostras de 100 mg para análise de cada enzima, acondicionadas em microtubos. Foram adicionados 250 µL de tampão de extração (Tris HCl 0,2 M, pH 8,0) e 0,1% de β-mercaptaenol. Estas permaneceram “overnight” e posteriormente foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos, a 4 °C. Do sobrenadante, foram retirados 60 µL com posterior aplicação em gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi efetuada à 150 volts por 6 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados conforme metodologia descrita por ALFENAS (2006).

Para a análise da **atividade enzimática da endo-β-mananase** foi realizada a maceração das sementes e plântulas normais em nitrogênio líquido e PVP. Para cada microtubo com 100 mg de pó de cada amostra, foram adicionados 300 µL de tampão de extração [0,1 M Hepes/ 0,5 M NaCl e ácido ascórbico (5 mg de ácido ascórbico por ml de tampão, pH 8,0)]. Na etapa seguinte as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm e 2 µL do sobrenadante aplicados em gel contendo 6 mL de LBG (Locust Bean Gum), 0,24 g de agarose e 24 mL de tampão pH 5,0 (1 M Ácido Cítrico/ 0,4 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O). As alíquotas foram aplicadas em furos de 2 mm feitos no gel com auxílio de um furador. O gel foi incubado por 21 h e revelado segundo metodologia proposta por da Da Silva et al. (2004). A mensuração do diâmetro dos halos em duas direções foi feita com auxílio do *software* ImageJ<sup>®</sup> resultando em uma média e feita uma comparação com a curva padrão gerada pela endo-β-mananase comercial de *Aspergillus niger* (Megazyme). O cálculo da atividade da enzima endo-β-mananase foi realizado de acordo com Downie, Hilhorst e Bewley (1994).

### 3.2 Análise dos resultados

Para a avaliação da atividade das enzimas, Esterase (EST), Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Malato Desidrogenase (MDH), Álcool Desidrogenase (ADH), a interpretação dos resultados foi baseada na análise qualitativa dos géis de eletroforese, levando-se em consideração a presença/ausência, bem como a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas em cada sistema isoenzimático avaliado. Para a análise quantitativa das bandas foi utilizado o Software de análise de imagens ImageJ (RASBAND, 1997) mensurado em pixel<sup>2</sup>. Este software foi especialmente desenvolvido para mensurar as isoformas contidas em cada uma das canaletas. Para a enzima endo- $\beta$ - mananase a expressão foi avaliada segundo Downie, Hilhorst e Bewley (1994).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Perfil dos lotes de sementes utilizados

Os teores de água das sementes das espécies *C. bisulcata* e *C. elegans* foram de 9% e 7%, indicando se tratarem de sementes mais ricas em óleo, já que estas atingem o ponto de equilíbrio higroscópico com menores teores de água, nas condições de temperatura de 25 °C e umidade relativa em torno de 60%, a exemplo de espécies oleaginosas como gergelim (ANTONIASSI et al., 2013), tabaco (FAUGNO, et al., 2016), algodão (CAVALCANTI-MATA; ROCHA; DUARTE, 2004), mamona (FANAN et al., 2009) e crambe (MASETTO et al., 2013).

Pelos resultados observados na Tabela 1, houve variação entre as duas espécies para a qualidade fisiológica das sementes de sempre vivas, avaliadas por meio de testes de germinação e IVG. Valores de germinação e IVG superiores foram observados em sementes da espécie *C. elegans* em relação a *C. bisulcata*. De acordo com os resultados do teste de tetrazólio ao final do teste de germinação foram observados que as sementes remanescentes não estavam viáveis (Tabela 1).

**Tabela 1** - Valores médios de sementes duras, dormentes, mortas e de plântulas normais obtidos no teste de germinação (%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de sempre-vivas.

| Espécies            | Plântulas normais (%) | Sementes (%) |           |        | IVG  |
|---------------------|-----------------------|--------------|-----------|--------|------|
|                     |                       | Duras        | Dormentes | Mortas |      |
| <i>C. bisulcata</i> | 25                    | 0            | 1         | 74     | 5,21 |
| <i>C. elegans</i>   | 46                    | 0            | 0         | 54     | 9,68 |

Fonte: Do autor (2017)

Resultados similares quanto ao baixo percentual de germinação em sementes de sempre-vivas foram encontrados nos trabalhos de Garcia; Oliveira e Duarte (2014); Nunes et al. (2008a, 2008b, 2008c); Oliveira et al. (2015). Entretanto, Oliveira e Garcia (2005) observaram a porcentagem de germinação acima de 50%. Esses resultados de baixa germinação são esperados uma vez que vários autores têm destacado alguns aspectos como: variação do clima que pode influenciar o início e término da colheita, o estado fisiológico no qual a semente se encontra, pelo período de maturação (TAIZ; ZEIGER, 2010) ou poderia ser pelas condições climáticas e/ou microcondições edáficas do local em que as plantas se desenvolveram nas quais as sementes foram produzidas (OLIVEIRA; GARCIA, 2011).

Neste experimento, as sementes foram coletadas, por produtores de flores, com diferentes níveis de maturidade. Apesar das inflorescências terem sido pré-selecionadas e as sementes terem passado por peneira e densidade, ainda assim apresentaram baixa germinação, abaixo de 50%.

De acordo com Oliveira et al. (2015) ao estudarem o período de coleta de *C. elegans* afirmaram que os resultados encontrados em seus trabalho estão de acordo com os encontrados nas literaturas e que de acordo com as taxas de germinação, que foram abaixo de 50%, comprovam que a coleta das inflorescências ocorre antes do período de formação das sementes e que apenas uma pequena porção das sementes conseguem atingir a maturidade fisiológica (antes de maio), sendo que o início de dispersão das sementes ocorre em maio e as coletas em abril.

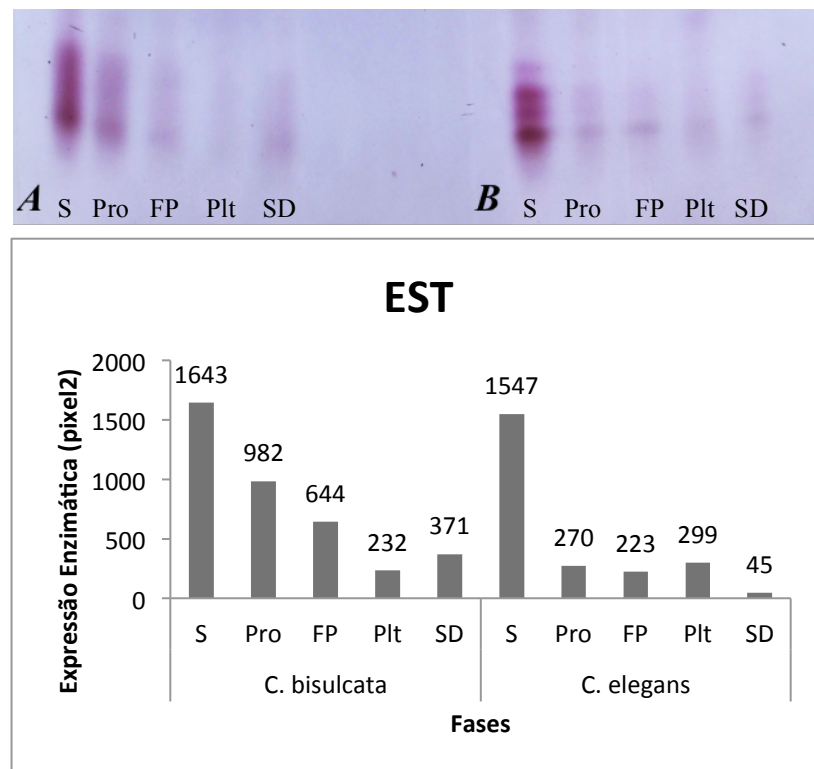
#### 4.2 Análise das expressões enzimáticas

Por meio da análise dos padrões enzimáticos de sementes e plântulas de sempre vivas, observou-se variações das expressões das enzimas avaliadas em diferentes fases do processo de germinação.

### a) *Esterase*

Pela análise eletroforética da enzima esterase (EST), observou-se maior expressão em sementes secas com pequenas diferenças de concentração nas duas espécies (1643 e 1547 pixel<sup>2</sup>). Durante o processo de germinação, em ambas as espécies, foi observado a expressão da enzima EST. Enquanto na *C. bisulcata* houve um decréscimo gradual da EST ao longo do processo germinativo, para a espécie *C. elegans* observou-se um decréscimo mais acentuado. A diminuição da atividade da EST, em ambas as espécies ao longo do processo germinativo, pode estar atrelada ao fato dessa enzima estar relacionada à degradação de lipídeos.

**Figura 3** - Expressões da enzima esterase (EST) em sementes de sempre vivas, das espécies *C. bisulcata* (A) e *C. elegans* (B), nas diferentes fases durante o processo de germinação.



(S) sementes secas, (Pro) protrusão, (FP) aparecimento da folha primordial, (Plt) início da formação de plântula normal e (SD) sementes dormentes. Fonte: Do autor (2017)

As ESTs representam um grande grupo de enzimas, mínimo de 20, que catalisam a quebra de ligações de ésteres (RUDAKOVA et al., 2016) e que podem estar envolvidas no

catabolismo de lipídeos durante o processo de germinação (THEODOULOU; EASTMOND, 2012). Este processo é importante para a retomado do crescimento do eixo embrionário (VEIGA et al., 2010).

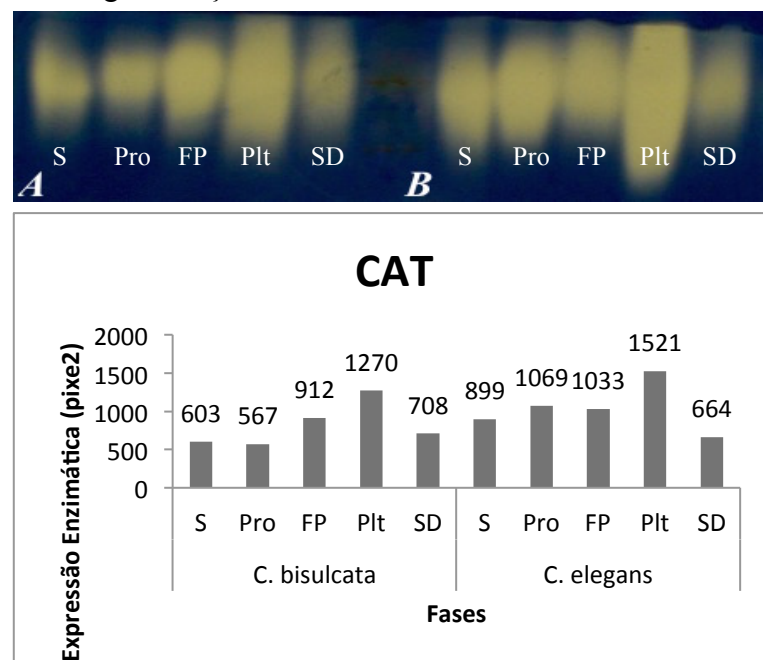
Estudando a expressão de isoenzimas durante o processo de germinação de arroz, (MALONE et al., 2007) e trigo (BHATIA; NILSON, 1969) também observaram que em sementes secas (0 dias), ou seja, sementes não embebidas, obtiveram maior expressão e intensidade dos alelos comparados aos padrões das diferentes fases da germinação.

A mobilização de triglicerídeos em plantas é observada principalmente nas sementes para estimular o crescimento pós-germinativo (KELLY; FEUSSNER, 2016).

### b) *Catalase*

As maiores expressões da enzima catalase (CAT) foram observadas em plântulas das duas espécies (1270 e 1521 pixel<sup>2</sup>) (Figura 4). Durante o processo de germinação houve um acréscimo gradual da expressão da CAT na espécie *C. bisulcata*, enquanto que na *C. elegans* variou.

**Figura 4** - Expressões da enzima catalase (CAT) em sementes de sempre vivas, das espécies *C. bisulcata* (A) e *C. elegans* (B), nas diferentes fases durante o processo de germinação.



(S) sementes secas, (Pro) protrusão, (FP) aparecimento da folha primordial, (Plt) início da formação de plântula normal e (SD) sementes dormentes. Fonte: Do autor (2017)

Menor atividade da enzima CAT foi observada em sementes dormentes, provavelmente em função do baixo metabolismo.

Na espécie *C. elegans* observou-se maior expressão principalmente a partir da protrusão radicular enquanto em *C. bisulcata* foi em folha primordial.

A alta expressão da enzima catalase em plântulas das duas espécies pode estar relacionado à ação dessa enzima em atuar de forma eficiente na eliminação de enzimas reativas de oxigênio, as EROs, na qual aumenta a capacidade de proteção contra o estresse oxidativo.

Feng et al. (2011) afirmam que as espécies reativas de oxigênio (EROs) têm papel duplo na biologia vegetal, podendo tanto apresentar efeitos benéficos como prejudiciais, a exemplo disso pode-se citar a toxicidade relacionadas aos produtos produzidos pelo metabolismo aeróbico, como também ser a chave de reguladores de crescimento, desenvolvimento e vias de defesa.

O aumento da expressão da enzima CAT, pode ser um indicativo de aumento de EROs nas células. Resultados semelhantes foram encontrados por Feng et al., 2011 durante a germinação de sementes de *Jatropha curcas* e observaram que a quantidade de CAT presente em células aeróbicas é diretamente proporcional ao estado oxidativo das células, ou seja, o aumento da atividade da enzima CAT está provavelmente envolvido com o mecanismo de defesa de plântulas de *J. curcas*, contra o estresse oxidativo durante a germinação.

De acordo com Kibinza et al. (2011), o estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de EROs e contra a defesa antioxidante das EROs. Para prevenir os danos causados nos componentes celulares, as células são protegidas com várias enzimas e mecanismos não enzimáticos para a desintoxicação celular, como as enzimas CAT e SOD.

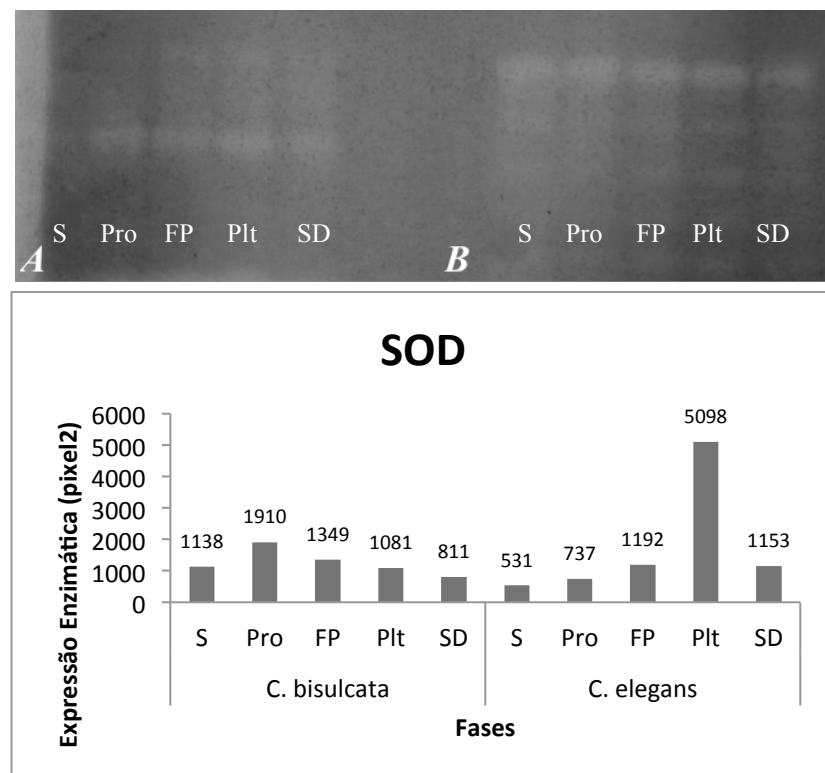
Ao estudar a expressão da enzima CAT em sementes de tremoço branco, Garnezarska; Wojtyla (2008) verificaram a presença tanto no eixo embrionário quanto nos cotilédones e que a enzima teve sua atividade aumentada durante o processo germinativo.

### **c) Superóxido dismutase**

Em relação à enzima superóxido dismutase (SOD), pode-se observar maior expressão para a espécie *C. bisulcata* em sementes com protrusão radicular e para *C. elegans* em

plântulas (1138 e 5098 pixel<sup>2</sup>). Durante o processo de germinação, na espécie *C. bisulcata* houve decréscimo da expressão de SOD de forma progressiva, enquanto que na *C. elegans* houve um acréscimo gradual em sementes com protrusão radicular e com folha primordial com um aumento abrupto na concentração dessa enzima em plântulas. (Figura 5).

**Figura 5** - Expressões da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de sempre vivas, das espécies *C. bisulcata* (A) e *C. elegans* (B), nas diferentes fases durante o processo de germinação.



(S) sementes secas, (Pro) protrusão, (FP) aparecimento da folha primordial, (Plt) início da formação de plântula normal e (SD) sementes dormentes. Fonte: Do autor (2017).

Para que as células não deteriorem por intoxicação, estas possuem um eficiente mecanismo de enzimas removedoras de EROs (espécies reativas de oxigênio) (BAILLY, 2004).

Em geral, as plantas têm mecanismos de desintoxicação de EROs no qual a primeira linha de defesa contra radicais livres é realizada pela enzima SOD (TESSUTTI et al., 2013). Através da reação de dismutação, o superóxido ( $O_2^-$ ) é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) pela SOD e que por sua vez esse produto pode ser reduzido em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) pela enzima CAT (GILL; TUTEJA, 2010). Neste sentido, o balanço

entre essas enzimas antioxidantes é fundamental na regulação dos níveis de EROs dentro das células (ABREU et al., 2014).

Os primeiros tipos de sistemas de defesa antioxidante desenvolvidos contra danos oxidativos, são aqueles que impedem as EROs e também aqueles que bloqueiam e capturam radicais que são formados (PISOSCHI; POP, 2015).

A presença de enzimas antioxidantes em sementes secas e sua ativação durante a germinação representa uma adaptação metabólica que leva ao desenvolvimento e preparação das sementes para as reações que ocorrem durante a germinação depois da protrusão da radícula (WOJTYLA et al., 2006).

Maiores expressões foram observadas em plântulas da espécie *C. elegans* tanto para a expressão da enzima CAT quanto para a SOD que pode ser pelo fato destas estarem envolvidas na preservação das sementes e também na proteção contra as EROs nas células e tecidos de sementes e plântulas durante o processo de germinação.

#### **d) Malato desidrogenase**

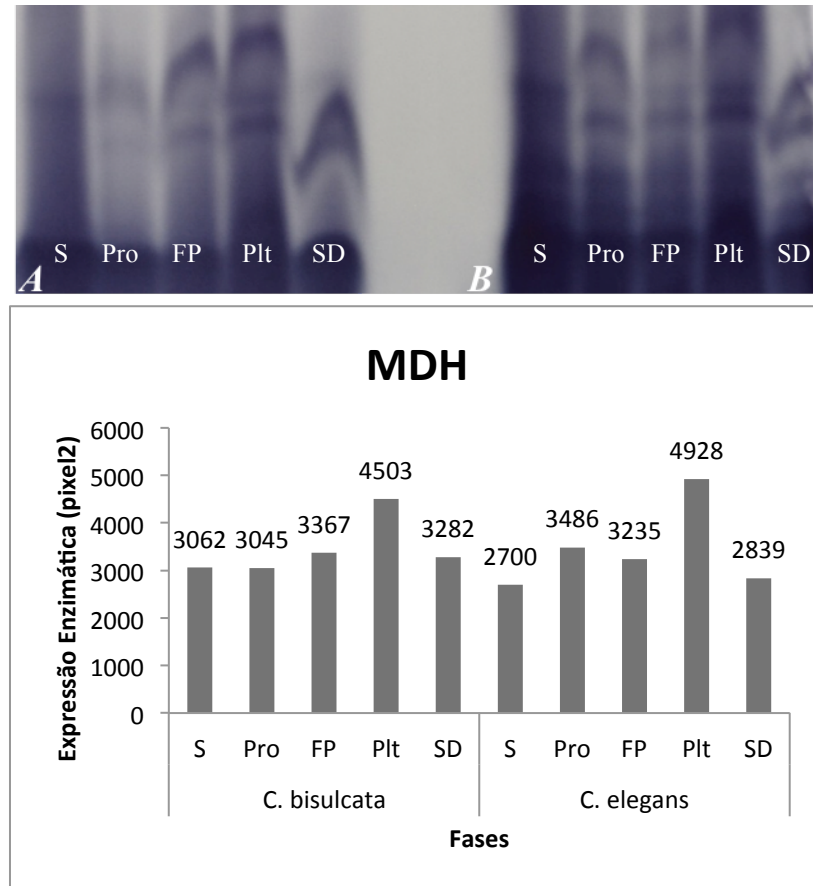
Maiores expressões da enzima malato desidrogenase (MDH) nas duas espécies foram encontradas em plântulas (4503 e 6447 pixel<sup>2</sup>). Observa-se que na espécie *C. bisulcata* a expressão da MDH aumenta de forma gradativa e na *C. elegans* variou (Figura 6).

O fato da expressão da enzima MDH ser consideravelmente maior na *C. elegans* pode ser explicado pelo fato dessa espécie ter um maior vigor e porcentagem de germinação de acordo com o IVG e o teste de germinação.

Similares resultados foram encontrados por Santos et al. (2016) que ao estudarem a qualidade fisiológica de sementes de milho através da atividade respiratória e enzimática afirmam que sementes vigorosas respiram mais comparadas àquelas menos vigorosas, o qual tem um alto consumo de O<sub>2</sub> e conseqüentemente um aumento na produção de CO<sub>2</sub>.

De acordo com Bewley; Black (1994), a atividade e integridade das mitocôndrias de embriões viáveis aumentam a partir do início da embebição, tornando mais eficiente a produção de Adenosina trifosfato (ATP - forma de armazenamento de energia), refletindo a elevação do consumo de oxigênio.

**Figura 6** - Expressões da enzima malato desidrogenase (MDH) em sementes de sempre vivas, das espécies *C. bisulcata* (A) e *C. elegans* (B), nas diferentes fases durante o processo de germinação.



(S) sementes secas, (Pro) protrusão, (FP) aparecimento da folha primordial, (Plt) início da formação de plântula normal e (SD) sementes dormentes. Fonte: Do autor (2017).

A MDH desempenha papel significativo no ciclo de Krebs, uma vez que catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, produzindo NADH, que é um produto fundamental na produção de ATP e de compostos intermediários essenciais ao funcionamento das células (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A MDH está presente tanto na matriz mitocondrial como no citoplasma das células. Durante a germinação das sementes, essa enzima atua no processo de gliconeogênese, responsável por produzir sacarose a partir de triacilgliceróis presentes no interior dos oleossomos (corpos lipídicos), nos tecidos de reserva da semente. No citoplasma a MDH também catalisa a reação de redução do oxaloacetato à malato produzindo NAD<sup>+</sup> que é necessária para a glicólise (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Contrário aos resultados observados neste presente trabalho e ao de Santos et al. (2016), estudos feitos por Malone et al. (2007) observaram que a intensidade das bandas, em relação à atividade da MDH, foi maiores em sementes não embebidas. Há a hipótese de que uma maior expressão dessa enzima está associada com a síntese de novos tecidos nos estágios iniciais do desenvolvimento.

No estudo realizado por Albuquerque et al. (2009) durante a embebição em sementes de sucupira-preta, foi verificado diferença entre os lotes no que se refere ao padrão enzimático da enzima MDH. Enquanto uns dos lotes, após 48 horas de embebição houve surgimento de novas bandas, no outro não obteve alteração na atividade dessa enzima com o avanço da germinação.

Caixeta et al. (2014) ao estudarem diferenças nos estágios de maturação das sementes e épocas de armazenagem durante a germinação de sementes de pimenta, relataram que sementes recém armazenadas e naquelas com quatro meses de armazenamento a respiração aeróbica foi maior no início do desenvolvimento das sementes. Já no oitavo mês de armazenamento, pelo fato das sementes estarem em estágios avançados de deterioração, houve um aumento na atividade respiratória e conseqüentemente uma maior expressão da enzima MDH e estes resultados podem estar associados com a germinação e vigor.

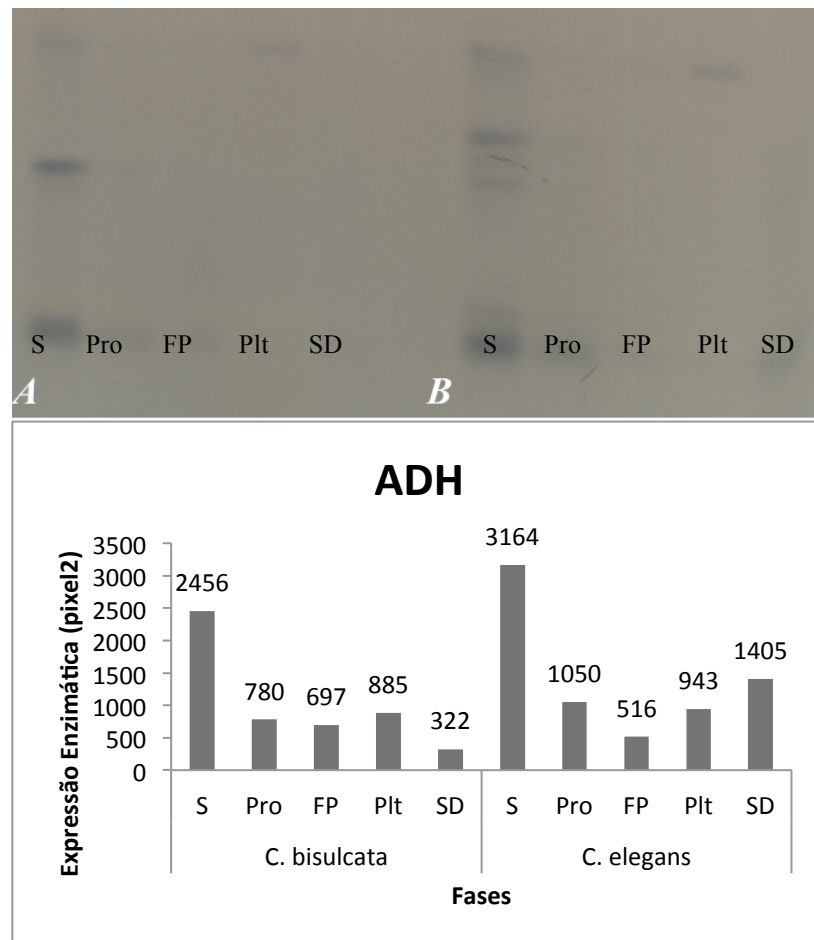
O aumento da expressão da enzima MDH em diferentes locais das células pode estar diretamente relacionado com o aumento da respiração, que ocorre em sementes em estágios avançados de deterioração, uma vez que enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em sementes de potencial fisiológico reduzido (SHATTERS et al., 1994).

A enzima MDH tem grande potencial de ser um marcador da respiração aeróbica das sementes durante o processo de germinação.

#### **e) *Álcool desidrogenase***

Outra enzima envolvida no processo de respiração é a álcool desidrogenase (ADH). A maior expressão dessa enzima foi observada em sementes que não foram embebidas das duas espécies. Em sementes secas da espécie *C. elegans* existem isoformas que em *C. bisulcata* desapareceram. Durante o processo de germinação, a expressão da enzima ADH varia tanto em relação às duas espécies como nas fases que as sementes e plântulas se encontravam. (Figura 7).

**Figura 7** - Expressões da enzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes de sempre vivas, das espécies *C. bisulcata* (A) e *C. elegans* (B), nas diferentes fases durante o processo de germinação.



(S) sementes secas, (Pro) protrusão, (FP) aparecimento da folha primordial, (Plt) início da formação de plântula normal e (SD) sementes dormentes. Fonte: Do autor (2017).

A maior expressão dessa enzima foi observada em sementes não embebidas que pode estar relacionada à respiração anaeróbica.

Resultados similares foram encontrados no trabalho de Malone et al. (2007) estudando a expressão de isoenzimas durante o processo de germinação em sementes de arroz. Os autores observaram mudanças no padrão isoenzimático para ADH com o surgimento de dois alelos com expressões exclusivamente em sementes secas. A medida que o processo de germinação avançou e o processo aeróbico responsável por gerar energia começava a ser predominante, a enzima da ADH foi reduzida.

Conkle (1971) também verificou que a maior expressão da ADH foi no embrião de sementes secas diminuindo de acordo com o processo de germinação.

Em estudos realizados por Abreu et al. (2013) foi observado que em sementes aos quatro e oito meses de armazenamento em câmara fria e embaladas à vácuo houve maior expressão da enzima ADH. Este comportamento foi devido à falta de oxigênio disponível que por sua vez ativou a respiração anaeróbica.

No processo de fermentação alcoólica o piruvato, primeiramente produzido na glicólise, é convertido a acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase e o acetaldeído reduzido a etanol pela ADH que é considerado menos tóxico à planta além de poder se difundir para fora da célula (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Algumas sementes ficam sob condições temporárias de baixa disponibilidade de O<sub>2</sub> (hipóxia) durante a embebição, nesse caso o etanol, produto da respiração anaeróbica, é acumulado no interior da semente (BEWLEY et al., 2013). O processo de acumulação de etanol envolve a oxidação de NADH e resulta na produção de pequenas quantidades de ATP, fundamental para a sobrevivência de várias espécies sob condições de hipóxia (KENNEDY; RUMPHO; FOX, 1992).

A semente ficará mais susceptível à ação deletéria do acetaldeído, caso a ADH tiver sua atividade diminuída (ZHANG et al., 1994), que é mais tóxico para as células que o etanol formado na presença dessa enzima.

Conforme estudos feitos por Gadotti, Meneghello e Tillmann (2013) com o aumento do pH, em sementes de milho, maior é a ativação da enzima ADH com uma banda mais nítida e intensa.

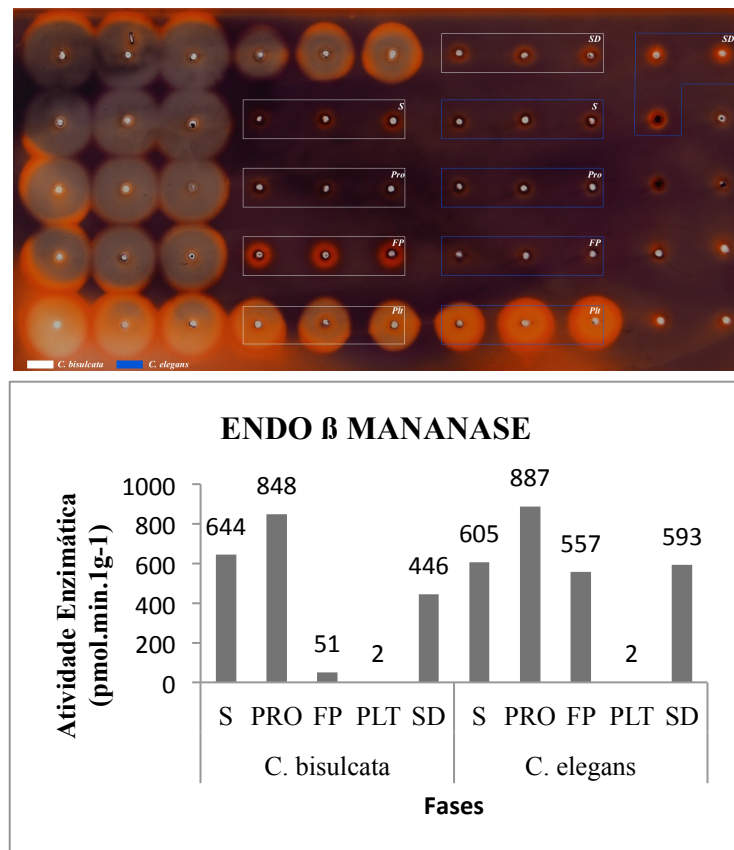
O fato de que a maior expressão da enzima observada neste trabalho seja em sementes secas, pode estar atribuída a inexistência de oxigênio disponível, favorecendo assim a rota da respiração anaeróbica. A medida que ocorre o processo de embebição das sementes se observa o suprimento de oxigênio, justificando a diminuição da atividade enzimática da ADH.

#### **f) *Endo-β-mananase***

Em relação à atividade da enzima endo-β-mananase, tanto na espécie *C. bisulcata* como na *C. elegans*, pode-se verificar maior expressão na fase de protrusão (848 e 887 pmol.min.1g<sup>-1</sup>) e menor em plântulas (51 e 2,0 pmol.min.1g<sup>-1</sup>). Na espécie *C. bisulcata* a concentração dessa enzima descrece de forma mais acentuada da fase protrusão para folha

primordial, enquanto na *C. elegans* o decréscimo maior é observado da fase folha primordial para plântula. (Figura 8).

**Figura 8** - Expressões da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes de sempre vivas, das espécies *C. bisulcata* e *C. elegans*, nas diferentes fases durante o processo de germinação.



(S) sementes secas, (Pro) protrusão, (FP) aparecimento da folha primordial, (Plt) início da formação de plântula normal e (SD) sementes dormentes. Fonte: Do autor (2017).

O tamanho dos alos na Figura 8 é indiretamente proporcional à expressão da enzima endo- $\beta$ -mananase.

Em sementes, devido ao enrijecimento do endosperma, ocorre a inibição da protrusão radicular (NASCIMENTO; CRODA; LOPES, 2012).

Da Silva et al. (2004) afirmam que, em sementes com germinação limitada pelo endosperma, há necessidade do enfraquecimento desse tecido para que haja a protrusão da radícula, sendo esse papel desempenhado por enzimas como a endo- $\beta$ -mananase.

Resultados semelhantes foram encontrados por De Farias et al. (2015) ao estudarem a expressão em embriões e endosperma micropilar durante a germinação em sementes de café. Esses autores observaram um aumento da atividade enzimática durante a embebição das sementes, e afirmam que a enzima endo- $\beta$ -mananase desempenha um papel importante no enfraquecimento das paredes celulares do endosperma.

A atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, em sementes de café, age primeiro no endosperma micropilar para mais tarde agir no resto do endosperma (DA SILVA et al., 2004).

Em estudo realizado por Nascimento e Cantliffe (2002) com sementes de alface foi verificado que o aumento da atividade da endo- $\beta$ -mananase estava associado ao enfraquecimento do endosperma sob altas temperaturas, levando a semente à germinação. Resultados similares foram encontrados nos estudos feitos por Catão et al. (2014) em sementes de alface nas quais a maior atividade dessa enzima, em sementes germinadas em altas temperaturas, estava diretamente relacionada à termotolerância da semente.

Assim, ressalta-se nessa pesquisa que, a maior atividade no padrão enzimático da enzima endo- $\beta$ -mananase foram observados em sementes com protrusão radicular que por sua vez é responsável pela degradação do endosperma na germinação das sementes.

## 5 CONCLUSÕES

Ocorre o aumento da expressão da enzima CAT e redução da enzima EST ao longo do processo de germinação das sementes das espécies *C. bisulcata* e *C. elegans*

A expressão da enzima endo- $\beta$ -mananase é maior em sementes das espécies *C. bisulcata* e *C. elegans* na fase de protrusão radicular.

Há variação na expressão das enzimas SOD, ADH e MDH em sementes das espécies *C. bisulcata* e *C. elegans* durante o processo de germinação.

## REFERÊNCIAS

ABREU, L. A S. et al. Deterioration of sunflower seeds during storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 240-247, 2013.

ABREU, V. M. et al. Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 040-047, 2014.

- ALBUQUERQUE, K. S. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.) **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 13, p. 012-019, 2009.
- ALDASORO, I.; NICOLÁS, G. Fermentative products and dark CO<sub>2</sub> fixation during germination of seeds of *Cicer artetirum*. **Phytochemistry**, Pullman, v.19, n. 1, p. 3-5, 1980.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.
- ANTONIASSI R. et al. Influência das condições de cultivo na composição da semente e do óleo de gergelim. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n.3, p. 301-310, 2013.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004.
- BARRETO, L. C.; ECHTERNACHT, L.; GARCIA, Q. S. Seed coat sculpture in *Comanthera* (Eriocaulaceae) and its implications on taxonomy and phylogenetics. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 299, n. 8, p. 1461-1469, 2013.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. Academic Press, San Diego, 666 p, 1998.
- BEDÊ, L. C. **Alternativas para o uso sustentado de sempre-vivas: efeitos do manejo extrativista sobre *Syngonanthus elegantulus* Ruhland (Eriocaulaceae)**. 2006. 184 p. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- BEDÊ, L. C. **Busca de alternativas para uso sustentado de sempre-vivas na região de Diamantina, MG: estudo dos efeitos decorrentes do manejo extrativista sobre a dinâmica populacional de *Syngonanthus elegans* var. *elenatus* (Eriocaulaceae)**. 2002. 17 p. Relatório técnico. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- 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.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2. ed. New York: Ed. Plenum Press, 1994.
- BEWLEY, J. D.; NONOGAKI, H.; HILHORST, H. W. M.; BRADFORD, K. J. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3a edição. New York: Springer-Verlag, 392p., 2012
- BHATIA, C. R.; NILSON, J. P. Isoenzyme Changes Accompanying Germination of Wheat Seeds. **Biochemical Genetics**, New York, v. 3, n.3, p. 207-214, 1969.

- BOREK, S., RATAJCZAK, W., RATAJCZAK, L. Ultrastructural and Enzymatic Research on the Role of Sucrose in Mobilization Storage Lipids in Germinating Yellow Lupine Seeds. **Plant Science**, Limerick, v. 170, n. 3, p. 441-452, 2006.
- BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PINA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coord.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, p. 83-136, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 399p., 2009.
- BRASIL. Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 dez. 2014. Seção 1, p. 110.
- BUCKERIDGE, M. S. et al. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, 324p.
- CAIXETA, F. et al. Physiological and biochemical alterations during germination and storage of habanero pepper seeds. **African Journal of Agricultural Research**, Nigéria, v. 9, n. 6, p. 627-635, 2014.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. (Ed.) **Sementes: ciências, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p., 2000.
- CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (orgs). **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre, p. 149-162, 2004.
- CATÃO, H. C. R. M. et al. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de alface em diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 4, p. 316-322, 2014.
- CAVALCANTI-MATA, M. E. R. M.; ROCHA, M. S.; DUARTE, M. E. M. Teor de água limite para crioconservação de sementes de algodão arbóreo variedade 6m. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 179-189, 2004.
- CONKLE, M. T. Isozyme specificity during germination and early growth of Knobcone Pine. **Forest Science**, Bethesda, v. 17, n. 4, p. 494-498, 1971.
- DA SILVA, E. A. et al. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 251-261, 2004.
- DE FARIAS, E. T. et al. Expression studies in the embryo and the micropylar endosperm of germinating coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seeds. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 75, n. 02, p. 575-581, 2015.
- DIAS, B. A. S. **Aspectos morfoanatômicos de inflorescências e sementes e**

- comportamento germinativo de *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae) em função da época de coleta.** 2006. 26 p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina. 2006.
- DOWNIE, B; HILLHORST H. W. M.; BEWLEY J. D. A. New assay for quantifying endo- $\beta$ -D-mannanase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, v. 36, n. 4, p. 829-835, 1994.
- DUARTE, D. M.; GARCIA, Q. S. Interactions between substrate temperature and humidity in signalling cyclical dormancy in seeds of two perennial tropical species. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 25, n. 02, p. 170-178, 2015.
- ECHTERNACHT, L.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Rediscoveries in Eriocaulaceae: Seven narrowly distributed taxa from the Espinhaço Range in Minas Gerais, Brazil. **Feddes Repertorium**, Berlin, v. 121 n. 3-4, p. 117–126, 2010.
- FANAN, S. et al. INFLUÊNCIA DA COLHEITA E DO ARMAZENAMENTO NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MAMONA. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 150-159, 2009.
- FAUGNO, S. et al. Mechanical oil extraction of *Nicotina tabacum* L. seeds: analysis of main extration parameters on oil yield. **Journal of Agricultural Engineering**, Pisa, v. 47, n. 3, p. 142-147, 2016.
- FENG, C. et al. Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. **International Journal Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 13, n. 1, p. 25–30, 2011.
- GADOTTI, G. I.; MENEGHELLO, G. E.; TILLMANN, M. A. A. Faixa de exigência e influência do pH no teste de germinação. **Revista de la Facultad de Agronomía**, La Plata, v. 112, p. 27-34, 2013.
- GARCIA, Q. S.; OLIVEIRA, P. G; DUARTE, D. M. Seasonal changes in germination and dormancy of buried seeds of endemic Brazilian Eriocaulaceae. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 24, n. 02, p. 113-117, 2014.
- GARNEZARSKA, M.; WOJTYLA, L. Differential response of antioxidative enzymes in embryonic axes and cotyledons of germinating lupine seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 30, n. 4, p. 427-432, 2008
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology & Biochemmistry**. New Delhi, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.
- GIULIETTI, A. M. Novas espécies no gênero *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae) para o Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 15, p. 63-71, 1996.
- GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil.

**Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 4, n. 1, p. 133-159, 1990.

GIULIETTI, A. M. et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista das espécies. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 9, p. 1- 151, 1987.

GIULIETTI, A. N. et al. The synonymization of *Philodice* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, Auckland, v. 60, n. 1 p. 50-56, 2012.

GIULIETTI, N. et al. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 179-193, 1988.

GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 115-142, 2008.

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

HENNING, F. A. et al. Qualidade fisiológica, sanitária e análise de isoenzimas de sementes de aveia-preta tratadas com diferentes fungicidas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 063-069, 2009.

HU, R. et al. Plant peroxisomes: Biogenesis and Function. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, n.6, p. 2279-2303, 2012.

JIANG, H. et al. Global Analysis of gene expression profiles in developing physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.

KARANTONIS, H C.; NOMIKOS, T.; DEMOPOULOS, C. A. Triacylglycerol metabolism. **Current drug targets**, v. 10, n. 4, p. 302-319, 2009.

KELLY, A.; FEUSSNER, I. Oil is on agenda: Lipid turnover in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v. 1861, n. 9, p. 1253-1268, 2016.

KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E.; FOX, T. C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, n. 1, p. 1-6, 1992.

KIBINZA, S. et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, Oxford, v. 181, n. 3, p. 309–315, 2011.

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

LABOURIAU, L.G. A germinação das sementes. **Washington: Secretaria da OEA**. 173p, 1983.

LIMA, M. G. S. **Deteção de genes e expressão enzimática em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) crescidas sob estresse salino**. 2008, 93p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2008.

LINKIES, A. et al. The evolution of seeds. **New Phytologist**, Cambridge, v. 186, n. 4, p. 817–831, 2010.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison. v. 2, p. 176-177, 1962.

MALONE, G. et al. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 1, p.61-67, 2007.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de semente de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MASETTO, T. E. et al. Armazenamento de sementes de *Crambe abyssinica* Hoschst. ex R.E.Fr. em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 5, p. 646-652, 2013.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The Germination of Seeds**. Pergamon Press, Oxford, 1989.

MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG: **Fundação Biodiversitas / Fundação Zoo – Botânica de Belo Horizonte**, Belo Horizonte, 2000.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J.; HUBER, D. J. Endo-b-mannanase activity and seed germination of thermosensitive and thermotolerance lettuce genotypes in response to seed priming. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, n. 3, p. 255-264, 2001.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D.J. Germinação de sementes de alface sob altas temperaturas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p.103-106, 2002.

NASCIMENTO, W. M.; FREITAS, R. A. Produção de sementes de pimentas. In: RIBEIRO, C. S. C. et al. (Ed.). **Cultivo de pimentas (*Capssicum* spp.) no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, v. 27, p. 30-39, 2006.

NASCIMENTO, W.M.; CRODA, M.D.; LOPES, A.C.A. Produção de sementes, qualidade fisiológica e identificação de genótipos de alface termotolerantes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 34, n. p. 510–517, 2012.

- NEDEL, J. L.; ASSIS, F. N.; CARMONA, P. S. **A planta de arroz- morfologia e fisiologia**. 1996. 56p. (Módulo 1 – curso de especialização em Produção de Sementes de Arroz Irrigado). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1996.
- NEVES, A. C. O.; BEDÊ, L. C.; MARTINS, R. P. Revisão sobre os efeitos do fogo em Eriocaulaceae como subsídio para a sua conservação. **Biodiversidade Brasileira**, n. 2, 2011.
- NONOGAKI, H.; MATSUSHIMA, H.; MOROHASHI, Y. Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 167-172, Jun. 1992.
- NUNES, S. C. P. et al. Época, local de colheita e armazenamento na qualidade fisiológica da semente de sempre-viva (*Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland-Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 32-39, 2008a.
- NUNES, U. R. et al. Época de maturação, dispersão, colheita e qualidade fisiológica de sementes de sempre-vivas (*Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1775-1780, 2008b.
- NUNES, U. R. Efeito da época de colheita, irrigação e permanência de sementes em solo seco no desenvolvimento inicial de plântulas de *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 064-070, 2008c.
- OLIVEIRA, M. N. S. et al. Harvest times of *Comanthera elegans*, a worldwide traded Brazilian species of everlasting flower: implications on seed production, germination, and on species management. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 795-808, dec. 2015.
- OLIVEIRA, P. G.; GARCIA, Q. S. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Syngonanthus elegantulus* Ruhland, *S. elegans* (Bong.) Ruhland e *S. venustus* Silveira (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 19, n. 3, p. 639-645, 2005.
- OLIVEIRA, P. G.; GARCIA, Q. S. Germination characteristics of *Syngonanthus* seeds (Eriocaulaceae) in campos rupestres vegetation in south-eastern Brazil. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 21, n. 01, p. 39-45, 2011.
- PARRA, L. R. et al. Reestablishment and new circumscription of *Comanthera* (Eriocaulaceae). **Taxon**, Utrecht, v. 59, n. 04, p. 1135-1146, 2010.
- PEREIRA, L. A. et al. Embryo morphology indicates physiological maturity better than seed mass in *Syngonanthus elegans* (Eriocaulaceae). **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 42, n. 1, p. 161-170, 2014.
- PISOSCHI, A. M; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 97, p. 55-74, 2015.

- POIRIER, Y. et al. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation - A metabolic pathway with multiple functions, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1763, n.12, p. 1413-1426, 2006.
- POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 289p, 1985.
- PRACHAROENWATTANA, I.; CORNAH, J. E.; SMITH, S. M. Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in beta-oxidation but not in the glyoxylate cycle. **The Plant Journal**, v. 50, n. 3, p. 381-390, 2007.
- QUETTIER, A. L.; EASTMOND, P. J. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 47, n. 6, p. 485-490, 2009.
- RAJJOU, L. et al. Seed germination and vigor. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 507-533, 2012.
- RAMIREZ, H.; CALDERON, A.; ROCCA, W. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: ROCCA, W.; MROGINSKI, L. (Ed). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. **Cali**, CIAT, p. 825-856, 1991.
- RAMOS, M. B. P.; VARELA, V. P. Efeito da temperatura e do substrato sobre a germinação de sementes de visgueiro do igapó (*Parkia discolor* Benth) Leguminosae, Mimosoideae. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, n. 39, n. 1, p. 123-133, 2003.
- RASBAND, W. S. **Image J: Image Processing and Analysis in Java**. Available from the U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Available in: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>, 1997
- REJON, J. D. et al. Profiling and functional classification of esterases in olive (*Olea europaea*) pollen during germination. **Annals of Botany**, London, v. 110, n. 5, p. 1035-1045, 2012.
- RUDAKOVA, A. S. et al. Isozymic analysis of esterases in mature seeds of hexaploid soft wheat (*Triticum aestivum* L.) **Agricultural Biology**, Moskva, v. 51, p. 327-334, 2016.
- SÁ, A.A.A. **Dinâmica de florestas pistiladas, estaminadas e germinação de *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland e *S. venustus* em diferentes épocas de coleta dos capítulos**. 2007. 44 p. Monografia (graduação em Agronomia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina. 2007.
- SANO, P. T. et al. **Eriocaulaceae**. In: **Martinelli G, Moraes MA (eds) Livro Vermelho da Flora do Brasil**. Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p 496–501, 2013.
- SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.

- SANTOS, H. O. et al. Physiological quality of hybrid maize seeds through respiratory and enzymatic activities. **African Journal of Agricultural Research**, Nigéria, v. 11, n. 20, p. 1879-1886, 2016.
- SATURNINO, H. M.; SATURNINO, M. A. C.; BRANDÃO, M. Algumas consideraçõ sobre exportação e importação de plantas ornamentais em Minas Gerais. In: **XXIII Congresso Nacional de Botânica**. Anais da Sociedade de Botânica do Brasil. p. 213-217, 1977.
- SCATENA, V. L.; CARDOSO, V. A.; GIULIETTI, A. M. Morfoanatomia de espécies de *Blastocaulon Ruhland* (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v.13, n. 1, p. 29-41, 1999.
- SCATENA, V. L.; LEMOS FILHO, J. P.; LIMA, A. A. A. Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Syngonanthus elegans* e *S. niveus* (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 10, n. 1, p. 85-91, 1996.
- SCATENA, V. L.; GIULIETTI, A. M.; CARDOSO, V. A. Anatomia de raízes, escapos e folhas de espécies de *Eriocaulon* L. (Eriocaulaceae). **Boletim de Botânica** da Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 18, p. 11-20, 1999.
- SCATENA, V. L.; MENEZES, N. L. Anatomia dos escapos e folhas de *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae) de Campos rupestres. **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 317-332, 1996.
- SCATENA, V. L.; VICH, D. V.; PARRA, L. R. Anatomia de escapos, folhas e brácteas de *Syngonanthus* sect. *Eulepis* (Bong. Ex Koern.) Ruhland (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 18, n. 4, p. 1-12, 2004.
- SCHMIDT, I. B.; FIGUEIREDO, I. B.; SCARIOT, A. Ethnobotany and Effects of Harvesting on the Population Ecology of *Syngonanthus nitens* (Bong) Ruhland (Eriocaulaceae), a NTFP from Jalapão Region, Central Brazil. **Economic Botany**, Bronx, v. 61, n. 1, p. 73-85, 2007.
- SHATTERS, R. G. J. R. et al. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 01, p. 33-41, 1994.
- SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water-deficit and desiccation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 125, n. 1, p. 27-58, 1993.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2013. Fisiologia Vegetal. 5a ed. Porto Alegre: Artmed. 954 p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology, 5th edn. Sinauer Associates Inc, Sunderland. 2010.
- TESSUTTI, L. S. et al. Measuring the antioxidante capacity of blood plasma using potentiometry. **Analytical Biochemistry**, New York, v., 441, n. 2, p. 109-114, 2013.
- THEODOULOU, F. L.; EASTMOND, P. Seed storage oil catabolism: a story of give and take. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 322-328, 2012.

TOOROP, P. E.; VAN, A. A. C.; HILHORST, H. W. M. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germinations is under control of ABA. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 349, p. 1371-1379, 2000.

TUNES, L. M. et al. Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 2, p. 178-184, 2011.

VASCONCELOS, A. C. F. et al. Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. **Scientia Agricola** Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 395-402, May/Jun, 2009.

VEIGA, A. D. et al. Influência de potássio e calagem na composição química, na qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 953-960, 2010.

VOELKER, T.; KINNEY, A. J. Variations in the Biosynthesis of seed-storage lipids. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto v. 52, n. 1, p. 335-361, 2001.

WANG, J. M. et al. Analysis of differential transcriptional profiling in wheat infected by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using GeneChip. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 381-387, 2012.

WANG, W. Q. et al. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 86, p. 1-15, 2015.

WOJTYLA, L. et al. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germination pea seeds. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 12, p. 1207-1220, 2006.

YEN, C. E. et al. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 49, n. 11, p. 2283-2301, 2008.

ZHANG, M. et al. A mechanism of seed deterioration in relation to volatile compounds evoked by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 49-56, 1994.