



**AILTON GONÇALVES RODRIGUES JUNIOR**

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA  
DORMÊNCIA FÍSICA, TOLERÂNCIA À  
DESSECAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE  
SEMENTES DE *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et  
Barn. (Fabaceae) DURANTE A GERMINAÇÃO**

**LAVRAS – MG  
2013**

**AILTON GONÇALVES RODRIGUES JUNIOR**

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA DORMÊNCIA FÍSICA,  
TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE  
SEMENTES DE *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. (Fabaceae)  
DURANTE A GERMINAÇÃO**

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

Orientador  
Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria

Coorientador  
Prof. Dr. Anderson Cleiton José

**LAVRAS – MG  
2013**

## FICHA CATALOGRAFICA

### Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca da UFLA

Rodrigues Junior, Ailton Gonçalves.

Aspectos morfológicos da dormência física, tolerância à  
dessecação e armazenamento de sementes de *Senna multijuga*  
(Rich.) Irwin et Barn. (Fabaceae) durante a germinação / Ailton  
Gonçalves Rodrigues Junior. – Lavras : UFLA, 2013.

84 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: José Márcio Rocha Faria.

Bibliografia.

1. Lente. 2. Micrópila. 3. Embebição. 4. Longevidade. 5.  
Secagem. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.9562

**AILTON GONÇALVES RODRIGUES JUNIOR**

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA DORMÊNCIA FÍSICA,  
TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE  
SEMENTES DE *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. (Fabaceae)  
DURANTE A GERMINAÇÃO**

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

APROVADA em 22 de fevereiro de 2013

Dr. Anderson Cleiton José – DCF/UFLA  
Dra. Adriana Tiemi Nakamura – DBI/UFLA  
Dr. Renato Mendes Guimarães – DAG/UFLA

Orientador  
Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria

**LAVRAS – MG  
2013**

*Ao meu pai, Ailton Gonçalves, que com seu exemplo de força me ensinou  
a ser forte;*

*À minha mãe, Denilde Meira, por todo o apoio e fundamental confiança;*

*À minha família, pela ajuda em todos os momentos;*

*À Tatiana Arantes, pelo apoio e companheirismo.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sua constante presença e por me proporcionar esta conquista, me possibilitando enxergar cada vez mais longe;

Agradeço ao meu pai, Ailton, por se alegrar a cada conquista minha, sendo um grande estímulo a novas vitórias, pelo apoio e por ser minha fonte de fé.

Agradeço à minha mãe, Denilde, pois sem ela nenhuma destas conquistas teria acontecido, por me apoiar e me dar força a cada dia;

À minha família, principalmente à Bárbara, Joyce, Gracielle e Cátia, irmãs que se completam e me completam, e também aos meus irmãos Rafael e Alex, pelo apoio.

À minha avó, Marilza, também deixo o meu agradecimento especial. E também aos meus queridos sobrinhos, Pedro e João, pela constante alegria.

À Tatiana Arantes, pelo grande apoio e companheirismo em todos os momentos, sendo fundamental nesta vitória. A ela também dedico os méritos desta conquista;

Ao Professor José Marcio Rocha Faria, pela amizade e aprendizado ao longo deste período, e por me ensinar sobre o mundo das sementes;

Aos professores; Anderson Cleiton José e Antonio Claudio Davide, pela amizade e grande contribuição na realização deste trabalho;

Agradeço à Professora, Adriana Tiemi Nakamura, pela disponibilidade e amizade, que muito engrandeceram este trabalho;

Ao professor Renato Mendes Guimarães, por compartilhar o seu grande conhecimento e pela contribuição nesta dissertação;

Ao Wilson Vicente, pela grande ajuda e amizade desde a minha chegada a Lavras;

A Antônio César e Juliana Tuller, amigos de longa data, pelo apoio e amizade;

Aos amigos do Laboratório de Sementes Florestais, Olívia, Janice, Paulo, Túlio, Ezequiel, Lorena, Allan, Cristiane, Raniere, Natália, Rafaela, Pauliana, Michelle, Jessé, Tatiana Portes, Érica, Lorrان, Meire, José Carlos, aos amigos Isaac, Bruna, Samuel, Ricardo, Wesley, e aos amigos do Departamento de Ciências Florestais;

À Universidade Federal de Lavras.

A CAPES ,pela bolsa de estudos.

A todos os amigos que me ajudaram a conquistar este objetivo;

O meu MUITO OBRIGADO!

## RESUMO GERAL

Objetivou-se neste trabalho compreender a superação da dormência física em sementes de *Senna multijuga* e a variação do grau de dormência, visando a identificação dos locais de entrada de água, a influência da embebição em condições de estresse hipóxico na tolerância à dessecação (TD) em sementes, e o comportamento no armazenamento de sementes durante a germinação. Inicialmente as sementes foram submetidas aos tratamentos de superação de dormência e foi avaliado o padrão de embebição das sementes dormentes e não-dormentes, para caracterizar a dormência física. Mudanças morfológicas durante a superação de dormência e germinação foram observadas e a identificação dos locais de entrada de água foi feita selando a região hilar e por meio da absorção de água pelas partes da semente. As características estruturais do tegumento também foram estudadas. Após, foi avaliada a perda da tolerância à dessecação nas sementes em condições de germinação e em estresse hipóxico, por imersão em água, assim como a perda da integridade de membranas celulares durante a embebição. Foi avaliado também o comportamento durante o armazenamento de sementes submetidas à embebição e posterior dessecação. O uso de água a 80 °C foi eficiente na superação da dormência, sendo possível observar a variabilidade do grau de dormência entre as duas procedências. As sementes dormentes não permitem a entrada de água, apresentando padrão trifásico de embebição para as sementes não-dormentes. A absorção de água ocorre primeiramente pela região hilar, com a micrópila e a lente podendo ser os locais de entrada de água. A região extra-hilar do tegumento, como o pleurograma, não possibilita a entrada de água. O tratamento térmico possibilita o estímulo da região da lente, formando uma protuberância. O tegumento da semente apresenta cutícula, macroesclereídes, linha lúcida, células parenquimáticas, osteoesclereídes. As sementes perdem a TD com o avanço da germinação, mas sendo anterior à

protrusão radicular. A embebição em condições de estresse hipóxico possibilita a manutenção da TD por um período mais longo de embebição. Menores danos às membranas celulares são observados com a redução do metabolismo. As sementes submetidas à embebição e dessecação diminuem a longevidade com o armazenamento a temperaturas abaixo de zero. A variabilidade do grau de dormência pode ser influenciada pela heterogeneidade dos lotes bem como pela influência do armazenamento de um lote, devido aos ciclos de sensibilidade à superação da dormência. O estímulo térmico possibilita a absorção de água em sementes de *S. multijuga*, formando uma região de fragilidade na região da lente para a entrada de água, com a micrópila também podendo ser importante. As células parenquimáticas podem exercer importante papel na entrada de água na semente, possibilitando a elevação da lente. Não há entrada de água pelo pleurograma nem por outra região extra-hilar. A estrutura do tegumento caracteriza a dormência física em sementes. A redução do metabolismo prolonga a TD em sementes, evitando maiores danos oxidativos às membranas celulares. A embebição seguida de dessecação faz com que as sementes percam o comportamento ortodoxo durante o armazenamento, diminuindo a viabilidade com o armazenamento a temperaturas abaixo de zero.

**Palavras-chave:** Lente. Micrópila. Embebição. Secagem. Longevidade.



## ABSTRACT

This study aimed to understand the release physical dormancy in *Senna multijuga* seeds and variation of the dormancy degree, intending of the identification of the water gaps, the influence of soaking on germination conditions and on hypoxic stress on the desiccation tolerance (DT) in seeds and seed storage behavior of germinating seeds after desiccation. Initially, seeds were subjected to treatments for release dormancy and evaluated the imbibition of dormant and non-dormant seeds, to characterize the physical dormancy. Morphological changes during dormancy release and germination were observed and the identification of the water gaps was made by sealing the hilar region and the water uptake by seed parts. The structural features of seed coat were also studied. After, the loss of DT of seeds under germination conditions and hypoxic stress was evaluated as well as the loss of cell membranes integrity during soaking. It was also evaluated the storage behavior of germinating seeds after desiccation. The use of water at 80 °C was effective on release seed dormancy, presenting variability in the dormancy degree between the two provenances. The uptake pattern of water in non-dormant seeds is triphasic, while dormant seeds do not uptake water. The imbibition occurs primarily in the hilar region, with the micropyle and lens acting as water gaps in seeds. The extra-hilar region of seed coat, such as the pleurogram, does not permit the entry of water. The heat treatment enables the stimulation of the lens regions, forming a bulge. The seed is albuminous, present cuticle, macrosclereids, light line, parenchyma cells and osteosclereides. The seeds lose DT with advancing of germination, prior to radicle protrusion. The soaking on hypoxic stress conditions enables the maintenance of DT for a longer period of imbibition. Minor damage to cell membranes was observed with reduced metabolism. After imbibition and desiccation, seed longevity decreases with storage at sub-zero temperatures. The

variability in the dormancy degree may be influenced by heterogeneity of the seed lot as well as the storage, which may strengthen dormancy. The thermal stimulus allows the water absorption in *S. multijuga* seeds, forming a weakness region in the lens for water uptake, and the micropyle may also play a role. There was no water uptake on the pleurogram region. The seed coat structure characterizes the physical dormancy in seeds. The parenchyma cells may play an important role in the entry of water into the seed, allowing the lifting of the lens. The imbibition in hypoxic stress conditions prolongs DT in seeds, preventing further damage to cell membranes. The imbibition followed by drying causes loss of DT and vigor in seeds, reducing its viability with storage at sub-zero temperatures.

**Keywords:** Lens. Micropyle. Imbibition. Drying. Longevity.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO GERAL .....                                                                                                                                                                                                 | 11 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                                                      | 15 |
| ARTIGO 1: DORMÊNCIA FÍSICA EM SEMENTES DE <i>Senna multijuga</i><br>(Rich.) Irwin et Barn. (Fabaceae - Caesalpinioideae): MORFOANATOMIA E<br>IDENTIFICAÇÃO DE LOCAIS DE ENTRADA DE ÁGUA .....                          | 21 |
| ARTIGO 2: PERDA DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E<br>COMPORTAMENTO NO ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE <i>Senna</i><br><i>multijuga</i> (Rich.) Irwin et Barn. (Fabaceae - Caesalpinioideae) EM PROCESSO<br>DE GERMINAÇÃO ..... | 54 |

## INTRODUÇÃO GERAL

A dormência em sementes é caracterizada como bloqueio da germinação de sementes viáveis sob condições favoráveis (BEWLEY, 1997). Dentre os diferentes tipos de dormência a mais recorrente entre as espécies vegetais é a dormência física, ocorrendo em 15 famílias de Angiospermas (BASKIN et al., 2000). A dormência física é causada pela impermeabilidade das células paliádicas das sementes ou frutos (BASKIN et al., 2000), sendo bastante representativa na família Fabaceae (ROLSTON, 1978; BASKIN; BASKIN, 1998; BASKIN et al., 2000).

As sementes com dormência física formam estruturas anatômicas especializadas para a absorção inicial de água após superação da dormência, que atuam em resposta a sinais ambientais (BASKIN et al., 2000; BASKIN, 2003). Entre estas estruturas, as lentes são descritas como importantes por exercer este papel nas leguminosas, com o hilo e a micrópila também sendo importantes para a embebição (HANNA, 1984; RANGASWAMY; NANDAKUMAR, 1985; MANNING; VAN STADEN, 1987; SERRATO-VALENTI; VRIES; CORNARA, 1995; BASKIN et al., 2000). No entanto, Morrison et al. (1998) relataram que a compreensão do mecanismo de entrada de água nas sementes com dormência física ainda é complexo.

Diversos métodos são utilizados para superação da dormência física, mas alguns deles podem causar danos à semente, resultando em plântulas malformadas. A imersão em água quente (ALIERO, 2004; JAYASURIYA et al., 2007; JAYASURIYA et al., 2008; JAYASURIYA et al., 2009), escarificação mecânica (ALIERO, 2004; JAYASURIYA et al., 2007; JAYASURIYA et al., 2008; GUMA et al., 2010), escarificação química (CUSHWA; MARTIN; MILLER, 1968; ALIERO, 2004; VARI et al., 2007; GUMA et al., 2010) e a alternância de temperatura (TAYLOR, 1981; VAN ASSCHE; DEBUCQUOY;

ROMMENS, 2003) são os métodos mais comumente empregados. O estímulo térmico dos locais de entrada de água para a absorção de água, ao invés da escarificação do tegumento, pode ser um modo mais eficiente para a formação de plântulas normais, sem danos ao embrião.

A tolerância à dessecação é uma característica apresentada por diversos organismos, como alguns vegetais (ALPERT, 2005; ALPERT, 2006; BEWLEY, 1979). Esta tolerância é caracterizada como a habilidade de recuperar a atividade metabólica normal após a quase total perda de água no protoplasma e posterior reidratação (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000; HOEKSTRA et al., 2001). Esta capacidade permite que plantas e seus propágulos possam resistir a condições ambientais adversas, dando continuidade a seu ciclo de vida (ALPERT, 2000; OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000).

No caso de sementes, elas podem ou não tolerar a dessecação, sendo isso uma característica que pode estar relacionada com o histórico evolutivo devido à seleção natural das espécies de acordo com o ambiente aos quais elas se desenvolveram (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Assim, as sementes são classificadas em três categorias, de acordo com a capacidade de resistir à secagem e ao armazenamento (ROBERTS, 1973; ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990). Sementes que toleram secagem até cerca de 7% de teor de água e o armazenamento prolongado em baixas temperaturas (sub-zero) são classificadas com ortodoxas. Já as que não suportam essa redução do teor de água, perdendo a viabilidade quando a umidade se aproxima de 20%, são classificadas como recalcitrantes, sendo que elas também não suportam o armazenamento por longos períodos, nem a baixas temperaturas (ROBERTS, 1973). Algumas sementes apresentam características intermediárias entre estas duas classes, permitindo a redução do teor de água a níveis abaixo do suportado por sementes recalcitrantes, mas não tão drástico quanto à redução em sementes ortodoxas, permitindo o armazenamento a baixas temperaturas (não suportando

temperaturas abaixo de zero), sendo, então, classificadas como intermediárias (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990; ELLIS; HONG; ROBERTS, 1991).

A tolerância de plantas e sementes ao estresse hídrico é devida a alterações bioquímicas e estruturais, sendo este processo regulado pela expressão de determinados genes que conferem esta característica à planta ou propágulo (INGRAM; BARTELS, 1996; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Esta regulação faz com que mecanismos de tolerância à dessecação sejam ativados, com vários componentes celulares atuando conjuntamente, tanto na manutenção da integridade de membranas e moléculas, como no reparo dos danos celulares causados pela dessecação.

Acredita-se que os açúcares atuam substituindo a água em tecidos submetidos à dessecação, mantendo a conformação de membranas e moléculas durante o estado desidratado. Outra hipótese é de que o aumento da concentração de açúcares permite a formação de um estado vítreo no interior da célula, reduzindo as reações químicas e a formação de agentes deletérios à célula (CROWE; HOEKSTRA; CROWE, 1992; CROWE; CARPENTER; CROWE, 1998; LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993; KOSTER; LEOPOLD, 1988).

As proteínas, principalmente as LEA (*late embryogenesis abundant*), são hidrofílicas e agem sobre estruturas intracelulares e macromoléculas, garantindo a manutenção da integridade durante a dessecação. Outra classe de proteínas importantes durante a secagem são as proteínas de choque térmico (*heat shock*), que aumentam sua concentração nas células durante a dessecação (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001; BERJAK; PAMMENTER, 2008).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal que em sementes atua mantendo-as com o metabolismo predominantemente anabólico, aumentando seus níveis durante a secagem na fase de maturação da semente, ativando os

mecanismos que conferem a capacidade de tolerar a dessecação (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; MEURS et al., 1992). Para tolerar a dessecação, as células devem ter também um eficiente aparato antioxidante, para sustentar a alta concentração de radicais livres nos tecidos e mantê-los tolerantes a dessecação, evitando danos sobre as membranas celulares e consequente perda da integridade (SENARATNA; MCKERSIE; STINSON, 1985; SENARATNA; MCKERSIE; BOROCHOV, 1987; LEPRINCE et al., 1990; LEPRINCE et al., 1994; LEPRINCE et al., 1995; KRANNER; BIRTIC, 2005; BERJAK; PAMMENTER, 2008).

As sementes ortodoxas são tolerantes à dessecação ao final do estágio de maturação e durante o início do processo germinativo. Com o prosseguimento da germinação, elas tornam-se sensíveis à dessecação, comportando-se como sementes recalcitrantes (BUITINK et al., 2003; BRADFORD, 1994; LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993).

O armazenamento afeta a longevidade das sementes, portanto é necessário estabelecer condições adequadas de armazenamento, para que o ritmo de queda da longevidade seja o menor possível. O grau de umidade das sementes bem como a temperatura e a umidade relativa do ar influenciam na manutenção da viabilidade das sementes armazenadas (VERTUCCI; ROOS, 1990; VERTUCCI; ROOS, 1993; PAMMENTER et al., 1994).

A espécie utilizada neste trabalho, para avaliação de aspectos celulares da dormência física, perda da tolerância à dessecação e armazenamento durante o processo germinativo, foi a *Senna multijuga*, uma leguminosa pioneira de ampla ocorrência no país (CARVALHO, 2004; LORENZI, 2000), com altura de 6 a 10 metros (LORENZI, 2000). A frutificação ocorre de agosto a novembro (LORENZI, 2000), com sementes apresentando dormência tegumentar (FOWLER; BIACHETTI, 2000; LACERDA et al., 2004).

Este trabalho visa à compreensão da superação de dormência física e das características que conferem esta dormência em sementes de *Senna multijuga* e a avaliação da perda da tolerância à dessecação e efeito da embebição e dessecação sobre a longevidade de sementes.

## REFERÊNCIAS

- ALIERO, B. L. Effects of sulphuric acid, mechanical scarification and wet heat treatments on germination of seeds of African locust bean tree, *Parkia biglobosa*. **African Journal of Biotechnology**, Boston, v. 3, n. 3, p. 179-181, Mar. 2004.
- ALPERT, P. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 29, n. 9, p. 1575-1584, May 2006.
- ALPERT, P. The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, n. 1, p. 5-17, 2000.
- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p. 685-695, 2005.
- BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 12, n. 2, p.145-164, 1998.
- BASKIN, C. C. Breaking physical dormancy in seeds: focusing on the lens. **New Phytologist**, Cambridge, v. 158, n. 2, p. 229-232, May 2003.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 1998.
- BASKIN, J. M. et al. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. **Plant Species Biology**, London, v. 15, n. 2, p. 139-152, Aug. 2000.
- 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. Physiological aspects of desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 30, p. 195-238, June, 1979.

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

BRADFORD, K. J. Water stress and the water relations of seed development: a critical review. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 15, p. 2-11, 1994.

BUITINK, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 4, p. 273-286, 2003.

CARVALHO, P. E. R. **Pau-cigarra: *senna multijuga***. Colombo: Embrapa Florestas, 2004.

CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 60, p. 73-103, Mar. 1998.

CROWE, J. H.; HOEKSTRA, F. A.; CROWE, L. M. Anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 54, p. 579-599, Mar. 1992.

CUSHWA, C. T.; MARTIN, R. E.; MILLER, R. L. The effects of fire on seed germination. **Journal of Range Management**, Denver, v. 21, n. 4, p. 250-254, 1968.

DELL, B. Structure and function of the strophliolar plug in seeds of *Albizia lophantha*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 67, n. 4, p. 556-563, 1980.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, Sept. 1990.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 653-657, May 1991.

FOWLER, J. A. P.; BIACHETTI, A. **Dormência em sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000.

GAMA-ARACHCHIGE, N. S. et al. Identification and characterization of the water gap in physically dormant seeds of Geraniaceae, with special reference to *Geranium carolinianum*. **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 6, p. 977-990, June 2010.

GUMA, I. R. et al. Evaluation of methods to remove hardseededness in *Cicer canariense*, a perennial wild relative of chickpea. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 38, n. 1, p. 209-213, Apr. 2010.

HANNA, P. J. Anatomical features of the seed coat of *Acacia kempeana* (Mueller) which relate to increased germination rate induced by heat treatment. **New Phytologist**, Cambridge, v. 96, n. 1, p. 23-29, 1984.

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

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v. 47, p. 377-403, 1996.

JAYASURIYA, K. M. G. et al. A proposed mechanism for physical dormancy break in seeds of *Ipomoea lacunosa* (Convolvulaceae). **Annals of Botany**, London, v. 103, n. 3, p. 433-445, Feb. 2009.

JAYASURIYA, K. M. G. et al. Morphology and anatomy of physical dormancy in *Ipomoea lacunosa*: Identification of the water gap in seeds of convolvulaceae (Solanales). **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 1, p. 13-22, May 2007.

JAYASURIYA, K. M. G. et al. Physical dormancy in seeds of the holoparasitic angiosperm *Cuscuta australis* (Convolvulaceae, Cuscutaceae): dormancy-breaking requirements, anatomy of the water gap and sensitivity cycling. **Annals of Botany**, London, v. 102, n. 1, p. 39-48, July 2008.

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

KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A. C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 88, n. 3, p. 829-832, Nov. 1988.

- KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p. 734-740, 2005.
- LACERDA, D. R. et al. Seed-dormancy variation in natural populations of two tropical leguminous tree species: *Senna multijuga* (Caesalpinoideae) and *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae). **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, p. 127-135, 2004.
- LEPRINCE, O. et al. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, n. 2, p. 233-240, June 1995.
- LEPRINCE, O. et al. The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. **Plant Physiology**, Washington, v. 104, n. 1, p. 1333-1339, Jan. 1994.
- LEPRINCE, O. et al. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, n. 4, p. 573-580, 1990.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 4, p. 231-246, Dec. 1993.
- LERSTEN, N. R.; GUNN, C. R.; BRUBAKER, C. L. **Comparative morphology of the lens on legume (Fabaceae) seeds, with emphasis on species in subfamilies Caesalpinoideae and Mimosoideae**. Iowa: Department of Agriculture Technical, 1992.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: um manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil: volume 1**. 3 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000.
- MANNING, J. C.; VAN STADEN, J. The functional differentiation of the testa in seed of *Indigofera parviflora* (Leguminosae: Papilionoideae). **Botanical Gazette**, Chicago, v. 148, n. 1, p. 23-24, Mar. 1987.
- MEURS, C. et al. Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Washington, v. 100, n. 3, p. 1484-1493, Nov. 1992.

MORRISON, D. A. et al. The role of the lens in controlling heat-induced breakdown of testa-imposed dormancy in native Australian legumes. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 1, p. 35-40, 1998.

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

PAMMENTER, N. W. et al. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 187-191, Feb. 1994.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-37, Jan. 1999.

RANGASWAMY, N. S.; NANDAKUMAR, L. Correlative studies on seed coat structure, chemical composition, and impermeability in the legume *Rhynchosia minima*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 146, n. 4, p. 501-509, Dec. 1985.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n. 3, p. 499-514, 1973.

ROLSTON, M. P. Water impermeable seed dormancy. **The Botanical Review**, Austrália, v. 44, n. 33, p. 365-396, 1978.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D.; BOROCHOV, A. Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 38, n. 12, p. 2005-2014, Dec. 1987.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D.; STINSON, R. H. Simulation of dehydration injury to membranes from soybean axes by free radicals. **Plant Physiology**, Washington, v. 78, n. 3, p. 472-474, July 1985.

SERRATO-VALENTI, G.; VRIES, M. de; CORNARA, L. The hilar region in *leucaena leucocephala* lam. (De Wit) seed: structure, histochemistry and the role of the lens in germination. **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 569-574, 1995.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, Washington, v. 115, n. 2, p. 327-334, Oct. 1997.

TAYLOR, G. B. Effect of constant temperature treatments followed by fluctuating temperatures on the softening of hard seeds of *Trifolium subterraneum* L. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 8, n. 6, p. 547-558, 1981.

TURNER, S. R. et al. Identification and characterization of the water gap in the physically dormant seeds of *Dodonaea petiolaris*: a first report for Sapindaceae. **Annals of Botany**, London, v. 104, n. 5, p. 833-844, Oct. 2009.

VAN ASSCHE, J. A.; DEBUCQUOY, K. L. A.; ROMMENS, W. A. F. Seasonal cycles in the germination capacity of buried seeds of some Leguminosae (Fabaceae). **New Phytologist**, Cambridge, v. 158, p. 315-323, 2003.

VARI, A. K. et al. Seed coat imposed dormancy in *Sesbania spp.* and treatments to improve germination. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 35, p. 318-325, 2007.

VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E. Theoretical basis of protocols for seed storage. **Plant Physiology**, Washington, v. 94, n. 3, p. 1019-1023, Nov. 1990.

VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E. Theoretical basis of protocols for seed storage II: the influence of temperature on optimal moisture levels. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 201-213, Sept. 1993.

**ARTIGO 1: DORMÊNCIA FÍSICA EM SEMENTES DE *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. (Fabaceae - Caesalpinioideae): MORFOANATOMIA E IDENTIFICAÇÃO DE LOCAIS DE ENTRADA DE ÁGUA**

**RESUMO**

A dormência física é causada pela impermeabilidade das células paliádicas de sementes ou frutos, sendo bastante representativa na família Fabaceae. Diversos estudos têm abordado a identificação dos locais de entrada de água em sementes com dormência física e os estímulos que possibilitam a superação da dormência física em sementes. Objetivou-se neste trabalho compreender a superação da dormência física em sementes de *Senna multijuga* e a variação do grau de dormência, visando à identificação dos locais de entrada de água. As sementes foram submetidas aos tratamentos de superação de dormência e foi avaliado o padrão de embebição das sementes dormentes e não-dormentes, para caracterizar a dormência física. Mudanças morfológicas durante a superação de dormência e germinação foram observadas e a identificação dos locais de entrada de água foi feita selando a região hilar e pela absorção de água pelas partes da semente. As características estruturais do tegumento também foram estudadas. O uso de água a 80 °C foi eficiente na superação da dormência, observando a variabilidade do grau de dormência entre as duas procedências. As sementes dormentes não permitem a entrada de água, apresentando padrão trifásico de embebição para as sementes não-dormentes. A absorção de água ocorre primeiramente pela região hilar, com a micrópila e a lente sendo locais de entrada de água. A região extra-hilar do tegumento, como o pleurograma, não possibilita a entrada de água. O tratamento térmico possibilita o estímulo da região da lente, formando uma protruberância. A semente é exalbuminosa, com o tegumento apresentando cutícula, macroesclereídes, linha lúcida, células

parenquimáticas e osteoesclereídes. O estímulo térmico possibilita a absorção de água em sementes de *S. multijuga*, formando uma região de fragilidade na região da lente para a entrada de água, com a micrópila também podendo ser importante. Não há entrada de água pela região do pleurograma. A estrutura do tegumento caracteriza a dormência física em sementes. As células parenquimáticas podem exercer importante papel na entrada de água na semente, possibilitando a elevação da lente.

**Palavras-chave:** Leguminosa. Impermeabilidade. Lente. Micrópila. Embebição.

### ABSTRACT

Physical dormancy is caused by water-impermeable palisade cells in seed, being fairly representative in Fabaceae. Several studies addressed the identification of the water gaps in seeds with physical dormancy and the stimuli that allow release it. This study aimed to understand the physical dormancy release in seeds of *Senna multijuga* and variation on the dormancy degree, aiming the identification of the water gaps. Seeds were subjected to treatments of release dormancy and evaluated the imbibition of dormant and non-dormant seeds, to characterize the physical dormancy. Morphological changes during release dormancy and germination were observed and the identification of the water gaps was made by sealing the hilar region and the water uptake by seed parts. The structural features of seed coat were also studied. The use of water at 80 °C was effective on release seed dormancy, presenting variability in the dormancy degree between the two provenances. The uptake pattern of water in non-dormant seeds is triphasic, while dormant seeds do not uptake water. The water uptake occurs primarily in the hilar region, with the micropyle and lens acting as water gaps in seeds. The extra-hilar region of seed coat, such as the pleurogram, does not permit the entry of water. The heat treatment enables the stimulation of the lens regions, forming a bulge. The seed is albuminous, present cuticle, macrosclereids, light line, parenchyma cells and osteosclereides. The thermal stimulus allows the water absorption in *S. multijuga* seeds, forming a weakness region on the lens for water uptake, and the micropyle may also play a role. There is no water uptake for the pleurogram region. The seed coat structure characterizes the physical dormancy in seeds. The parenchyma cells may play an important role in the entry of water into the seed, allowing the lifting of the lens.

**Keywords:** Legume. Water-impermeability. Lens. Micropyle. Imbibition.



## INTRODUÇÃO

A família Fabaceae é uma das mais representativas do reino vegetal, em que a ocorrência de dormência física nas sementes é recorrente, imposta pela impermeabilidade da camada paliçádica do tegumento das sementes ou frutos, que impedem a embebição e, com isso, o início da germinação (ROLSTON, 1978; BASKIN; BASKIN, 1998; BASKIN et al., 2000).

As sementes com dormência física apresentam estruturas anatômicas especializadas para a absorção de água, cuja atuação ocorre em resposta aos sinais ambientais (BASKIN et al., 2000; BASKIN, 2003). Entre estas estruturas as lentes exercem este papel em sementes de leguminosas, além delas, o hilo e a micrópila também são importantes para a embebição (HANNA, 1984; RANGASWAMY; NANDAKUMAR, 1985; MANNING; VAN STADEN, 1987; SERRATO-VALENTI et al., 1995; BASKIN et al., 2000). No entanto, a compreensão do mecanismo de entrada de água nas sementes com dormência física ainda é complexo, podendo a lente não ser o local (ou primeiro local) de entrada de água na semente (ROLSTON, 1978; LERSTEN; GUNN; BRUBAKER, 1992; MORRISON et al., 1998).

Os locais de entrada de água apresentam variações estruturais que diferem na sua forma de atuação durante a entrada de água na semente, como ocorre entre representantes de Fabaceae e também de outras famílias (DELL, 1980; HANNA, 1984; MANNING; VAN STADEN, 1987; LERSTEN; GUNN; BRUBAKER, 1992; BASKIN et al., 2000; JAYASURIYA et al., 2007; JAYASURIYA et al., 2008b; JAYASURIYA et al., 2009b). Estudos com espécies da subfamília Caesalpinoideae ainda são poucos, necessitando de uma maior compreensão da morfologia e da identificação dos locais de entrada de água nas sementes. Estudos deste tipo já foram feitos para espécies de outras famílias, como Convolvulaceae (JAYASURIYA et al., 2007; JAYASURIYA et

al., 2008b; JAYASURIYA et al., 2009b) Sapindaceae (TURNER et al., 2009) e Geraniaceae (GAMA-ARACHCHIGE et al., 2010).

As características das células do envoltório seminal com dormência física, por serem compactos e conterem substâncias hidrofóbicas, evitam a entrada de água na semente (RANGASWAMY; NANDAKUMAR, 1985; MANNING; VAN STADEN, 1987; KELLY; VAN STADEN; BELL, 1992; SERRATO-VALENTI et al., 1994; VENIER; FUNES; GARCÍA, 2012), o que confere fundamental importância aos locais especializados na entrada de água das sementes na superação da dormência em condições naturais.

O pleurograma, ou linha fissura, é uma estrutura especializada das sementes que, como relatado por Gunn (1981), pode atuar como uma válvula higroscópica, semelhante ao hilo, relacionado com a secagem ao final da maturação das sementes. Em algumas espécies pode haver diferença de coloração e textura na região do pleurograma (WERKER, 1997), podendo ter um possível papel durante a entrada de água em sementes.

A dormência física possibilita a manutenção da viabilidade das sementes por longo período, conferindo a capacidade de formarem banco de sementes no solo, persistindo durante condições desfavoráveis para o estabelecimento da plântula (BASKIN; BASKIN, 1998). A superação deste tipo de dormência, em condições naturais, pode ser influenciada pela sazonalidade, devido à variação na temperatura (VAN ASSCHE; DEBUCQUOY; ROMMENS, 2003) e também por distúrbios ambientais, como o fogo (KEELEY; FOTHERINGHAM, 2000). Outros fatores também podem influenciar; tais como o trânsito pelo trato digestivo de animais (BASKIN; BASKIN, 1998) e o efeito mecânico do atrito com partículas do solo, além da decomposição do tegumento por microrganismos (VAN ASSCHE; DEBUCQUOY; ROMMENS, 2003), sendo esta última bastante contestada (ROLSTON, 1978; BASKIN et al., 2000). A flutuação diária da temperatura, como encontrado nas clareiras, também permite

a superação da dormência física, fazendo com que estas espécies sejam importantes na colonização destes ambientes (VÁZQUEZ-YANES; OROZCO-SEGOVIA, 1982).

Em condições artificiais, diferentes métodos são utilizados na superação da dormência física em sementes como a exposição a altas temperaturas, tanto ao calor úmido quanto ao calor seco (CUSHWA; MARTIN; MILLER, 1968; MARTIN et al., 1975; TAYLOR, 1981) e a imersão em água quente (ALIERO, 2004; JAYASURIYA et al., 2007; JAYASURIYA et al., 2008b; JAYASURIYA et al., 2009b), alternância de temperatura (QUINLIVAN, 1966; TAYLOR, 1981; VAN ASSCHE; DEBUCQUOY; ROMMENS, 2003), escarificação mecânica (ALIERO, 2004; JAYASURIYA et al., 2007; JAYASURIYA et al., 2008b; GUMA et al., 2010) e química (CUSHWA; MARTIN; MILLER, 1968; ALIERO, 2004; VARI et al., 2007; GUMA et al., 2010).

A espécie *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn., popularmente conhecida como pau-cigarra, cássia-verrugosa e canafístula, é uma espécie da família Fabaceae de grande ocorrência no Brasil, sendo pioneira, atingindo até 10 metros (LORENZI, 2000; CARVALHO, 2004). A espécie contém sementes oblongas, compridas lateralmente e de coloração verde-musgo a marrom-esverdeada (AMORIM et al., 2008), apresentando dormência física. *S. multijuga* tem uso eficiente em reflorestamentos de áreas degradadas (LORENZI, 2000), com capacidade de formar banco de sementes (FERREIRA; DAVIDE; MOTTA, 2004).

Com isso, os objetivos neste trabalho foram: (1) caracterizar a dormência física nas sementes de *Senna multijuga*; (2) avaliar a eficiência de métodos de superação de dormência na germinação de sementes e a variação do grau de dormência entre sementes de duas procedências; (3) avaliar as mudanças morfológicas durante a superação de dormência e germinação; e (4) elucidar os

mecanismos de restrição à absorção de água além de identificar os locais de entrada de água nas sementes de *S. multijuga*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Coleta das sementes***

As sementes (lote 1) foram coletadas em setembro de 2011 de árvores de *S. multijuga* oriundas do campus da Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras, MG (21°14' S; 45°0' W), a 900 m de altitude, sendo a região caracterizada como de transição entre Mata Atlântica e Cerrado.

Para comparar o grau da dormência do lote de sementes, foi utilizado outro lote de sementes de diferente procedência (lote 2), coletado em setembro de 2009 de árvores separadas por pelo menos 15 km do local de coleta do lote anterior (21°05' S; 45°05' W).

Após a coleta, as sementes foram beneficiadas manualmente, separadas por flutuação em água, secas em sala climatizada (20 °C / 60% UR) e armazenadas em saco plástico semipermeável em câmara fria (5 °C / 40% UR) até o início dos experimentos, após aproximadamente uma semana.

### ***Caracterização dos lotes de sementes***

Para caracterizar os lotes de sementes, foi determinado o conteúdo de água das sementes, utilizando-se quatro repetições de 10 sementes, previamente pesadas e levadas para estufa a 103 °C por 17 horas, e pesadas novamente. Os dados foram expressos em porcentagem de água na base úmida (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 2004). Foi determinado o peso de 1.000 sementes, utilizando-se oito repetições de 100 sementes (BRASIL, 2009). A coloração das sementes também foi observada, para avaliação da homogeneidade dos lotes de sementes.

### ***Superação de dormência e germinação***

As sementes foram submetidas a diferentes métodos de superação de dormência: 1) imersão em água a temperatura ambiente durante 12 horas; 2) imersão em água a temperatura inicial de 80 °C durante 12 horas; 3) imersão em água a temperatura inicial de 100 °C durante 12 horas. Sementes sem superação de dormência foram utilizadas como controle.

Para este experimento foi utilizado sementes dos lotes 1 e 2, para avaliação da variabilidade da dormência na espécie. Para germinação, as sementes foram mantidas em placas de Petri sobre papel umedecido, a 25 °C e luz constante, durante 30 dias.

Foi avaliado o percentual de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962) e percentual de plântulas normais. Foi utilizado fatorial 4 (tratamentos de superação de dormência) x 2 (dois lotes de sementes), com quatro repetições de 25 sementes. O critério para avaliação da germinação foi a protrusão da radícula com comprimento superior a 1 mm.

### ***Curva de embebição***

Para caracterização da absorção de água de sementes dormentes e não-dormentes, 20 sementes foram mantidas sob as mesmas condições de germinação do experimento anterior e pesadas em balança de precisão em vários intervalos até que a raiz primária atingisse 3 mm de comprimento (para as sementes não-dormentes). Antes de cada pesagem a água superficial foi removida das sementes com auxílio de papel absorvente, retornando-as para a embebição após a pesagem. Para superação da dormência, foi empregada a imersão em água a temperatura inicial de 80 °C durante 12 horas, começando as pesagens durante a superação de dormência.

### ***Mudanças morfológicas durante a germinação***

Sementes não-dormentes (imersas em água a 80 °C até atingir temperatura ambiente durante 12 h) mantidas sob as mesmas condições de germinação descritas anteriormente foram avaliadas e fotografadas, com auxílio de um estereomicroscópio, durante todo o processo germinativo. Foram avaliadas as alterações morfológicas desde a semente em estado seco até a protrusão de radícula, utilizando 10 sementes.

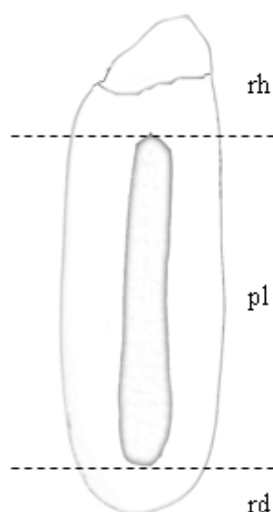
### ***Bloqueio do local de entrada de água***

Sementes foram mantidas em placas de *Petri* com papel umedecido durante três dias a 25 °C para remoção das sementes permeáveis. As sementes dormentes tiveram a região hilar selada (hilo, micrópila e lente), para impedir a absorção de água após a superação da dormência. O bloqueio foi feito com a utilização de adesivo instantâneo Super Bonder<sup>®</sup> (éster de cianocrilato), mantendo-as em condições de laboratório durante 12 horas para secagem da cola, e em seguida foram tratadas com água quente a 80 °C de temperatura inicial, durante 12 horas. Sementes não bloqueadas foram submetidas às mesmas condições, caracterizando assim o tratamento controle.

Após a superação da dormência as sementes foram mantidas durante três dias (tempo em que todas as sementes já embeberam ou germinaram durante os testes de germinação após superação de dormência) sob as mesmas condições de germinação dos experimentos anteriores, para contagem das sementes embebidas. O critério utilizado para identificação das sementes embebidas foi o intumescimento do tegumento e conseqüente mudança na coloração e tamanho, facilmente visualizados. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes.

### *Absorção de água pelas partes da semente*

Sementes foram submetidas à superação de dormência e embebidas, como no experimento anterior, sendo divididas em três partes: região hilar (região que compreende o hilo, micrópila e lente, até o limite do pleurograma), pleurograma (região do tegumento compreendendo todo o pleurograma) e região distal (parte da semente oposta à região hilar, abaixo do pleurograma) e avaliado o conteúdo de água das partes das sementes separadamente (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 2004), utilizando quatro repetições de 20 sementes (Fig. 1). O conteúdo de água das partes da semente foi avaliado durante a embebição até a semente tornar-se totalmente embebida.



**Figura 1.** Semente de *Senna multijuga*. Secções utilizadas para avaliação da absorção de água por partes da semente. (pl = região do pleurograma; rd = região distal; rh = região hilar).

### *Características estruturais do tegumento*

Sementes foram embebidas por 12 horas (pelo mesmo método de superação de dormência anterior) e fixadas em solução de Karnovsky

(KARNOVSKY, 1965) por 24 horas e conservadas em álcool etílico 70%. Para inclusão em hidroxietilmetacrilato Leica<sup>®</sup>, as sementes foram desidratadas em série crescente de álcool etílico, infiltradas e incluídas segundo protocolo do fabricante. O material foi seccionado transversal e longitudinalmente em micrótomo de deslize com cerca de 2-5 µm de espessura, coradas com azul de toluidina 0,05% (O'BRIEN; FEDER; MACCULLY, 1964) e montadas em resina sintética. As sementes foram observadas e documentadas em microscópio óptico Zeiss Axiolab A1 com sistema de captura de imagens.

#### *Análise estatística*

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado para os experimentos. Os dados de germinação, plântulas normais e de embebição das sementes seladas foram avaliados por meio de análise de variância (Anova) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade, sendo as médias convertidas a arco seno  $\sqrt{x/100}$ . Os dados de IVG foram avaliados pela análise de modelos lineares generalizados (GLM) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade. Para as análises foi utilizado o software R for Windows, versão 2.12.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Para os dados da curva de embebição e absorção de água pelas partes da semente foi utilizado análise de regressão, com ajuste do modelo testado a 5% de significância e avaliado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) usando o software SigmaPlot v. 11.0.

## **RESULTADOS**

#### *Caracterização dos lotes de sementes*

O lote 1 apresentou o conteúdo de água de 8,4% e peso de 11,22 g para 1.000 sementes. O lote 2 apresentou conteúdo de água de 9,9% e o peso de 10,6



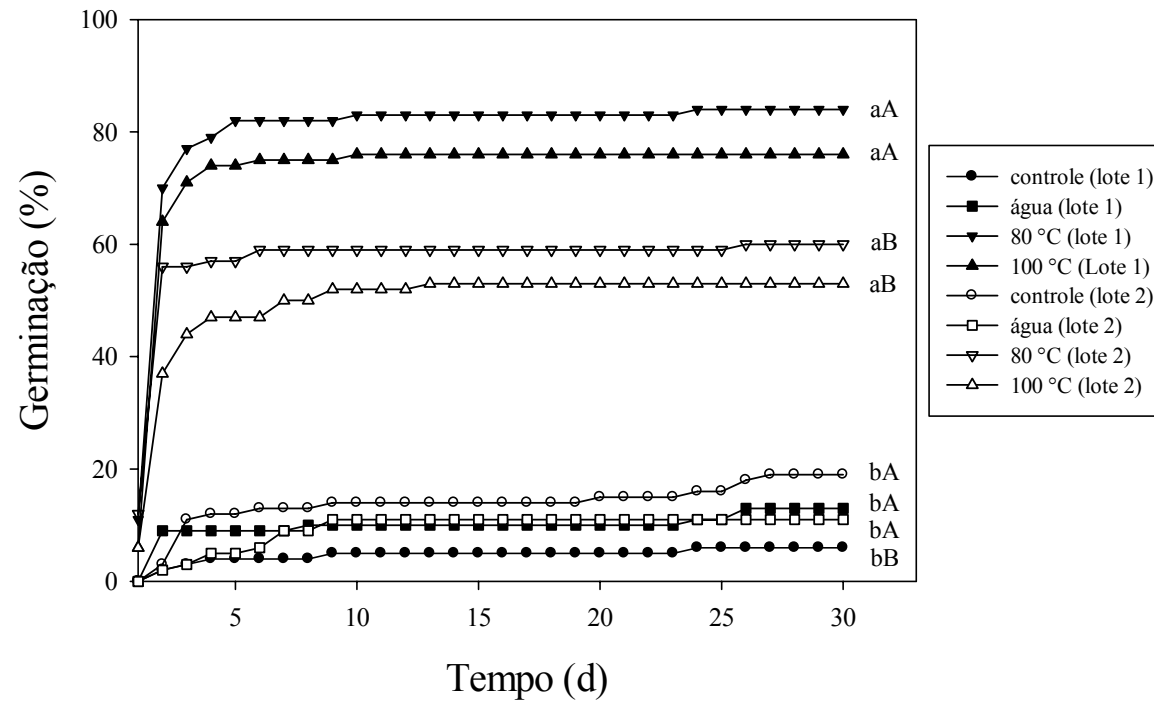
g para 1.000 sementes. As sementes do lote 1 apresentaram coloração marrom-esverdeada, o que indica que se encontram em estágio maduro e o lote homogêneo. O lote 2 apresentou sementes com coloração mais esverdeada, sendo uniforme para todo este lote.

#### ***Superação de dormência e germinação***

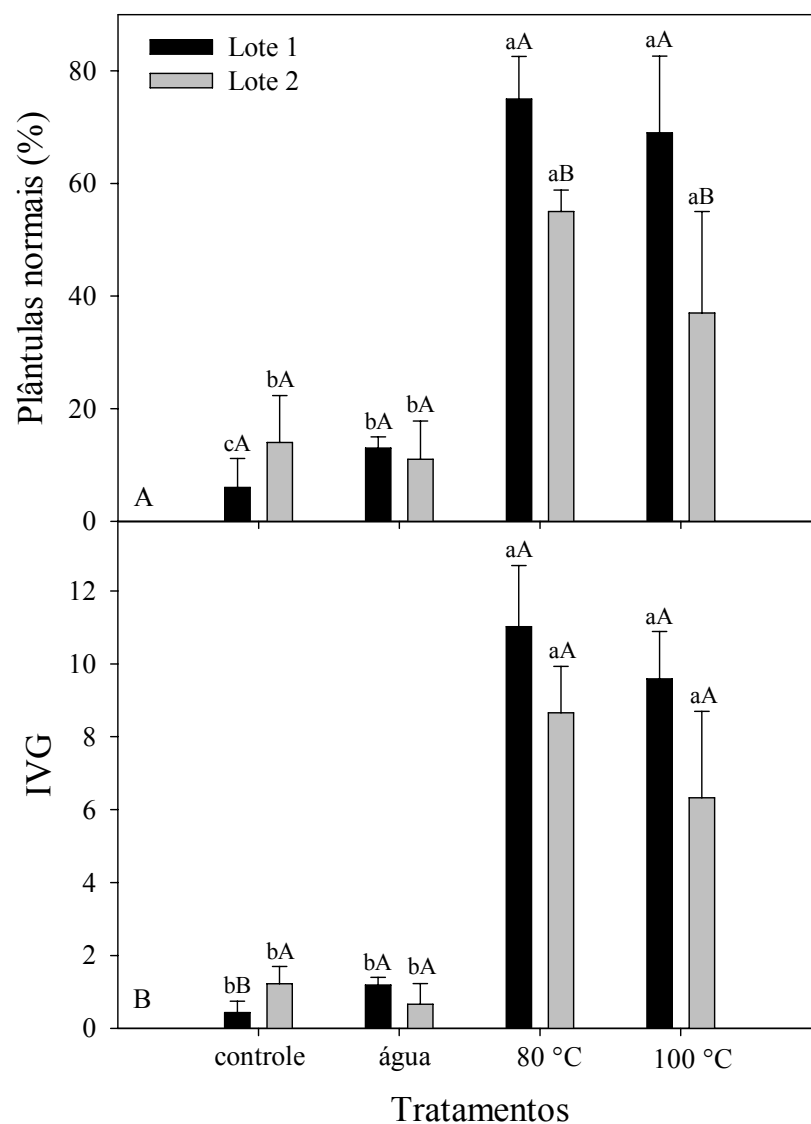
A utilização de água com temperatura inicial de 80 °C e 100 °C mostraram ser eficientes na superação de dormência em sementes de *S. multijuga*, sendo muito superior à imersão em água a temperatura ambiente e ao tratamento controle (Fig. 2). Comparando a germinação entre os dois lotes, observa-se que houve menor percentual de germinação nas sementes do lote 2. Neste lote nenhum tratamento foi superior em comparação ao lote 1, havendo maior germinação apenas no tratamento controle. A germinação ocorreu, em sua maioria, até o quinto dia de avaliação, estabilizando após este período, e ocorrendo germinação esporádica nos tratamentos menos eficientes (Fig. 2).

Em relação às sementes que permaneceram duras após o período de avaliação, para o lote 1 houve os percentuais de 90, 85, 10 e 2% para o controle, imersão em água a temperatura ambiente, imersão em água a 80 °C e a 100 °C, respectivamente. Para o lote 2, 69, 79, 14 e 7% das sementes permaneceram duras, para o controle, imersão em água a temperatura ambiente, imersão em água a 80 °C e a 100 °C, respectivamente (dados não apresentados).

Avaliando a formação de plântulas normais, os resultados seguiram o mesmo padrão, com os maiores percentuais sendo obtidos nos tratamentos de imersão em água a 80 °C e a 100 °C do lote 1 (Fig. 3A).



**Figura 2.** Influência de métodos de superação de dormência na germinação de sementes de dois lotes de *Senna multijuga*. Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças significativas dentro dos lotes, e letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças significativas entre os lotes, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

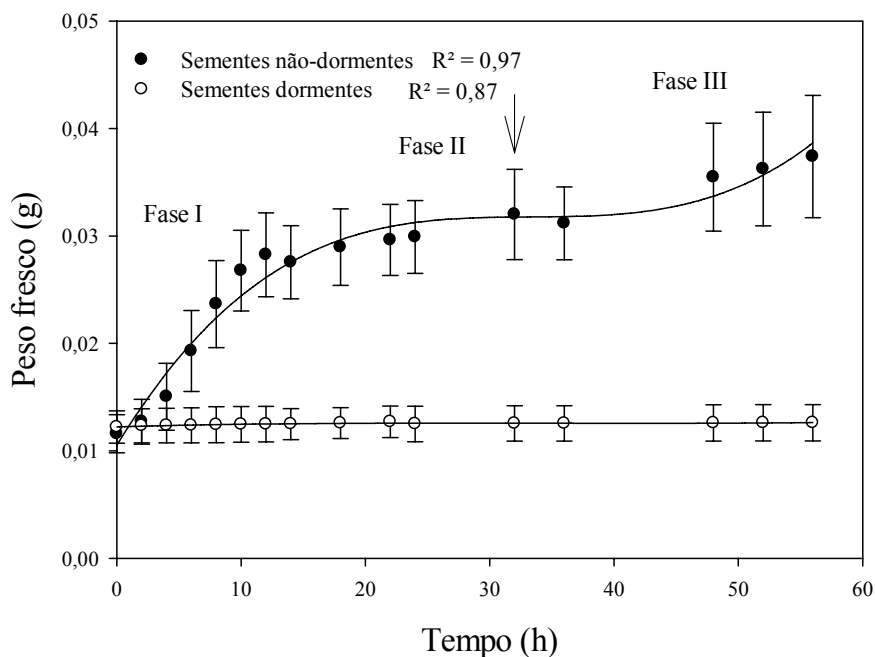


**Figura 3.** Influência de métodos de superação de dormência de sementes sobre a porcentagem de plântulas normais (A) e índice de velocidade de germinação (IVG) (B) em dois lotes de *Senna multijuga*. (média  $\pm$  desvio padrão). Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças significativas dentro dos lotes, e letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças significativas entre os lotes, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O mesmo resultado foi obtido para o IVG, com os tratamentos de imersão em água a 80 e 100 °C sendo estatisticamente superiores. Entre os lotes, não houve diferença estatística entre cada tratamento, diferente do tratamento controle que se mostrou superior para o lote 2 (Fig. 3B).

### ***Curva de embebição***

Nas sementes dormentes a restrição à absorção de água imposta pelo tegumento impediu o aumento do peso fresco, mantendo aproximadamente o mesmo peso durante todo o período de avaliação. A embebição das sementes não-dormentes apresentou padrão trifásico, com um rápido aumento da absorção de água até aproximadamente 12 horas de embebição, caracterizando a fase I da embebição. Após este período houve uma estabilização do aumento da massa fresca da semente, representando a fase II da embebição, até cerca de 32 horas de embebição. O início da fase III ocorreu após este período, novamente com outro rápido aumento da absorção de água pela semente. Esta fase é iniciada com a protrusão da radícula, sinalizando o término da germinação (Fig. 4).



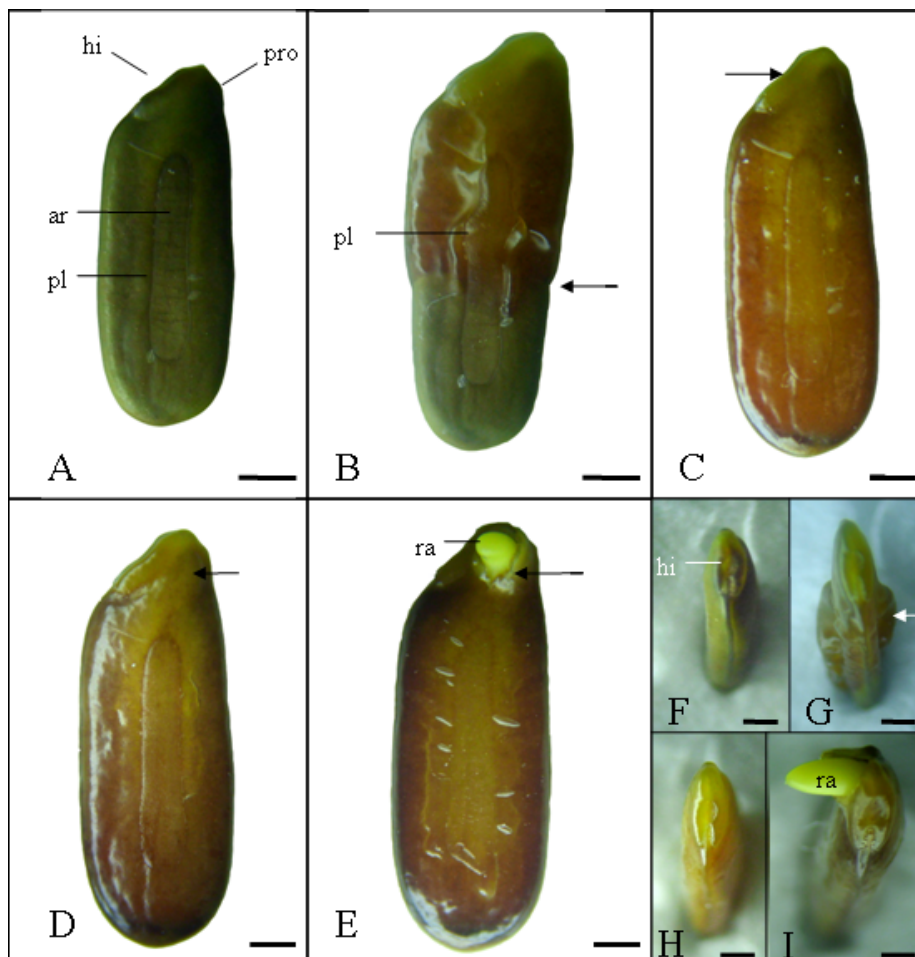
**Figura 4.** Absorção de água em sementes dormentes e não-dormentes de *Senna multijuga* (média  $\pm$  desvio padrão). A seta indica o tempo em que 50% das sementes germinaram.

#### *Mudanças morfológicas durante a germinação*

A semente seca apresenta-se com tegumento rígido, coloração marrom-esverdeada e opaca (Fig. 5A, F). Com três horas de embebição, as sementes apresentam modificação na coloração tornando-se marrom-alaranjadas, sendo associado com o intumescimento das sementes, devido à superação da dormência. Durante este período, metade da semente teve característica de semente embebida e a outra metade com característica de semente seca, demonstrando que a embebição não ocorre em todo o tegumento, mas em local específico. Ocorreu também deformação do pleurograma durante este período de embebição (Fig. 5B, G). A entrada de água ocorre próxima a região do hilo e da protuberância existente no tegumento, próximo a protrusão da radícula (Fig. 5B,

C, D). Após 12 h de embebição, as sementes mostraram-se totalmente embebidas, pela coloração uniforme, com aumento da massa fresca da semente, devido à absorção de água e conseqüente expansão da semente, permanecendo assim até a protrusão da radícula (Fig. 5C, D e H). A protrusão da radícula ocorreu após cerca de 48 h de embebição, com o rompimento na região da protuberância, próxima a região hilar (Fig. 5E, I).

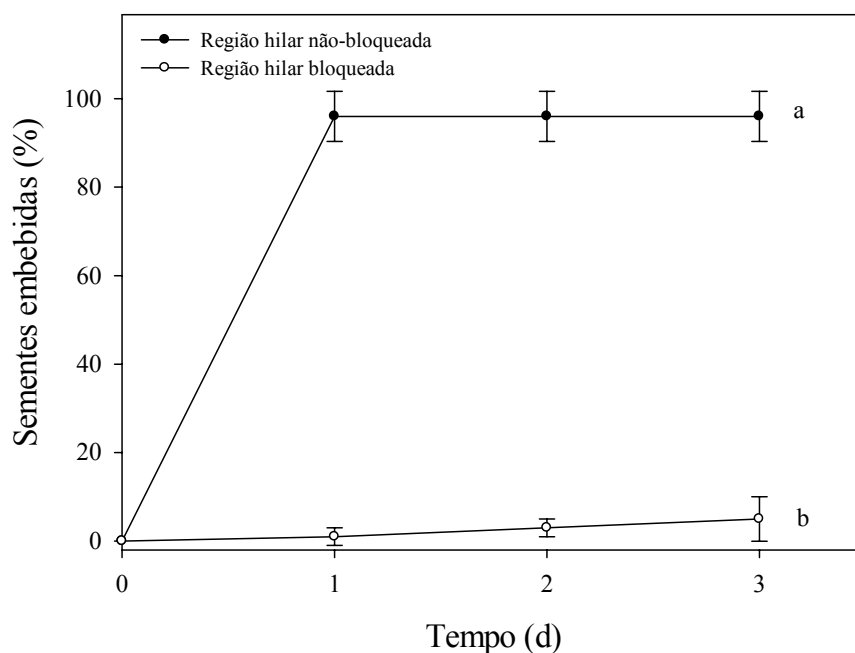
A região hilar apresenta coloração diferente à do restante do tegumento quando a semente está embebida (Fig. 5C), podendo isto representar a característica diferencial entre os tecidos destas estruturas, em relação à entrada de água para a germinação da semente de *S. multijuga*.



**Figura 5.** Mudanças morfológicas das sementes de *Senna multijuga* durante a germinação. Semente seca (A), semente embebida por três horas, com a seta indicando o limite do intumescimento da semente (B), semente embebida por 12 horas, com a seta indicando a região hilar, com tonalidade diferente a do tegumento (C), semente embebida por 24 horas, com a seta indicando a região da protuberância (D), semente germinada, com a seta indicando o rompimento da região da protuberância (E), região hilar da semente seca (F), região hilar da semente embebida por três horas, com a seta indicando o intumescimento parcial da semente (G), região hilar da semente totalmente embebida (H) e protrusão radicular com o rompimento da região da protuberância (I). (ar = aréola; hi = hilo; pl = pleurograma; pro = protuberância; ra = radícula). Barra = 1mm.

### ***Bloqueio do local de entrada de água***

O bloqueio da região hilar impediu a embebição das sementes. Comparando as sementes bloqueadas com as sementes não-bloqueadas fica claro o papel desta região na absorção de água pelas sementes de *S. multijuga* (Fig. 6).



**Figura 6.** Porcentagem de sementes de *Senna multijuga* que embeberam (média  $\pm$  d.p.) com ou sem bloqueio da região hilar durante três dias a 25 °C, após tratamento de superação de dormência.

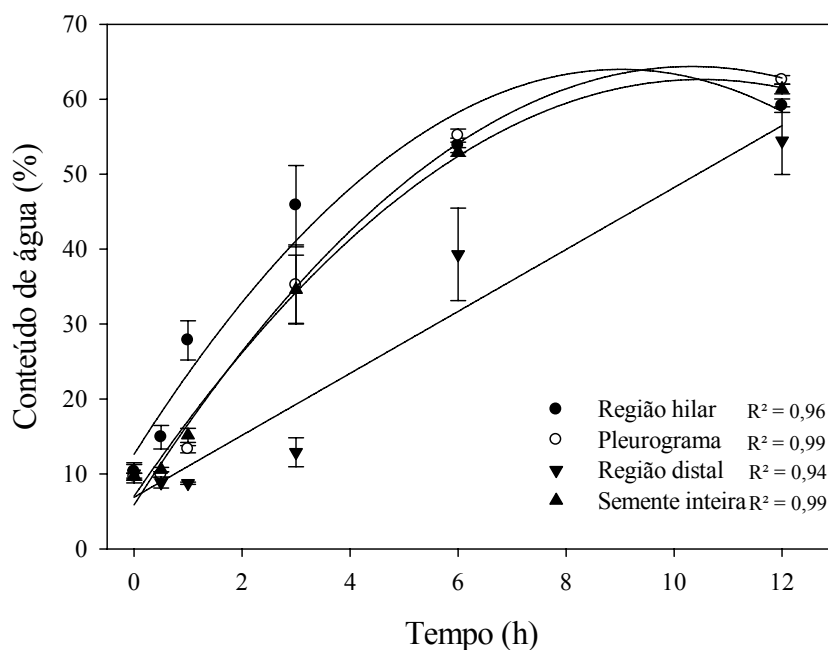
O percentual de sementes bloqueadas que embeberam não ultrapassou 5% após três dias em condições de germinação, diferindo das sementes não bloqueadas que atingiram 96% de sementes embebidas logo após um dia nesta condição (Fig. 6). A ocorrência de embebição em algumas sementes com a região hilar selada (5%) foi devido à ineficiência do método de vedação, e não devido à entrada de água por outras partes do tegumento, pois este percentual de



embebição foi o mesmo encontrado para sementes totalmente seladas (dados não apresentados).

#### ***Absorção de água pelas partes da semente***

Após a superação da dormência física nas sementes a entrada de água ocorre primeiramente pela região hilar, como visto pelo rápido aumento do conteúdo de água nesta região e a manutenção do conteúdo de água nas outras partes da semente (Fig. 7). Após 30 minutos de embebição houve um aumento do conteúdo de água na região hilar (aproximadamente 15% de umidade), enquanto que nas outras regiões o conteúdo de água manteve-se o mesmo das sementes secas (aprox. 10%). Após uma hora de embebição a região hilar aumentou o conteúdo de água para cerca de 28%, com a água começando a atingir a região do pleurograma (13,3% de umidade), não havendo alteração no conteúdo de água na região distal (aprox. 9% de umidade). Após 3 horas de embebição, a região hilar e do pleurograma atingiram conteúdo de água superior a 35%, começando a haver um início da entrada de água na região distal (aprox. 13% de umidade). Após 6 horas de embebição, toda a semente estava embebida, apresentando 54%, 55% e 39% de conteúdo de água na região hilar, pleurograma e distal, respectivamente, aproximando este percentual entre todas as partes após 12 horas de embebição (Fig. 7). A mudança no conteúdo de água nas partes da semente correspondeu às alterações morfológicas observadas na figura 5.



**Figura 7.** Absorção de água pelas partes da semente de *Senna multijuga* após superação da dormência física. (média  $\pm$  desvio padrão).

O conteúdo de água da semente inteira manteve-se próximo ao do pleurograma, pois esta região compõe a maior parte da semente. A semente inteira apresentou conteúdo de água de 9,8; 10,6; 15,1; 34,6; 53 e 61,4% durante os períodos seqüenciais de embebição (Fig. 7).

#### ***Características estruturais do tegumento***

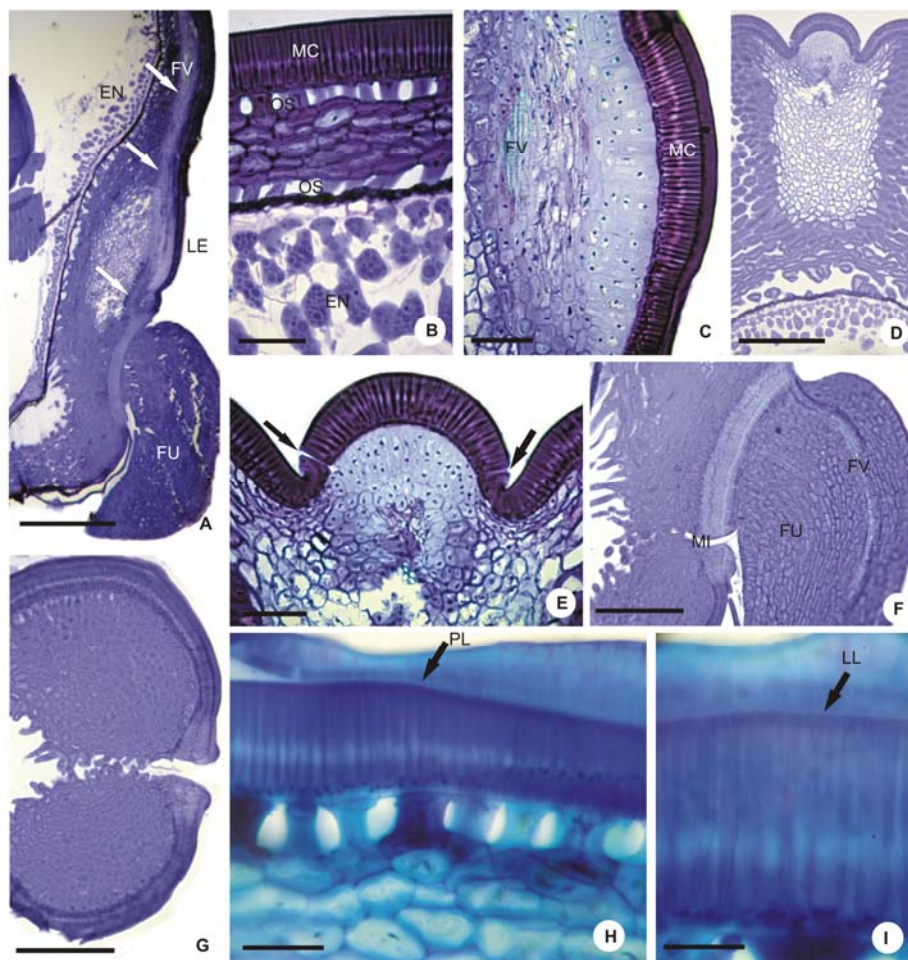
A semente de *S. multijuga* é testal e exibe micrópila, funículo e lente numa posição linear, apresentando vestígio de endosperma (Fig. 8A). No geral, o tegumento seminal apresenta uma camada de macroesclereídes com cutícula espessa (exotesta), mesotesta composta por inúmeras camadas de células de parênquima com paredes espessadas limitadas externa e internamente por uma

camada de osteoesclereídes e mais internamente, exibe a endotesta, com uma camada de células comprimidas juntamente com restos de tégmen (Fig. 8B). Na região da mesotesta, observa-se um único feixe vascular que irriga toda a região da rafe e antirafe (Fig. 8A).

A lente aparece como uma protuberância, logo acima do hilo (Fig. 8A, C, D, E). Em secção longitudinal, destaca-se logo abaixo das macroesclereídes um grupo de células de parênquima com espessamento de parede e formato irregular, logo abaixo, o feixe vascular evidente. Em secção transversal, observa-se que na região da lente, o tegumento é espesso e ocorrem além do grupo de células de parênquima com parede espessada e do feixe vascular, células de parênquima típicas, de paredes finas e conteúdo hialino. A lente mostrou-se formando um opérculo após superação da dormência, com duas regiões de fragilidade, sendo constituídas por macroesclereídes mais achatadas (Fig. 8D e E). Foi observado, durante a embebição, que esse opérculo é empurrado por um tecido gelatinoso, delimitando uma abertura no tegumento seminal.

Além da ruptura na região da lente, as sementes não-dormentes também apresentaram abertura na região da micrúpila, região onde o envoltório seminal é descontínuo (Fig. 8F e G). Nesta região, em corte transversal, observa-se um alongamento radial das macroesclereídes, com células da mesotesta de formato papilosas delimitando a abertura que liga a região externa aos tecidos internos (Fig. 8G).

O hilo, cicatriz deixada no tegumento paralelamente à região de inserção do funículo (Fig. 8A, F), é uma região pontual e restrita no tegumento seminal. Anatomicamente, apresenta as macroesclereídes e parênquima com paredes espessadas.



**Figura 8.** Secções transversais (B, D, G-I) e longitudinais (A, C, F) na semente de *Senna multijuga*. Tegumento exibindo funículo, lente e feixe vascular evidente, setas (A). Detalhes do tegumento e endosperma (B). Detalhe da região da lente. Setas em E indicam a região de fragilidade da camada de macroesclereídes, onde ocorre ruptura no tegumento (C-E). Semente mostrando posição da micrópila e funículo (F). Detalhe da região micropilar, evidenciando abertura que percorre todo o tegumento (G). Tegumento na região do pleurograma, mostrando diferença na altura da linha lúcida das macroesclereídes (H). Detalhe da linha lúcida, seta (I). (EN = endosperma; FU = funículo; FV = feixe vascular; LE = lente; LL = linha lúcida; MC = macroesclereídes; MI = micrópila; OS = osteoesclereídes; PA = parênquima; PL = pleurograma). Barras = 500  $\mu\text{m}$  (A), 200  $\mu\text{m}$  (F, G), 100  $\mu\text{m}$  (D), 50  $\mu\text{m}$  (B, C, E), 40  $\mu\text{m}$  (H), 20  $\mu\text{m}$  (I).

A região do pleurograma apresenta estrutura semelhante do restante do tegumento, com macroesclereídes compactas e osteoesclereídes, sendo esta região evidenciada pelo deslocamento da linha lúcida presente nas macroesclereídes (Fig. 8H, I). A figura 8I mostra detalhadamente a linha lúcida presente nas macroesclereídes da semente de *S. multijuga*.

## DISCUSSÃO

Diversos métodos têm sido utilizados para superação de dormência física em sementes, dentre eles o emprego de água quente pode ser eficiente para algumas espécies, como *Acacia melanoxylon* (BURROWS; VIRGONA; HEADY, 2009), *Parkia biglobosa* (ALIERO, 2004), *Cuscuta australis* (JAYASURIYA et al., 2008b) e *Ipomoea lacunosa* (JAYASURIYA et al., 2007; JAYASURIYA et al., 2009b). De acordo com Taylor (1981), altas temperaturas podem atuar no enfraquecimento da região das lentes, tornando possível a embebição de água pelas sementes, mas a exposição a altas temperaturas pode levar a danos às sementes de algumas espécies, podendo aumentar a taxa de mortalidade e plântulas anormais, como relatado por Vari et al. (2007) para *Sesbania spp.* A temperatura foi um fator fundamental para a superação da dormência nas sementes de *S. multijuga*, já que a imersão das sementes em água a temperatura ambiente possibilitou baixos percentuais de germinação, diferente da imersão em água a 80 e 100 °C, não ocasionando danos às sementes ou plântulas, como visto na figura 2 e 3A.

A menor germinação das sementes do lote 2 submetidas à imersão em água a 80 e 100 °C pode ser devido à heterogeneidade dos lotes, pois testes de germinação mostraram que as sementes desta espécie suportam o armazenamento em períodos superiores ao do lote avaliado (dados não publicados). Isto pode ser explicado pela variação do nível de dormência

existente entre indivíduos, populações e pelo ano de coleta (BECKSTEAD; MEYER; ALLEN, 1996; ANDERSSON; MILBERG, 1998). Lacerda et al. (2004) relataram que há grande influência genética na dormência das sementes de *Senna multijuga*, ocorrendo alta variabilidade tanto dentro quanto entre populações. Esta variabilidade em conjunto com fatores ambientais pode ter influência sobre a qualidade das sementes, diferenciando no nível de dormência entre os lotes. Esta heterogeneidade pode ser vista quando se compara a coloração do tegumento dos dois lotes, com as sementes do lote 1 apresentando coloração marrom-esverdeada, e as sementes do lote 2 coloração mais esverdeada. Esta característica pode indicar diferenças nas condições necessárias para superação de dormência das sementes, como observado por Hu, Wu e Wang (2009b).

Em sementes com dormência física pode haver ciclos de sensibilidade para a superação da dormência, em que as sementes podem se tornar permeáveis com maior facilidade (JAYASURIYA et al., 2008a; JAYASURIYA et al., 2009a). O armazenamento a baixas temperaturas pode diminuir a sensibilidade das sementes, necessitando de maiores estímulos para a superação de dormência (JAYASURIYA et al., 2008a; JAYASURIYA et al., 2009a), podendo isto também explicar a menor germinação das sementes do lote armazenado (lote 2).

A embebição de água pelas sementes de *S. multijuga*, após superação da dormência, ocorre de acordo com o descrito por Bewley (1997), apresentando um padrão trifásico. Para as sementes de *S. multijuga* fica claro a ocorrência destas fases, como facilmente notado na figura 4. A dormência física imposta pelo tegumento é identificada devido a não embebição das sementes sem superação de dormência, já que este tipo de dormência é caracterizado pela impermeabilidade das sementes ou frutos (BASKIN et al., 2000; BASKIN; BASKIN, 2004).

A superação da dormência das sementes de *S. multijuga* com a imersão em água quente (temperatura inicial de 80 °C) permite observar que a absorção de água ocorre pela região hilar, possibilitando o entumescimento das sementes, devido ao estímulo de estruturas anatômicas especializadas do tegumento, como a lente e a micrópila, que permitem a entrada de água, como relatado por Baskin et al. (2000). A protuberância existente nas sementes secas torna-se mais evidente pela embebição das sementes, evidenciando a expansão do eixo embrionário pela absorção de água.

Os componentes que conferem a dormência física em sementes são estruturais e químicos (KELLY; VAN STADEN; BELL, 1992), e presentes na camada paliádica (BASKIN et al., 2000), sendo esta dormência bastante recorrente em espécies da família Fabaceae (ROLSTON, 1978; BASKIN; BASKIN, 1998; BASKIN et al., 2000). Nesta família, há diferenças anatômicas na camada paliádica da região das lentes em comparação com o restante do tegumento (DELL, 1980; HANNA, 1984; SERRATO-VALENTI; VRIES; CORNARA, 1995), evidenciando a importância desta região para a entrada de água nas sementes com dormência física. Diferenças estruturais nestas regiões foram observadas em sementes de *S. multijuga*, apresentando nas lentes regiões de fragilidade, formando locais para a entrada de água, assim como na micrópila. A diminuição do tamanho das macroesclereídes próximas à região da lente foi reportada por Serrato-Valenti, Vries e Cornara (1995), possibilitando uma maior sensibilidade para o rompimento nesta região, o que foi visto nas regiões de fragilidade da lente em sementes de *S. multijuga*. No restante do tegumento as células apresentaram estrutura compacta, impossibilitando a entrada de água por outros locais que não sejam a micrópila e a lente. A linha lúcida presente na estrutura da testa das sementes com dormência física é composta por substâncias hidrofóbicas, com presença de calose (SERRATO-VALENTI et al., 1994; SERRATO-VALENTI; VRIES; CORNARA, 1995),

podendo também exercer função na impermeabilização das sementes de *S. multijuga*, já que está presente em todo o tegumento.

As células parenquimáticas presentes abaixo da região da lente, com coloração mais clara, podem ter importante papel na elevação da região da lente e conseqüente fragilidade. Serrato-Valenti, Vries e Cornara, (1995) observaram a ocorrência de células com presença de substâncias hidrofóbicas abaixo da região da lente em sementes de *Leucaena leucocephala*, que podem influenciar na entrada de água pela região da lente. Estas células também apresentaram coloração diferencial, sendo chamada por estes autores de células brancas (*white cells*). A ausência destas células parenquimáticas na região extra-hilar demonstra a importância destas células na absorção de água pela semente, já que há entrada de água pela lente, região de ocorrência destas células. A presença das lentes pode ser utilizada como um indicativo de dormência física em sementes, já que foram somente encontradas em sementes que apresentavam este tipo de dormência (VENIER; FUNES; GARCÍA, 2012).

Mesmo com a presença de feixe vascular no tegumento da semente, aparentemente não contendo células colapsadas, a semente mantém restrição a entrada de água, devido à presença das células paliçádicas compactadas. Este feixe vascular entra na semente pelo funículo passando abaixo da lente, na direção oposta à micrópila, como também relatado para sementes da leguminosa *Albizia lophantha* (DELL, 1980). Kikuchi et al. (2006) além de identificar a entrada de água somente pela região das lentes em sementes de *Phaseolus vulgaris* 'Rajma' e *Vigna angularis*, verificaram a distribuição da água pelos tecidos da semente durante a embebição, iniciando pela lente, passando por toda a testa até atingir a radícula e posteriormente os cotilédones. Esta distribuição da água por toda a testa, anterior a regiões mais internas da semente, pode ser facilitada pela presença de vascularização no tegumento, o que pode ocorrer em *S. multijuga*, devido à presença do feixe vascular contornando todo tegumento.



O pleurograma das sementes de *S. multijuga* mesmo aparentando perda da conformação durante a embebição não possibilita a entrada de água, apresentando a mesma estrutura anatômica do restante do tegumento. Esta região pode ter papel importante durante a secagem de maturação nas sementes, como relatado por Gunn (1981), mas, aparentemente, não apresenta função relacionada à entrada de água na germinação em sementes de *S. multijuga*.

Hu et al. (2009a) relataram que há dificuldade na compreensão dos locais responsáveis pela absorção de água nas sementes, principalmente na identificação do locais em que primeiramente ocorre esta embebição. Estes autores relataram que em *Sesbania sesban* as lentes são responsáveis pela absorção inicial de água nas sementes, diferente da espécie *Vigna oblongifolia* em que a região do hilo exerce esta função. No entanto, as sementes podem responder diferentemente aos tipos de tratamentos de superação de dormência, possibilitando ou não a entrada de água por diferentes locais (HU et al., 2009a).

Em sementes de *S. multijuga*, que apresentam apenas dormência física, tanto a lente quanto a micrópila apresentam locais para a entrada de água, evidenciando a importância destes dois locais para a germinação da semente, devido à impermeabilidade causada pelo tegumento. O emprego de métodos de superação de dormência física em sementes que permitam o estímulo dos locais de entrada de água, como o uso de água quente (entre 80 e 100 °C) em *S. multijuga*, evitam danos físicos ao embrião e controlam a taxa de entrada de água, prevenindo danos aos tecidos internos e levando à formação de uma plântula saudável, podendo aumentar a eficiência na produção de mudas. O papel das células parenquimáticas, na elevação da região da lente e, conseqüente entrada de água, serve de estímulo para posteriores pesquisas buscando a compreensão da sua atuação na superação da dormência física.

## REFERÊNCIAS

- ALIERO, B. L. Effects of sulphuric acid, mechanical scarification and wet heat treatments on germination of seeds of African locust bean tree, *Parkia biglobosa*. **African Journal of Biotechnology**, Boston, v. 3, n. 3, p. 179-181, Mar. 2004.
- AMORIM, I. L. et al. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e mudas de *Senna multijuga* var. *lindleyana* (Gardner) H. S. Irwin & Barneby: leguminosae caesalpinioideae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 3, p.507-516, jul./set. 2008.
- ANDERSSON, L.; MILBERG, P. Variation in seed dormancy among mother plants, populations and years of seed collection. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 1, p. 29-38, Jan. 1998.
- BASKIN, C. C. Breaking physical dormancy in seeds: focusing on the lens. **New Phytologist**, Cambridge, v. 158, n. 2, p. 229-232, May 2003.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 1998.
- BASKIN, J. M. et al. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. **Plant Species Biology**, London, v. 15, n. 2, p. 139-152, Aug. 2000.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 1, p. 1-16, Mar. 2004.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. Evolutionary considerations of claims for physical dormancy-break by microbial action and abrasion by soil particles. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, n. 4, p. 409-413, Dec. 2000.
- BECKSTEAD, J.; MEYER, S. E.; ALLEN, P. S. *Bromus tectorum* seed germination: between-population and between-year variation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, n. 6, p. 875-882, June 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.
- BURROWS, G. E.; VIRGONA, J. M.; HEADY, R. D. Effect of boiling water, seed coat structure and provenance on the germination of *Acacia melanoxylon* seeds. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 57, n. 2, p. 139-147, 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Pau-cigarra: *senna multijuga***. Colombo: Embrapa Florestas, 2004.

CUSHWA, C. T.; MARTIN, R. E.; MILLER, R. L. The effects of fire on seed germination. **Journal of Range Management**, Denver, v. 21, n. 4, p. 250-254, 1968.

DELL, B. Structure and function of the strophliolar plug in seeds of *Albizia lophantha*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 67, n. 4, p. 556-563, 1980.

FERREIRA, R. A.; DAVIDE, A. C.; MOTTA, M. S. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. e *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn., num banco de sementes em solo de viveiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 24-31, jan./abr. 2004.

GAMA-ARACHCHIGE, N. S. et al. Identification and characterization of the water gap in physically dormant seeds of Geraniaceae, with special reference to *Geranium carolinianum*. **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 6, p. 977-990, June 2010.

GUMA, I. R. et al. Evaluation of methods to remove hardseededness in *Cicer canariense*, a perennial wild relative of chickpea. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 38, n. 1, p. 209-213, Apr. 2010.

GUNN, C. R. Seeds of leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advances in legume systematic**. Richmond: Fisheries and Food, 1981. pt. 2, p. 913-925.

HANNA, P. J. Anatomical features of the seed coat of *Acacia kempeana* (Mueller) which relate to increased germination rate induced by heat treatment. **New Phytologist**, Cambridge, v. 96, n. 1, p. 23-29, 1984.

HU, X. W. et al. Role of the lens in controlling water uptake in seeds of two Fabaceae (Papilionoideae) species treated with sulphuric acid and hot water. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 19, n. 2, p. 73-80, June 2009a.

HU, X. W.; WU, Y. P.; WANG, Y. R. Different requirements for physical dormancy release in two populations of *Sophora alopecuroides* relation to burial depth. **Ecological Research**, Tsukuba, v. 24, n. 5, p. 1051-1056, 2009b.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **International rules for seed testing**. Switzerland: ISTA, 2004.

JAYASURIYA, K. M. G. et al. A proposed mechanism for physical dormancy break in seeds of *Ipomoea lacunosa* (Convolvulaceae). **Annals of Botany**, London, v. 103, n. 3p. 433-445, Feb. 2009b.

JAYASURIYA, K. M. G. et al. Morphology and anatomy of physical dormancy in *Ipomoea lacunosa*: Identification of the water gap in seeds of convolvulaceae (Solanales). **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 1, p. 13-22, May 2007.

JAYASURIYA, K. M. G. et al. Physical dormancy in seeds of the holoparasitic angiosperm *Cuscuta australis* (Convolvulaceae, Cuscutaceae): dormancy-breaking requirements, anatomy of the water gap and sensitivity cycling. **Annals of Botany**, London, v. 102, n. 1, p. 39-48, July 2008.

JAYASURIYA, K. M. G. G.; BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. Cycling of sensitivity to physical dormancy-break in seeds of *Ipomoea lacunosa* (Convolvulaceae) and ecological significance. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 1, p. 341-352, May 2008a.

JAYASURIYA, K. M. G. G.; BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. Sensitivity cycling and its ecological role in seeds with physical dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 19, n. 1, p. 3-13, 2009a.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

KEELEY, J. E.; FOTHERINGHAM, C. J. Role of fire in regeneration from seed. In: FENNER, M. **Seeds: the ecology of regeneration in plant communities**. 2. ed. Oxon: CAB International, 2000. p. 311-330.

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

KIKUCHI, K. et al. Water uptake by dry beans observed by micro-magnetic resonance imaging. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 3, p. 545-553, Sept. 2006.

LACERDA, D. R. et al. Seed-dormancy variation in natural populations of two tropical leguminous tree species: *Senna multijuga* (Caesalpinoideae) and *Plathymentia reticulata* (Mimosoideae). **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, p. 127-135, 2004.

LERSTEN, N. R.; GUNN, C. R.; BRUBAKER, C. L. **Comparative morphology of the lens on legume (Fabaceae) seeds, with emphasis on species in subfamilies Caesalpinoideae and Mimosoideae**. Iowa: Department of Agriculture Technical, 1992.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MANNING, J. C.; VAN STADEN, J. The functional differentiation of the testa in seed of *Indigofera parviflora* (Leguminosae: Papilionoideae). **Botanical Gazette**, Chicago, v. 148, n. 1, p.23-24, Mar. 1987.

MARTIN, R. E.; MILLER, R. L.; CUSHWA, C. T. Germination response of legume seeds subjected to moist and dry heat. **Ecology**, Durham, v. 56, n. 6, p. 1441-1445, June 1975.

MORRISON, D. A. et al. The role of the lens in controlling heat-induced breakdown of testa-imposed dormancy in native Australian legumes. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 1, p. 35-40, 1998.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MACCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, New York, v. 59, p. 368-373, July 1964.

QUINLIVAN, B. J. The relationship between temperature fluctuations and the softening of hard seeds of some legume species. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 17, n. 5, p. 625-631, 1966.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

RANGASWAMY, N. S.; NANDAKUMAR, L. Correlative studies on seed coat structure, chemical composition, and impermeability in the legume *Rhynchosia minima*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 146, n. 4, p. 501-509, Dec. 1985.

ROLSTON, M. P. Water impermeable seed dormancy. **The Botanical Review**, Austrália, v. 44, n. 33, p. 365-396, 1978.

SERRATO-VALENTI, G. et al. Testa structure and histochemistry related to water uptake in *Leucaena leucocephala* Lam. (De Wit). **Annals of Botany**, London, v. 73, n. 5, p. 531-537, May 1994.

SERRATO-VALENTI, G.; VRIES, M. de; CORNARA, L. The hilar region in *leucaena leucocephala* lam. (De Wit) seed: structure, histochemistry and the role of the lens in germination. **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 569-574, 1995.

TAYLOR, G. B. Effect of constant temperature treatments followed by fluctuating temperatures on the softening of hard seeds of *Trifolium subterraneum* L. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 8, n. 6, p. 547-558, 1981.

TURNER, S. R. et al. Identification and characterization of the water gap in the physically dormant seeds of *Dodonaea petiolaris*: a first report for Sapindaceae. **Annals of Botany**, London, v. 104, n. 5, p. 833-844, Oct. 2009.

VAN ASSCHE, J. A.; DEBUCQUOY, K. L. A.; ROMMENS, W. A. F. Seasonal cycles in the germination capacity of buried seeds of some Leguminosae (Fabaceae). **New Phytologist**, Cambridge, v. 158, p. 315-323, 2003.

VARI, A. K. et al. Seed coat imposed dormancy in *Sesbania spp.* and treatments to improve germination. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 35, p. 318-325, 2007.

VÁZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Seed germination of a tropical rain forest pioneer tree (*Heliocarpus donnell-smithii*) in response to diurnal fluctuation of temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 56, n. 3, p. 295-298, Nov. 1982.

VENIER, P.; FUNES, G.; GARCÍA, C. C. Physical dormancy and histological features of seeds of five *Acacia* species (Fabaceae) from xerophytic forests in central Argentina. **Flora**, London, v. 207, p. 39-46, 2012.

WERKER, E. **Seed anatomy**. Berlin: Borntraeger, 1997.

**ARTIGO 2: PERDA DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E COMPORTAMENTO NO ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. (Fabaceae - Caesalpinioideae) EM PROCESSO DE GERMINAÇÃO**

**RESUMO**

Tolerância à dessecação (TD) é a capacidade de recuperar a atividade metabólica normal com a reidratação após a quase total perda de água no protoplasma, sendo uma característica apresentada por sementes. As sementes que apresentam TD e armazenabilidade por longos períodos são classificadas com ortodoxas, existindo também as que não apresentam esta capacidade (recalcitrantes) e outras com características intermediárias. Objetivou-se neste trabalho compreender a influência da embebição em condições de germinação e em estresse hipóxico na perda da TD em sementes de *Senna multijuga* e o comportamento no armazenamento de sementes submetidas à embebição e dessecação. Foi avaliada a perda da tolerância à dessecação nas sementes em condições de germinação e em estresse hipóxico, por imersão em água, assim como a perda da integridade de membranas celulares durante a embebição. Foi avaliado também o comportamento durante o armazenamento de sementes submetidas à embebição e posterior dessecação. As sementes perdem a TD com o avanço da germinação, mas sendo anterior à protrusão radicular. A embebição em condições de estresse hipóxico possibilita a manutenção da TD por um período mais longo de embebição. Menores danos às membranas celulares são observados com a redução do metabolismo. As sementes submetidas à embebição e dessecação diminuem a longevidade com o armazenamento a temperaturas abaixo de zero. A embebição em condições de estresse hipóxico prolonga a TD em sementes, evitando maiores danos às membranas celulares. A

embebição seguida de dessecação faz com que as sementes percam o comportamento ortodoxo e vigor durante o armazenamento, diminuindo a viabilidade com o armazenamento a temperaturas abaixo de zero.

**Palavras-chave:** Embebição. Hipoxia. Secagem. Longevidade.



### ABSTRACT

Desiccation tolerance (DT) is the ability to regain normal metabolic activity with rehydration after almost total loss of water in the protoplasm, being a characteristic displayed by seeds. Seeds which exhibit DT and long term storability are classified with orthodox, also existing those do not have this ability (recalcitrant) and others with intermediate characteristics. This work aimed to understand the influence of soaking in germination conditions and hypoxic stress on the loss of DT in *Senna multijuga* seeds and seed storage behavior of germinating orthodox seeds after desiccation. It was evaluated the loss of DT of seed in germination conditions and on hypoxic stress, by immersion in water, as well as the loss of cell membranes integrity during soaking. It was also evaluated the storage behavior of germinating seeds after desiccation. The seeds lose DT with the advancing of germination, but occurs prior to radicle protrusion. The soaking on hypoxic stress conditions enables the maintenance of DT for a longer period of imbibition. Minor damage to cell membranes was observed with reduced metabolism. Seeds after imbibition and desiccation decreased longevity with storage at sub-zero temperatures. The imbibition in hypoxic stress conditions prolongs DT in seeds, preventing further damage to cell membranes. The imbibition followed by drying causes loss of orthodox behavior and vigor in seeds, reducing the viability with storage at sub-zero temperatures.

**Key-words:** Imbibition. Hypoxia. Drying. Longevity.

## INTRODUÇÃO

A tolerância à dessecação é definida como a habilidade de recuperar a atividade metabólica normal com a reidratação após a quase total perda de água no protoplasma (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001), sendo uma característica apresentada por algumas plantas e seus propágulos (ALPERT, 2005; ALPERT, 2006; BEWLEY, 1979). Esta capacidade permite que as sementes possam resistir a condições ambientais adversas, dando continuidade ao ciclo de vida da planta (ALPERT, 2000; OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000).

As sementes podem tolerar ou não a dessecação e o armazenamento, sendo classificadas em três grupos. Sementes que toleram secagem até cerca de 7% de teor de água e o armazenamento prolongado em baixas temperaturas (sub-zero) são classificadas com ortodoxas. Já as que não suportam essa redução do teor de água, perdendo a viabilidade quando a umidade se aproxima de 20%, são classificadas como recalcitrantes, sendo que elas também não suportam o armazenamento por longos períodos, nem a baixas temperaturas (ROBERTS, 1973). Algumas sementes apresentam características intermediárias entre estas duas classes, permitindo a redução do teor de água a níveis abaixo do suportado por sementes recalcitrantes, mas não tão drástico quanto a redução em sementes ortodoxas, permitindo o armazenamento a baixas temperaturas (não suportando temperaturas abaixo de zero), sendo, então, classificadas como intermediárias (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990; ELLIS; HONG; ROBERTS, 1991).

A tolerância à dessecação é adquirida ao final do desenvolvimento da semente, em sementes ortodoxas, ao mesmo tempo em que há uma rápida diminuição do conteúdo de água (DASGUPTA; BEWLEY; YEUNG, 1982; BRADFORD, 1994; BUITINK et al., 2003). Esta tolerância diminui ao longo da germinação, aumentando a sensibilidade das sementes à dessecação com o

decorrer do processo germinativo (DASGUPTA; BEWLEY; YEUNG, 1982; SENARATNA; MCKERSIE, 1983; BUITINK et al., 2003; FARIA et al., 2005).

Condições que limitam a atividade metabólica em sementes podem reduzir os danos causados pela dessecação (LEPRINCE et al., 1995), sendo que, o estado metabólico dos tecidos vegetais influencia as reações destrutivas geradas por radicais livres, que ocasionam danos cumulativos sobre as membranas (LEPRINCE et al., 1990b, LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993; LEPRINCE et al., 1994; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001). A diminuição da disponibilidade de oxigênio, componente essencial para a germinação, reduz a atividade metabólica dos tecidos vegetais (GEIGENBERGER, 2003), podendo então estender a capacidade das células de tolerar a dessecação ao longo da embebição, já que não há protrusão radicular, situação em que há sensibilidade à dessecação em sementes.

Vários estudos têm sido realizados para compreender o que faz as sementes se comportarem diferentemente quanto à dessecação. A conclusão é que não é apenas um componente das sementes que confere a elas a capacidade de tolerar a dessecação, mas sim um conjunto de características, havendo uma dependência entre estes componentes (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001; PAMMENTER; BERJAK, 1999). Entre eles, foi observada a influência de açúcares, do ácido absísico (ABA), proteínas, lipídios e de sistemas antioxidantes, atuando em cooperação na manutenção da integridade de membranas e moléculas e no reparo dos danos celulares causados pela dessecação (SENARATNA; MCKERSIE; STINSON, 1985; KOSTER; LEOPOLD, 1988; LEPRINCE et al.; LEPRINCE, 1990a; LEPRINCE, 1990b, LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993; BLACKMAN et al., 1991; BLACKMAN; OBENDORF; LEOPOLD, 1992; MEURS et al., 1992; PAMMENTER; BERJAK, 1999; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

A longevidade das sementes varia de acordo com a espécie, sendo afetada pelas condições de armazenamento. O conteúdo de água das sementes, a temperatura e a umidade do ar durante o armazenamento são os principais fatores que afetam a viabilidade das sementes (VERTUCCI; ROOS, 1990; VERTUCCI; ROOS, 1993; PAMMENTER et al., 1994). Com o início da germinação a semente retoma suas atividades metabólicas visando à protrusão radicular e posterior formação da plântula (BEWLEY, 1997), com isso, o retorno ao estado seco pode mudar a resposta destas sementes ao armazenamento. Mudanças de comportamento durante o armazenamento já foram relatadas para sementes ortodoxas submetidas à embebição e posterior dessecação, perdendo a característica ortodoxa ao longo do armazenamento (HONG; ELLIS, 1992).

Com isso, os objetivos neste trabalho foram: avaliar (1) a perda da tolerância à dessecação em sementes de *S. multijuga* durante o processo de germinação e em estresse hipóxico por imersão em água; (2) os danos sobre as membranas celulares pela dessecação após estas duas condições de embebição; e (3) compreender o efeito da embebição e dessecação das sementes sobre o comportamento durante o armazenamento.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Coleta das sementes***

As sementes foram coletadas em setembro de 2011 de árvores de *S. multijuga* oriundas do campus da Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras, MG (21°14' S; 45°0' W), a 900m de altitude, sendo a região caracterizada como de transição entre Mata Atlântica e Cerrado.

Após a coleta, as sementes foram beneficiadas manualmente, separadas por flutuação em água, secas em sala de secagem a 20 °C e armazenadas em

saco plástico semipermeável em câmara fria (5 °C/ 40% U.R.) até realização dos experimentos.

#### ***Caracterização do lote de sementes***

Para caracterizar o lote de sementes foi determinado o conteúdo de água das sementes, utilizando quatro repetições de 10 sementes, que foram pesadas previamente e levadas para estufa a 103 °C por 17 horas, sendo pesadas novamente. Os dados foram expressos em porcentagem de água na base úmida (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 2004). Foi determinado o peso de 1000 sementes deste lote, utilizando oito repetições de 100 sementes (BRASIL, 2009). A coloração das sementes deste lote também foi observada, para avaliação da homogeneidade do lote de sementes.

#### ***Curva de embebição***

Para caracterização da absorção de água, 20 sementes foram mantidas sob condições de germinação (25 °C, luz constante e em rolo de papel) e pesadas em balança de precisão durante vários intervalos em um período de 56 horas. As pesagens foram realizadas até que a raiz primária atingisse 3 mm de comprimento. Antes de cada pesagem a água superficial foi removida das sementes com auxílio de papel absorvente, retornando-as para a embebição após a pesagem. Para superação da dormência, as sementes foram imersas em água a 80 °C de temperatura inicial até o equilíbrio com o ambiente, durante 12 horas.

#### ***Perda da tolerância à dessecação durante a embebição***

Sementes foram submetidas à superação de dormência em água a 80 °C de temperatura inicial até o equilíbrio com o ambiente, durante 12 horas, e após foram colocadas em rolo de papel umedecido, a 25 °C e luz constante (condições de germinação) ou mantidas imersas em água para avaliar o comportamento das

sementes em estresse hipóxico. Para esta embebição as sementes foram imersas em 30 ml de água a 25 °C, com substituição da água ocorrendo diariamente. Após diferentes tempos de embebição as sementes foram submetidas à secagem (sílica gel), sendo mantidas em caixas plásticas do tipo gerbox sobre um telado, com uma camada de sílica gel ativada abaixo para manter a umidade relativa do ambiente próximo a 8%, sendo vedadas com filme plástico. Foi realizado o teste de umidade para verificação do conteúdo de água das sementes (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 2004), e após retornarem ao conteúdo de água inicial, foram mantidas por mais três dias nas mesmas condições de secagem, baseado na metodologia de Buitink et al. (2003).

Após este período, as sementes foram submetidas à pré-embebição em atmosfera saturada de água durante 24 horas, e à germinação em rolo de papel umedecido a 25 °C e luz constante. Foram avaliados a germinação (protrusão radicular), formação de plântulas normais e anormais e índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962) durante nove dias. O critério para avaliação da germinação foi a protrusão da radícula com comprimento superior a 1 mm, sendo a formação de plântulas normais utilizada para avaliação da tolerância à dessecação.

#### ***Perda da integridade de membranas celulares durante a embebição***

As sementes foram submetidas às mesmas condições de embebição e secagem do experimento anterior, sendo selecionados os tempos de embebição em que houve diminuição na formação de plântulas normais pra avaliação da integridade de membranas pela lixiviação de eletrólitos. O tratamento controle pra este experimento, para critérios de comparação, foi a embebição das sementes por 4 horas (tempo em que se nota visualmente a superação da dormência física nas sementes com a imersão em água a 80 °C de temperatura inicial), seguido de secagem. Após embebição e secagem, as sementes foram

pesadas e colocadas em 50 ml de água deionizada por 24 horas a 25 °C no escuro, para mensurar a condutividade elétrica inicial ( $C_i$ ) em condutivímetro (Digimed, DM 31). Após determinação da  $C_i$  as sementes foram removidas da água deionizada e mantidas em estufa a 103 °C por três horas para desestruturação das membranas, retornando à embebição em água deionizada por 24 horas para mensurar a condutividade total ( $C_t$ ). Foi avaliado também o percentual de lixiviação de eletrólitos sendo expresso como  $(C_i/C_t) \times 100$ . Foram utilizadas quatro repetições de 10 sementes em cada tratamento.

#### ***Armazenamento após embebição e dessecação***

As sementes foram submetidas ao mesmo tratamento de superação de dormência dos experimentos anteriores, e após embebição por 12 e 22 horas foram submetidas à secagem (sílica gel) até retornarem ao conteúdo de água inicial, permanecendo nesta condição por mais três dias. Após a superação de dormência as sementes foram embebidas em rolo de papel a 25 °C e luz constante. Sementes secas (sem superação de dormência) foram utilizadas como tratamento controle. Para o armazenamento, as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos selados e mantidas em escuro sob três diferentes temperaturas: 5 °C, -18 °C e a 20 °C, sendo avaliado ao longo de 240 dias.

Após o armazenamento, as sementes foram submetidas à pré-embebição e em seguida à germinação, em rolo de papel umedecido a 25 °C e luz constante. Para este experimento, foi utilizado um esquema fatorial 3 (condições das sementes) x 5 (tempo de armazenamento), com quatro repetições de 25 sementes. Foi avaliada a germinação (protrusão radicular), formação de plântulas normais e IVG (MAGUIRE, 1962) durante nove dias.

### ***Análise estatística***

Para os dados da curva de embebição, perda da tolerância à dessecação e perda da integridade de membranas foi utilizada análise de regressão, com ajuste do modelo testado a 5% de significância e avaliado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) usando o software SigmaPlot v. 11.0. Os dados do armazenamento foram avaliados pela análise de modelos lineares generalizados (GLM) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade. Para estas análises foi utilizado o software R for Windows, versão 2.12.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

## **RESULTADOS**

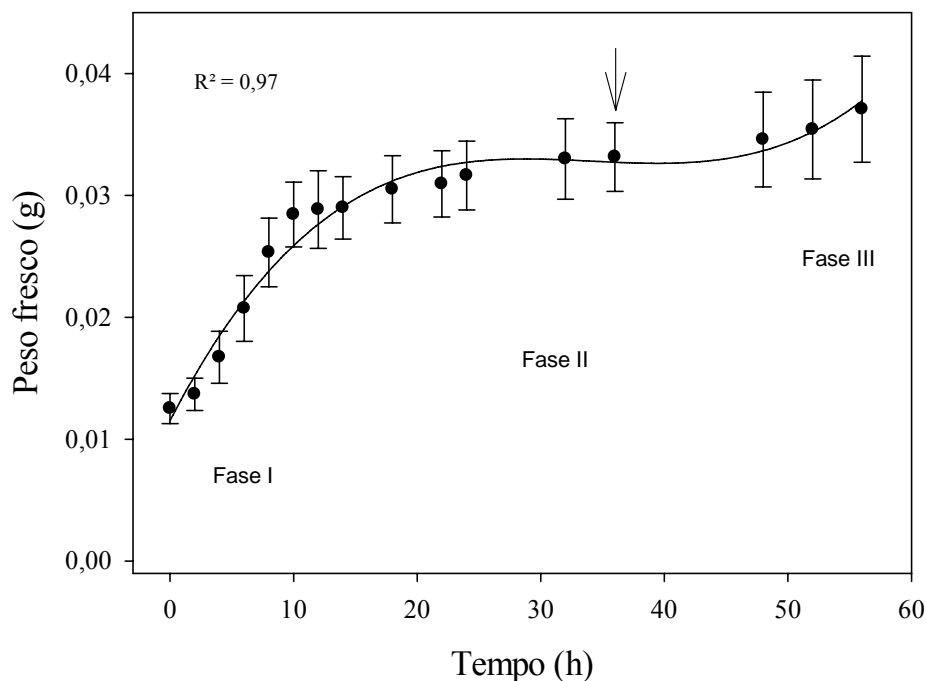
### ***Caracterização do lote de sementes***

O lote de sementes apresentou o conteúdo de água de 8,4% e o peso de 1000 sementes foi de 11,22 g. Todas as sementes do lote apresentaram coloração marrom-esverdeada, evidenciando a homogeneidade do lote.

### ***Curva de embebição***

A absorção de água das sementes apresentou um padrão trifásico, com o rápido aumento do peso fresco das sementes se estendendo até cerca de 18 horas, caracterizando a fase I da embebição. A partir deste período ocorreu uma manutenção do peso fresco das sementes (fase II), havendo uma estabilização na absorção de água até cerca de 36 horas de embebição. Após este período, com o início da protrusão radicular, ocorreu novamente outro aumento do peso fresco das sementes, caracterizando assim a fase III da embebição (Fig. 1). O início da germinação ocorreu após cerca de 32 horas de embebição, obtendo-se 50% de germinação após cerca de 36 horas.





**Figura 1.** Absorção de água em sementes não-dormentes de *Senna multijuga* (média  $\pm$  desvio padrão). A seta indica o tempo em que 50% das sementes germinaram.

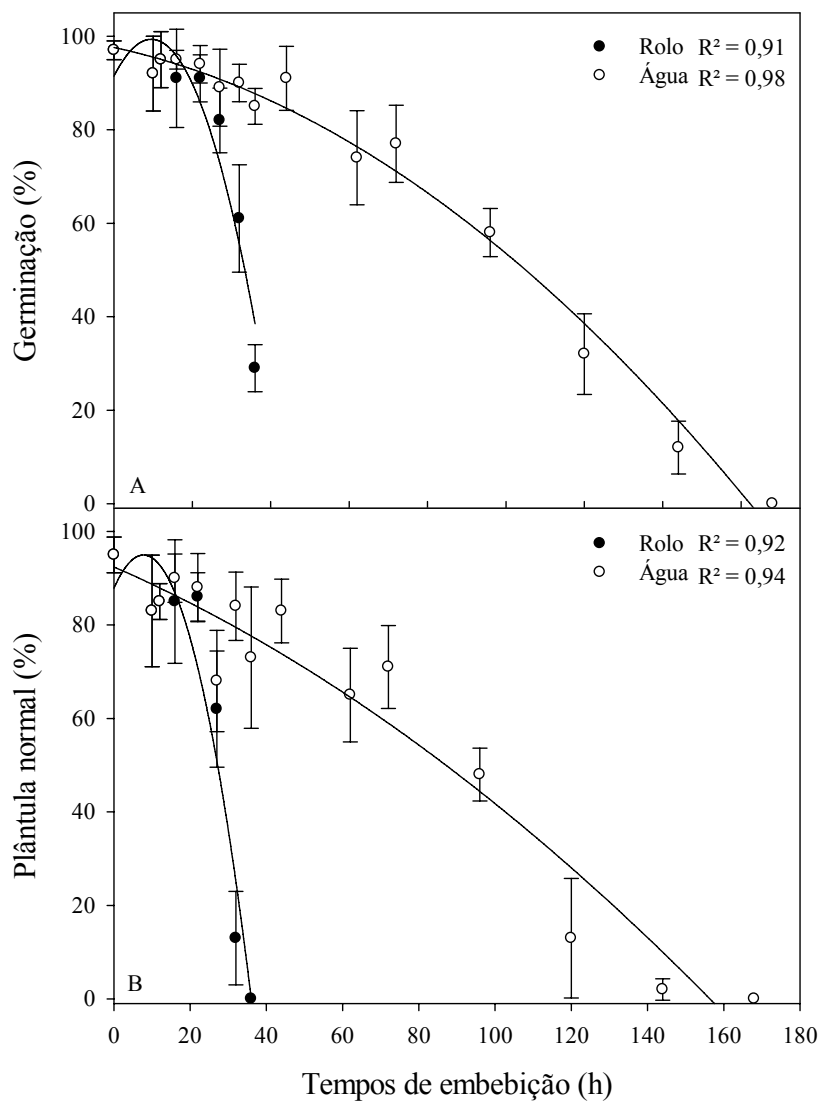
#### ***Perda da tolerância à dessecação***

A germinação (protrusão radicular) das sementes em rolo de papel se manteve alta durante quase todo o período de avaliação, apresentando maior queda após 32 horas de embebição (Fig. 2A). Em relação à formação de plântula normal, critério utilizado para avaliação da perda da tolerância à dessecação, a tolerância foi mantida até 22 horas de embebição, com percentual de 86%. Após este período, houve uma diminuição na formação de plântulas normais, reduzindo para 62% após 27 horas de embebição. Uma queda ainda maior ocorreu após 32 horas de embebição, atingindo 13% de plântulas normais, e não havendo mais formação de plântulas normais após 36 horas de embebição (Fig. 2B). A perda da tolerância à dessecação foi caracterizada pelo alto percentual de

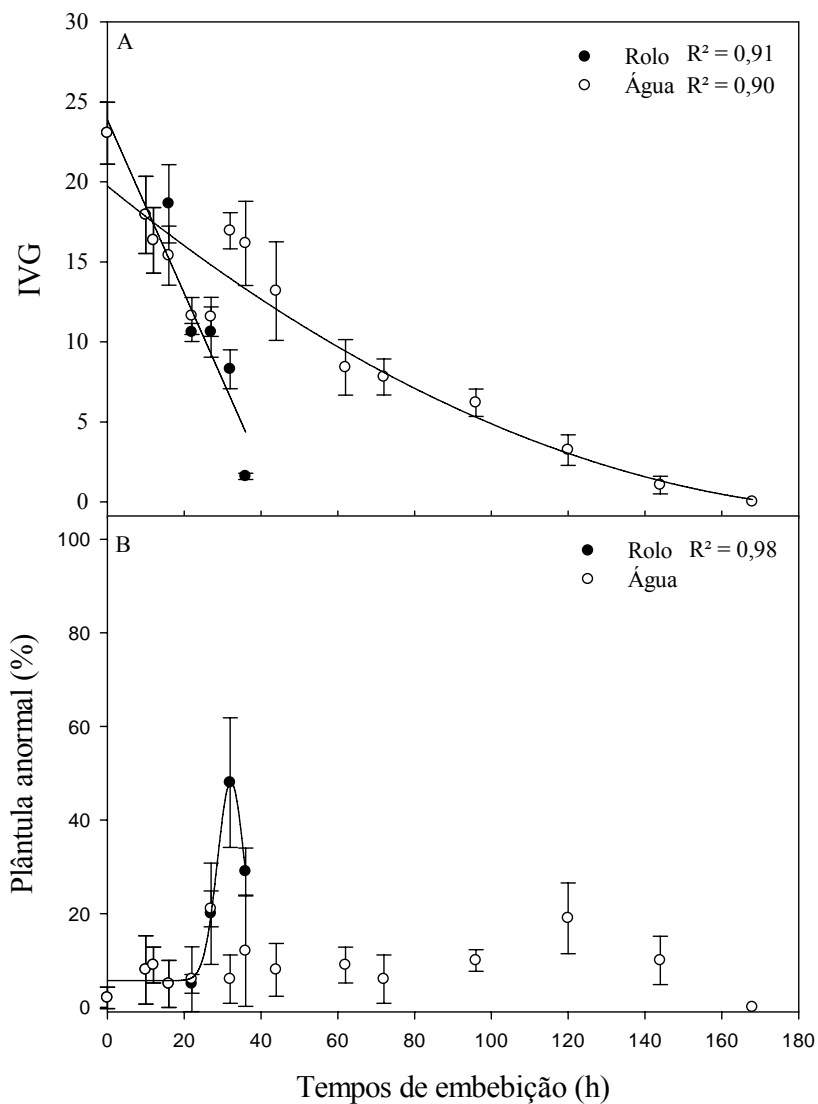
formação de plântulas anormais (Fig. 3B), devido aos danos sobre a radícula. A ocorrência de má formação do sistema radicular foi característica com o avanço da embebição e conseqüente aumento da sensibilidade à dessecação, como mostrado na figura 4A e B. Após 32 horas de embebição houve o início da protrusão radicular, com as sementes perdendo totalmente a tolerância à dessecação após 36 horas de embebição, ou seja, ao atingirem a fase III da embebição (Fig. 1, 2B).

Com o avanço da germinação, o aumento da sensibilidade das sementes à dessecação foi observado com o aumento do tempo para a protrusão da radícula. O IVG das sementes variou de 23,03 (sementes secas) a 1,6 (embebição por 36 h) (Fig. 3A).

Nas sementes em que a embebição ocorreu por imersão em água (condições de hipoxia) a tolerância à dessecação se estendeu, já que nestas condições não há protrusão da radícula, prolongando a fase tolerante destas sementes. O percentual de germinação e plântulas normais se manteve acima de 70% até 72 horas de embebição (77 e 71%, respectivamente). Após este período, com 96 horas de embebição, a germinação atingiu 58%, com 48% de plântulas normais. Com o prolongar da embebição houve a continuidade da diminuição destes percentuais chegando em zero após 168 horas de embebição (Fig. 2 A, B). A diminuição da velocidade de germinação também foi observada, com a redução do IVG com o avanço da germinação (Fig. 3A).



**Figura 2.** Percentual de germinação (A) e formação de plântula normal (B) de sementes de *Senna multijuga* submetidas à embebição e secagem (média  $\pm$  desvio padrão).

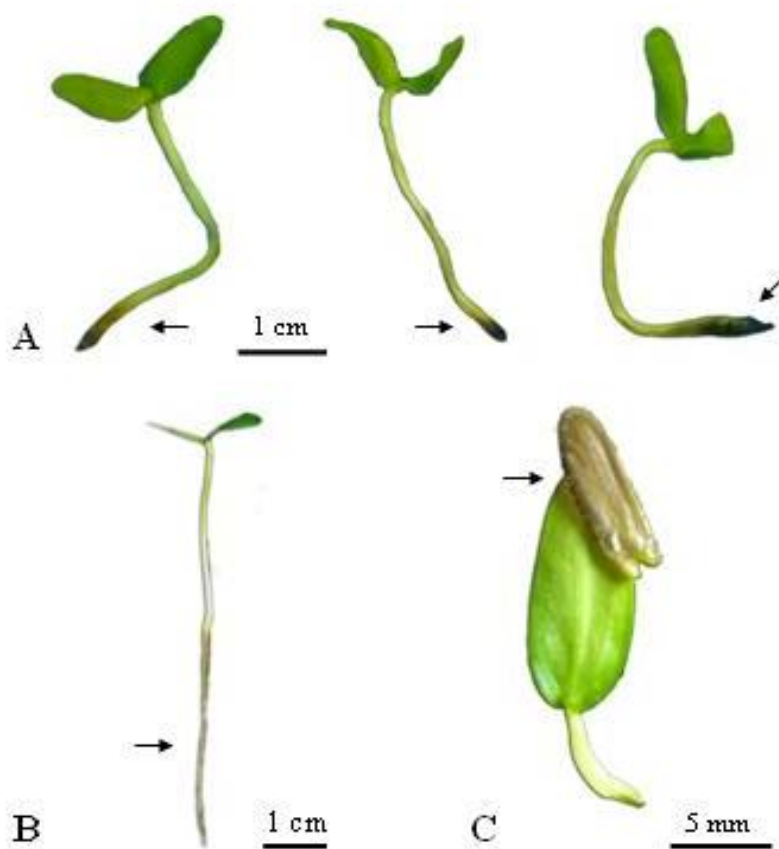


**Figura 3.** Índice de velocidade de germinação (IVG) (A) e percentual de formação de plântula anormal (B) de sementes de *Senna multijuga* submetidas à embebição e secagem (média  $\pm$  desvio padrão).

Na imersão em água não houve elevação na formação de plântulas anormais com a extensão da embebição (Fig. 3B), sendo a diminuição da germinação e da formação de plântulas normais explicada pela mortalidade das sementes. Em algumas plântulas houve a expansão dos cotilédones, mas sem haver protrusão radicular, ocorrendo o rompimento do tegumento, evidenciando a tolerância diferencial à dessecação entre as partes do embrião (Fig. 4C), sendo consideradas como mortas.

#### ***Perda da integridade de membranas celulares durante a embebição***

Nas sementes que foram submetidas à embebição sob condições de germinação (rolo de papel) houve uma tendência de diminuição da condutividade elétrica inicial e total com o prolongar da germinação, ou seja, com o aumento do tempo de embebição (Fig. 5A). Observando a condutividade elétrica das sementes embebidas em rolo de papel nota-se que a diminuição da condutividade inicial é influenciada pela diminuição da condutividade total. Devido a isso, em relação ao percentual de lixiviação de eletrólitos, houve também uma diminuição, obtendo 32,8% de lixiviação no tempo inicial de embebição (4 horas), e redução para 19,2; 2,3 e 3,5%, após 12, 27 e 32 horas, respectivamente, confirmando a perda de lixiviados durante a embebição.

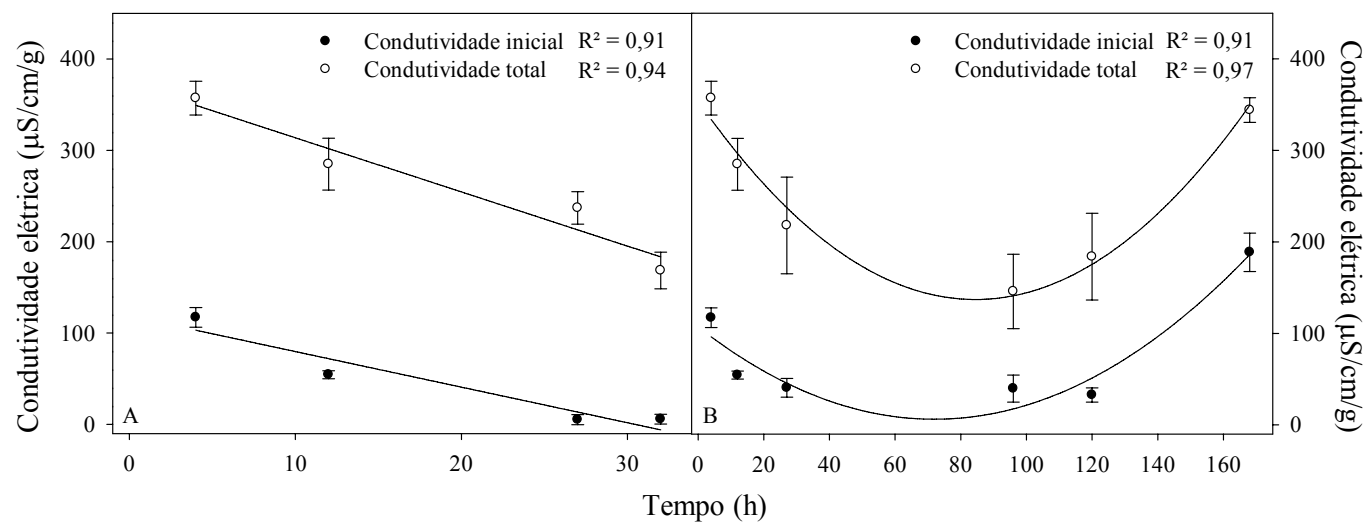


**Figura 4.** Plântulas de *Senna multijuga*. Plântula anormal, com a seta indicando a má formação e oxidação da raiz primária (A). Plântula normal, com a seta indicando o desenvolvimento normal da raiz primária (B). Expansão dos cotilédones sem a ocorrência de protrusão radicular, evidenciando a tolerância diferencial à dessecação das partes do embrião, com a seta indicando o rompimento do tegumento com a expansão dos cotilédones (C).

Nas sementes imersas em água, a condutividade elétrica, tanto a inicial quanto total, diminuiu até a embebição por 96 horas, aumentando após este período até a avaliação final (168 horas) (Fig. 5B). Após 96 horas de embebição as sementes começaram a apresentar rupturas no tegumento. Como visto na Fig. 2B, com 96 horas de embebição houve diminuição do percentual de plântulas normais, ocorrendo uma drástica diminuição deste percentual após esses tempos de embebição, havendo um aumento da condutividade elétrica neste período, como visto na Fig. 5B. O percentual de lixiviação de eletrólitos mostrou que houve um maior conteúdo de lixiviado com 4 horas de embebição (32,8%) alcançando os percentuais de 19,2; 18,7; 26,7 e 18,8% nos tempos de 12, 27, 96 e 120 horas de embebição, respectivamente, atingindo 55% com 168 horas de embebição.

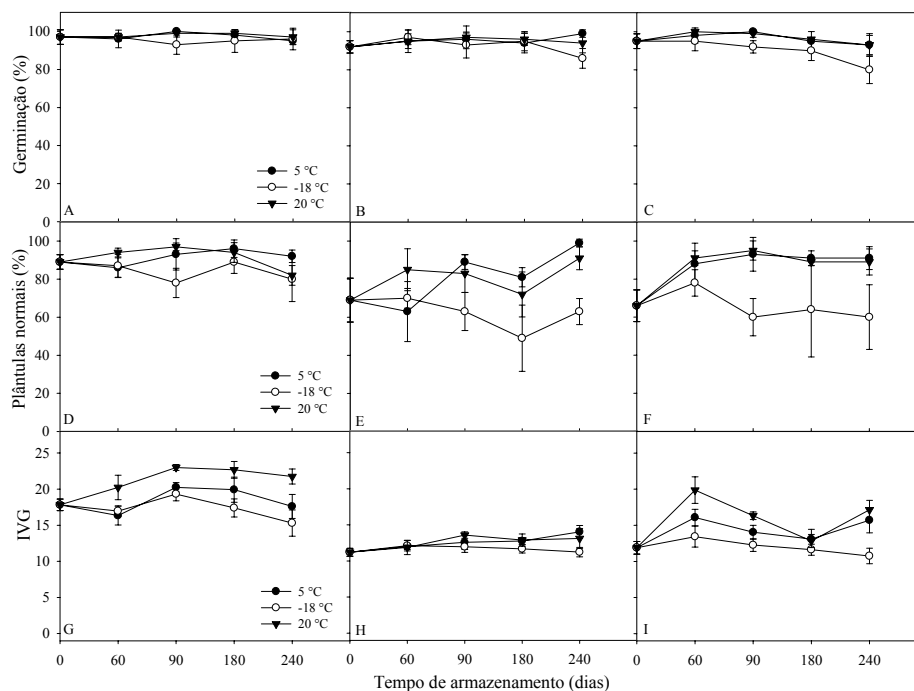
#### ***Armazenamento após embebição e dessecação***

Não houve diminuição da germinação (protrusão radicular) em função do armazenamento (Fig. 6A, B, C). O percentual de germinação manteve-se sempre acima de 80%, não diferindo entre os tratamentos.



**Figura 5.** Condutividade elétrica de sementes de *Senna multijuga* submetidas à embebição em rolo de papel (A) e imersas em água (B), e submetidas à secagem até o retorno ao conteúdo de água inicial. (média  $\pm$  desvio padrão).





**Figura 6.** Percentual de germinação, formação de plântulas normais e IVG (média  $\pm$  desvio padrão) de sementes de *Senna multijuga* após diferentes tempos de armazenamento a diferentes temperaturas. Sementes secas (A, D, G), sementes embebidas por 12 horas e dessecadas (B, E, H) e sementes embebidas por 22 horas e dessecadas (C, F, I).

A embebição das sementes e a temperatura de armazenamento não influenciaram na germinação, não diferindo da semente seca ou entre as temperaturas (Tabela s 1 e 2).

**Tabela 1.** Efeito de diferentes tempos de embebição (horas) sobre o percentual de germinação e de plântulas normais, e índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *Senna multijuga*. Média dos diferentes tempos de armazenamento.

| Tempo de embebição | Germinação (%) | Plântulas normais (%) | IVG    |
|--------------------|----------------|-----------------------|--------|
| 0 h                | 97 a           | 89 a                  | 18,9 a |
| 12 h               | 94 a           | 74 c                  | 12,2 c |
| 22 h               | 94 a           | 79 b                  | 13,9 b |

\*Letras comparam as médias nas colunas. Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 2.** Efeito das temperaturas de armazenamento sobre o percentual de germinação e plântulas normais, e índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *Senna multijuga*. Média dos diferentes tempos de armazenamento.

| Temperatura de | Germinação (%) | Plântulas normais (%) | IVG    |
|----------------|----------------|-----------------------|--------|
| 5 °C           | 96 a           | 86 a                  | 15,0   |
| -18 °C         | 93 a           | 71 b                  | 13,7 b |
| 20 °C          | 96 a           | 86 a                  | 16,4 a |

\*Letras comparam as médias nas colunas. Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à formação de plântulas normais, as sementes secas mantiveram o percentual estável ao longo do armazenamento, nas diferentes temperaturas. Para as sementes que foram hidratadas e submetidas à dessecação o armazenamento a -18 °C mostrou-se prejudicial, havendo diminuição no percentual de plântulas normais, enquanto que no armazenamento a temperaturas acima de zero (5 °C e 20 °C) não houve esta diminuição (Fig. 6D, E, F).

A influência dos tempos de embebição das sementes, com posterior dessecação, e da temperatura de armazenamento sobre o percentual de plântulas normais é mostrada na Tabela 3. O armazenamento das sementes a -18 °C

provocou queda na formação de plântulas normais nos diferentes tempos de embebição, sendo que as sementes secas armazenadas (sem a embebição e dessecação) apresentaram melhor desempenho em todas as temperaturas de armazenamento.

**Tabela 3.** Efeito da temperatura de armazenamento (°C) e tempo de embebição (horas) sobre o percentual de plântulas normais de *Senna multijuga*. Média dos diferentes tempos de armazenamento.

| Temperatura de armazenamento | Tempos de embebição (h) |       |       |
|------------------------------|-------------------------|-------|-------|
|                              | 0                       | 12    | 22    |
| 5 °C                         | 91 aA                   | 80 aC | 86 aB |
| -18 °C                       | 85 bA                   | 63 bC | 66 bB |
| 20 °C                        | 91 aA                   | 80 aC | 86 aB |

\*Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças significativas nas colunas. Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças significativas nas linhas, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O armazenamento das sementes a -18 °C apresentou os menores percentuais de plântulas normais, em relação às temperaturas de 5 °C e 20 °C. Ao final do armazenamento (240 dias), o percentual de formação de plântulas normais na temperatura de -18 °C foi de 68% enquanto que nas temperaturas de 5 °C e 20 °C foi de 92% (Tab. 4).

O IVG das sementes após o armazenamento nas diferentes condições é mostrado na figura 8. As sementes secas apresentaram maiores valores de IVG em relação às sementes embebidas por 12 e 22 horas, e posteriormente secas (Fig. 6G, H, I; Tab. 1).

Em relação à temperatura, o armazenamento a -18 °C teve o menor valor de IVG (Fig. 6G, H, I; Tab. 2). O tempo e a temperatura de armazenamento influenciaram a velocidade de germinação das sementes (IVG), com o menor IVG sendo observado após 240 dias de armazenamento a -18 °C (Tab. 4).

**Tabela 4.** Efeito do tempo e temperatura de armazenamento (°C) sobre o percentual de plântulas normais e índice de velocidade de germinação (IVG) em *Senna multijuga*.

| Tempo de armazenamento (dias) | Plântulas normais (%) |       |       | IVG              |         |         |
|-------------------------------|-----------------------|-------|-------|------------------|---------|---------|
|                               | Temperatura (°C)      |       |       | Temperatura (°C) |         |         |
|                               | 5                     | -18   | 20    | 5                | -18     | 20      |
| 0 d                           | 75 eA                 | 75 bA | 75 eA | 13,6 aA          | 13,6 aA | 13,6 bA |
| 60 d                          | 79 dB                 | 78 aB | 90 bA | 14,8 aA          | 14,2 aA | 17,3    |
| 90 d                          | 92 bA                 | 67 cB | 92 aA | 15,6 aA          | 14,5 aA | 17,6 aA |
| 180 d                         | 89 cA                 | 67 cC | 85 dB | 15,2 aA          | 13,6 aA | 16,1    |
| 240 d                         | 94 aA                 | 68 cC | 87 cB | 15,8 aA          | 12,4 aB | 17,3    |

\* Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças significativas do tempo de armazenamento nas diferentes temperaturas de armazenamento, e letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## DISCUSSÃO

O padrão de embebição de sementes secas, de acordo com Bewley (1997), é trifásico, com uma rápida absorção inicial (fase I) seguida de uma fase platô (fase II) e com novo aumento do conteúdo de água com a protrusão radicular, constituindo a fase III. Este padrão foi observado para a espécie *S. multijuga* após superação da dormência física, apresentando claramente as três fases de embebição, corroborando com o descrito por Bewley (1997).

O avanço da germinação resulta na perda da tolerância à dessecação em sementes anteriormente tolerantes (DASGUPTA; BEWLEY; YEUNG, 1982; SENARATNA; MCKERSIE, 1983; BUITINK et al., 2003; FARIA et al., 2005), sendo esta sensibilidade relatada primeiramente na radícula (REISDORPH; KOSTER, 1999; BUITINK et al., 2003; FARIA et al., 2005). Isto pode explicar os danos ocorridos nas radículas de plântulas de *S. multijuga* com o aumento da sensibilidade à dessecação nas sementes embebidas e submetidas à dessecação,

havendo necrose destes tecidos e também com a expansão dos cotilédones sem haver alongamento de eixo embrionário, evidenciando a tolerância diferencial à dessecação entre as partes do embrião. Em plântulas de *Tabebuia impetiginosa* a necrose e conseqüente morte da radícula após tratamento com PEG e dessecação não impediu o crescimento das plântulas, sendo este crescimento compensado pela produção de raízes adventícias (VIEIRA et al., 2010), o que não foi observado em plântulas de *S. multijuga* ao longo do período de avaliação.

A perda da tolerância à dessecação em sementes pode ocorrer antes da protrusão radicular ou após, dependendo da espécie, e várias são as mudanças moleculares e celulares envolvidas neste processo. Com o prolongar da germinação foi observada a diminuição da síntese de DNA, RNA e proteína durante a fase sensível à dessecação em sementes de *Phaseolus vulgaris* (DASGUPTA; BEWLEY; YEUNG, 1982) e a perda da integridade do DNA e o desarranjo dos microtúbulos nas células da radícula de plântulas de *Medicago truncatula* (FARIA et al., 2005) após a dessecação. Alterações no conteúdo de carboidratos (KOSTER; LEOPOLD, 1988; LEPRINCE et al., 1992) e danos sobre membranas celulares (SARGENT; MANDI; OSBORNE, 1981; SENARATNA; MCKERSIE, 1983; SENARATNA; MCKERSIE; STINSON 1985; TETTEROO et al., 1996) também são responsáveis pela perda da tolerância à dessecação durante a germinação em sementes. Alguns desses fatores podem ter influenciado na perda da tolerância à dessecação em sementes de *S. multijuga* durante a germinação, tornando-as sensíveis à dessecação antes da protrusão radicular. A diminuição da velocidade de germinação com o prolongar da embebição pode ser relacionada com maiores danos celulares e moleculares, necessitando de reparos para o início da germinação.

A perda da tolerância à dessecação das sementes embebidas em rolo de papel foi relacionada com o alto percentual de formação plântulas anormais, diferentes do que ocorreu pela embebição por imersão em água, sendo a perda

da tolerância à dessecação devido à mortalidade das sementes. A baixa disponibilidade de oxigênio resulta na restrição da atividade metabólica do tecido vegetal (GEIGENBERGER, 2003), sendo que a tolerância das sementes à condição de hipóxia varia entre espécies, podendo resistir dias ou poucas horas (PERATA; ALPI, 1993). Esta diminuição do metabolismo pode ter evitado maiores danos celulares às sementes de *S. multijuga* embebidas pela imersão em água, suportando a secagem após maiores tempos de embebição, em comparação com as sementes embebidas sob condições de germinação. Na embebição por imersão em água as sementes não atingem a fase III da embebição, mantendo-se na fase II.

A atividade metabólica dos tecidos possibilita a formação de radicais livres, devido a problemas no transporte de elétrons na mitocôndria, sendo fonte de elétrons para formação e acúmulo de radicais livres, levando a danos nos tecidos intolerantes à dessecação (LEPRINCE et al., 1994; LEPRINCE et al., 1995; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUTINK, 2001). Devido a isso, a diminuição da atividade metabólica pode evitar maiores danos pela dessecação (LEPRINCE et al., 1992; LEPRINCE et al., 1995; PAMMENTER; BERJAK, 1999). Leprince et al. (1995) concluíram que a exposição de sementes a baixas concentrações de oxigênio proporcionam menor acúmulo de radicais livres e conseqüentemente menores danos em tecidos intolerantes à dessecação. Danos oxidativos em tecidos intolerantes à dessecação resultam na alteração estrutural da membrana celular e perda da semi-permeabilidade, originados por condições de estresse, que promovem a formação de espécies reativas de oxigênio (SENARATNA; MCKERSIE; STINSON, 1985; SENARATNA; MCKERSIE; STINSON, 1987; LEPRINCE et al., 1994; LEPRINCE et al., 1995; BAILLY, 2004).

Durante o início da embebição a lixiviação dos compostos celulares ocorre mais rapidamente, diminuindo com o avanço da embebição (SIMON;

HARUN, 1972; POWELL; MATTHEWS, 1981), como visto durante a embebição das sementes de *S. multijuga* após embebição e secagem. Diversas alterações ocorrem nas sementes durante a perda da tolerância à dessecação, sendo a perda da integridade de membranas crucial para a desestruturação celular e conseqüente morte (SARGENT; MANDI; OSBORNE, 1981). O aumento da condutividade elétrica após 96 horas de imersão das sementes de *S. multijuga* em água pode ser devido à maior desestruturação das membranas celulares, pois neste período as sementes começaram a apresentar rupturas no tegumento, revelando maiores danos à semente.

Sementes ortodoxas com baixo conteúdo de água suportam o armazenamento a longos períodos (ROBERTS, 1973), sendo o armazenamento a -18 °C e com conteúdo de água das sementes abaixo de 10% considerado eficiente para conservação de germoplasma (GENEBANK STANDARDS, 1994; PRITCHARD; DICKIE, 2003). Para *S. multijuga*, o armazenamento das sementes secas (-10% de umidade) a -18 °C até oito meses não teve efeitos deletérios, mas apresentou danos para as sementes embebidas e posteriormente secas (Fig. 7). Estas sementes podem ter perdido as características que a faziam suportar temperaturas extremamente baixas, perdendo o comportamento ortodoxo em curto período de tempo durante o armazenamento, com diminuição a armazenabilidade em temperaturas abaixo de zero (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990; ELLIS; HONG; ROBERTS, 1991; HONG; ELLIS, 1992; PRITCHARD; DICKIE, 2003). Esta mudança de comportamento em relação ao armazenamento após embebição e secagem foi relatada por Hong; Ellis (1992) com sementes ortodoxas. Comportamento semelhante durante a dessecação e armazenamento foi observado para sementes de *Coffea arabica*, *Carica papaya* e *Elaeis guineensis*, sendo classificadas como intermediárias (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990; ELLIS; HONG; ROBERTS, 1991). Com a embebição, as sementes quiescentes secas retornam rapidamente sua atividade metabólica

(BEWLEY, 1997) e o retorno das sementes embebidas à condição seca diminui a armazenabilidade, havendo alteração no comportamento das sementes ao armazenamento. A embebição e posterior dessecação também influenciaram no vigor das sementes de *S. multijuga* armazenadas, pois mesmo não afetando a germinação das sementes (protrusão radicular) reduziu o IVG com a embebição e dessecação.

Conclui-se que as sementes de *S. multijuga* apresentam sensibilidade à dessecação anterior à protrusão radicular, com a extensão da tolerância à dessecação sendo relacionada com o estado metabólico da semente. A embebição e dessecação modificam as características das sementes, perdendo vigor e fazendo com que elas deixem de se comportar como ortodoxas ao longo do armazenamento.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, L.; MILBERG, P. Variation in seed dormancy among mother plants, populations and years of seed collection. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 1, p. 29-38, Jan. 1998.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 2, p. 93-107, Mar. 2004.
- BECKSTEAD, J.; MEYER, S. E.; ALLEN, P. S. *Bromus tectorum* seed germination: between-population and between-year variation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, n. 6, p. 875-882, June 1996.
- BEWLEY, J. D. Physiological aspects of desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 30, p. 195-238, June, 1979.
- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, July 1997.
- BLACKMAN, S. A. et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Washington, v. 96, n. 3, p. 868-874, July 1991.



BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 100, n. 1, p. 225-230, Sept. 1992.

BRADFORD, K. J. Water stress and the water relations of seed development: a critical review. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 1, p. 2-11, 1994.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.

BUITINK, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 4, p. 273-286, 2003.

BURROWS, G. E.; VIRGONA, J. M.; HEADY, R. D. Effect of boiling water, seed coat structure and provenance on the germination of *Acacia melanoxylon* seeds. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 57, n. 2, p. 139-147, 2009.

DASGUPTA, J.; BEWLEY, J. D.; YEUNG, E. C. Desiccation-tolerant and desiccation-intolerant stages during the development and germination of *Phaseolus vulgaris* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 1045-1057, Oct. 1982.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, Sept. 1990.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 653-657, May 1991.

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

FERREIRA, R. A.; DAVIDE, A. C.; MOTTA, M. S. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. e *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn., num banco de sementes em solo de viveiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 24-31, jan./abr. 2004.

GEIGENBERGER, P. Response of plant metabolism to too little oxygen. **Current Opinion in Plant Biology**, Germany, v. 6, n. 3, p. 247-256, 2003.

GENEBANK STANDARDS. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1994.

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

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. The survival of germinating orthodox seeds after desiccation and hermetic storage. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 239-247, Feb. 1992.

HU, X. W. et al. Role of the lens in controlling water uptake in seeds of two Fabaceae (Papilionoideae) species treated with sulphuric acid and hot water. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 19, n. 2, p. 73-80, June 2009a.

HU, X. W.; WU, Y. P.; WANG, Y. R. Different requirements for physical dormancy release in two populations of *Sophora alopecuroides* relation to burial depth. **Ecological Research**, Tsukuba, v. 24, n. 5, p. 1051-1056, 2009b.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **International rules for seed testing**. Switzerland: ISTA, 2004.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

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

KIKUCHI, K. et al. Water uptake by dry beans observed by micro-magnetic resonance imaging. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 3, p. 545-553, Sept. 2006.

KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A. C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 88, n. 3, p. 829-832, Nov. 1988.

LEPRINCE, O. et al. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 4, p. 581-588, Aug. 1992.

LEPRINCE, O. et al. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, n. 2, p. 233-240, June 1995.

LEPRINCE, O. et al. The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. **Plant Physiology**, Washington, v. 106, n. 4, p.1333-1339, Dec. 1994.

LEPRINCE, O. et al. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, n. 4, p. 573-580, 1990b

LEPRINCE, O.; BRONCHART, R.; DELTOUR, R. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v. 13, n. 6, p. 539-546, Aug. 1990a.

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

MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARTIN, R. E.; MILLER, R. L.; CUSHWA, C. T. Germination response of legume seeds subjected to moist and dry heat. **Ecology**, Durham, v. 56, n. 6, p. 1441-1445, June 1975.

MEURS, C. et al. Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Washington, v. 9, n. 4, p. 1484-1493, Aug. 1992.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MACCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, New York, v. 59, p. 368-373, July 1964.

PAMMENTER, N. W. et al. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 187-191, Feb. 1994.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-37, Jan. 1999.

PERATA, P.; ALPI, A. Plant responses to anaerobiosis. **Plant Science**, Limerick, v. 93, n. 1-2, p. 1-17, 1993.

POWELL, A. A.; MATTHEWS, S. A physical explanation for solute leakage from dry pea embryos during imbibition. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 1045-1050, Oct. 1981.

PRITCHARD, H. W.; DICKIE, J. B. **Predicting seed longevity**: the use and abuse of seed viability equations. Sussex: Seed Conservation Department, 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

REISDORPH, N. A.; KOSTER, K. L. Progressive loss of desiccation tolerance in germinating pea (*Pisum sativum*) seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, n. 2, p. 266-271, Feb. 1999.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

SARGENT, J. A.; MANDI, S. S.; OSBORNE, D. J. The loss of desiccation tolerance during germination: an ultrastructural and biochemical approach. **Protoplasma**, New York, v. 105, n. 59, p. 225-239, 1981.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D. Dehydration injury in germinating seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 77, n. 3, p. 620-624, July 1983.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D.; BOROCHOV, A. Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 38, n. 12, p. 2005-2014, Dec. 1987.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D.; STINSON, R. H. Simulation of dehydration injury to membranes from soybean axes by free radicals. **Plant Physiology**, Washington, v. 77, n. 2, p. 472-474, Feb. 1985.

SIMON, E. W.; HARUN, R. M. R. Leakage during seed imbibition. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 1076-1085, Nov. 1972.

TETTEROO, F. A. A. et al. Characterization of membrane properties in desiccation-tolerant and intolerant carrot somatic embryos. **Plant Physiology**, Washington, v. 111, p. 403-412, 1996.

VÁZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Seed germination of a tropical rain forest pioneer tree (*Heliocarpus donnell-smithii*) in response to diurnal fluctuation of temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 56, n. 3, p. 295-298, Nov. 1982.

VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E. Theoretical basis of protocols for seed storage. **Plant Physiology**, Washington, v. 94, n. 3, p. 1019-1023, Nov. 1990.

VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E. Theoretical basis of protocols for seed storage II: the influence of temperature on optimal moisture levels. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 201-213, Sept. 1993.

VIEIRA, C. V. et al. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 62, n. 3, p. 257-263, Dec. 2010.