

MIRIAN DE SOUSA SILVA

**BIOMETRIA DE FRUTOS E SEMENTES DE *Melanoxylon brauna*, DA
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE GENES E EXPRESSÃO DO
CICLO CELULAR DO EIXO EMBRIONÁRIO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência Florestal,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586b
2009

Silva, Miriam de Sousa, 1983-
Biometria de frutos e sementes de *Melanoxylon brauna*,
da caracterização parcial de genes e expressão do ciclo
celular do eixo embrionário / Miriam de Sousa Silva.
– Viçosa, MG, 2009.
xi, 65f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 59-65.

1. *Melanoxylon brauna* - Semente.
2. *Melanoxylon braúna* - Semente - Secagem.
3. Germinação. 4. Biometria. 5. Regulação da expressão
gênica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDO adapt. CDD 634.92323

MIRIAN DE SOUSA SILVA

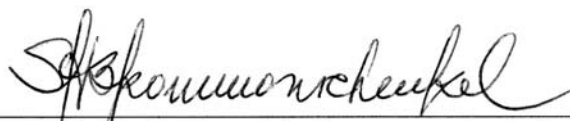
**BIOMETRIA DE FRUTOS E SEMENTES DE *Melanoxylon brauna*, DA
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE GENES E EXPRESSÃO DO
CICLO CELULAR DO EIXO EMBRIONÁRIO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência Florestal,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

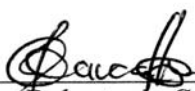
APROVADA: 28 de julho de 2009.



Prof. José Márcio Rocha Faria
(Co-Orientador)



Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Co-Orientador)



Prof. Carlos Roberto de Carvalho



Prof. Geraldo Gonçalves dos Reis



Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges
(Orientador)

A Deus e aos meus pais Sebastião Magela da Silva e Efigênia Alves de Souza,
que me proporcionaram o dom da vida...

OFEREÇO.

Ao meu orientador Professor Eduardo,
Ao meu irmão André,

DEDICO.

*Que Deus me permita falar como eu queira, e ter pensamentos dignos dos dons que
recebi, porque é Ele mesmo quem guia a sabedoria e emenda os sábios.*

AGRADECIMENTOS

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis e pessoas incomparáveis, as quais eu não poderia deixar de agradecer.

A Deus, pela sua onipotência e seu amor incondicional.

Aos meus pais e familiares, pela força e confiança depositada em mim.

Ao meu orientador Professor Eduardo Euclides de Lima e Borges, pela oportunidade, aprendizagem, dedicação, paciência e amizade ao longo desses dois anos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Engenharia Florestal, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos Professores e Pesquisados José Márcio Rocha Faria e Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela disponibilidade e pelos ensinamentos prestados na coorientação; e aos Professores Carlos Roberto de Carvalho e Geraldo Gonçalves do Reis, pela participação na banca examinadora, contribuindo com este trabalho nas sugestões e críticas.

Ao Laboratório de Análises de Sementes Florestais, especialmente a toda equipe de coleta, aos laboratoristas Leacir e Mauro e aos funcionários Francisco Bezerra e Merrinha; ao Pedro, pelo cafezinho de todas as manhãs...; à Marquione, pelo auxílio e pela amizade; e aos doutorandos, bolsistas e estagiários: Andressa,

Antônio Jorge, Viviana, Ana Paula, Bárbara, Eliana, Fábio e Gustavo, pela agradável convivência e pelo apoio nos trabalhos.

Ao Laboratório de Genômica, pela oportunidade de aprendizagem.

Aos meus colegas do Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) Anderson, Cristiane, Júlio, Simoni e Sue Ellen, pela troca de conhecimentos e pela amizade.

À Sociedade de Investigações Florestais (SIF), pelo apoio financeiro em cursos e eventos.

Aos meus amigos e colegas Engenheiros Florestais Adham Bezerra, Bruna Souto, Catarina Mori, Flávia Alves, Flaviana Milagres, Isabel Cristina, Juliana Bianche, Juliana Fialho, Lucas Amaral, Mila Liparizze, Silvano Borges e, é claro, a toda equipe... Sucesso!!!

À Marilise Teruya, pela amizade e pelo companheirismo.

À Catarina Silveira Guimarães, pelo incentivo e pela ajuda nas vésperas da defesa desta dissertação.

Por fim, a todos com que tive a oportunidade de conviver no dia a dia, apreendendo diferentes formas de viver a vida: Andréia, Cátia, Lívia, Rogério, Saudações, Meninas da Pensão da Lili; e aos meus amigos do Projeto “Montanhas dos Muriquis”.

BIOGRAFIA

MIRIAN DE SOUSA SILVA, filha de Sebastião Magela da Silva e Efigênia Alves de Souza, nasceu em 25 de junho de 1983, no Município de Oliveira, MG.

Em 1999, cursou o 1º ano do ensino médio no Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Campus de Divinópolis, MG.

Em 2001, concluiu o ensino médio na Escola “Estadual Pinheiro Campos”, em Oliveira, MG.

Em julho de 2002, ingressou no Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, graduando-se em julho de 2007.

Em agosto de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de mestrado, na área de concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa da dissertação em julho de 2009.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	3
CAPÍTULO 1	4
BIOMETRIA DOS FRUTOS E SEMENTES DE <i>Melanoxylon brauna</i> SCHOTT. (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEAE)	4
RESUMO	4
BIOMETRICS OF FRUITS AND SEEDS <i>Melanoxylon brauna</i> SCHOTT. (LEGUMINOSAE, CAESALPINIOIDEAE)	6
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4. CONCLUSÕES	21
5. REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2	26

	Página
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE GENES E EXPRESSÃO DO CICLO CELULAR DO EIXO EMBRIONÁRIO DE SEMENTES DE <i>Melanoxylon brauna</i> SCHOTT. (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEAE)	26
RESUMO	26
PARTIAL CHARACTERIZATION OF GENES AND EXPRESSION OF CELL CYCLE OF EMBRYONIC AXIS SEED <i>Melanoxylon brauna</i> SCHOTT. (LEGUMINOSAE, CAESALPINIOIDEAE)	28
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO	30
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo geral.....	36
2.2. Os objetivos específicos.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Expressão do ciclo celular do eixo embrionário	48
4.2. Caracterização parcial de genes expressos no eixo embrionário	51
5. CONCLUSÕES	57
6. REFERÊNCIAS	59

RESUMO

SILVA, Mirian de Sousa, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009.
Biometria de frutos e sementes de *Melanoxylon brauna*, da caracterização parcial de genes e expressão do ciclo celular do eixo embrionário.
Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Coorientadores: José Márcio Rocha Faria e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Os objetivos deste trabalho foram: i) estudar as características biométricas e físicas dos frutos e sementes de *Melanoxylon brauna* e estabelecer estimativas de correlação entre as variáveis; ii) quantificar pelo teste de germinação a tolerância das sementes de *Melanoxylon brauna* à secagem rápida em estufa submetidas aos diferentes tempos e temperaturas; iii) avaliar a ploidia de DNA por citometria de fluxo das sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ou não à secagem rápida em estufa à temperatura de 50 °C por 24 h ao longo da embebição; iv) caracterizar parcialmente alguns genes supostamente envolvidos com o desenvolvimento, maturação, proteção, estresse osmótico e tolerância à dessecação, a partir do cDNA extraído do eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna*. Como principais resultados relacionados com as características biométricas dos frutos e sementes de *Melanoxylon brauna*, foram verificados que as características biométricas das sementes variaram menos do que a dos frutos e que a correlação entre as características biométricas das sementes e dos frutos foi relativamente baixa. Além de apontarem para uma produção muito baixa de sementes por fruto. Na

avaliação da tolerância das sementes expostas ao tratamento de secagem em diferentes tempos e temperaturas, elas apresentaram redução gradativa na porcentagem de germinação com o aumento da temperatura e tempo de secagem. A ploidia de DNA avaliada por citometria de fluxo dos eixos embrionários das sementes de *Melanoxylon brauna*, as quais não foram submetidas à secagem artificial, indicaram a existência de núcleos 2C, 4C e 8C. Entretanto, a maioria dos núcleos avaliados apresentou o percentual de núcleos com ploidia de DNA 2C (95%), indicando que a maioria das células se encontrava na fase G1 do ciclo celular. Já as sementes que foram submetidas à secagem rápida em estufa também exibiram a presença de núcleos 2C, 4C e 8C e não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) no percentual de núcleos com ploidia de DNA 2C, 4C e 8C em relação às sementes que não foram submetidas à secagem em estufa. Foram obtidas as sequências de nucleotídeos dos fragmentos clonados referentes aos genes *CAT1*, *SPS1*, *ABI5*, *Transk* e *PM25*. As sequências de nucleotídeos obtidas para os respectivos genes servirão para a confecção de *primers* específicos para posteriores estudos de análise de expressão gênica durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas à secagem, visando entender as possíveis causas da perda da qualidade fisiológica dessas sementes.

ABSTRACT

SILVA, Mirian de Sousa, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009.
Biometry of fruits and seeds of Melanoxylon brauna, the partial characterization of genes and expression of the cell cycle of the embryonic axis. Adviser: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Co-Advisers: José Márcio Rocha Faria and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

The objectives of this study were: i) study the physical and biometric characteristics of fruits and seeds of *Melanoxylon brauna* and establish correlation estimates between the variables, ii) quantify through the germination test the seed tolerance of *Melanoxylon brauna* to the quick drying oven, subject to different times and temperatures, iii) to evaluate the DNA ploidy by the *Melanoxylon brauna* cytometry seed flow with and without rapid drying in an oven at 50 ° C for 24 h during soaking iv) partially characterize some genes supposedly involved with the development, maturation, protection, osmotic stress and desiccation tolerance, from the cDNA extracted from the embryonic axis of *Melanoxylon brauna* seeds. The most important results related to the biometric characteristics of *Melanoxylon brauna* fruits and seeds observed were that the biometric characteristics of the seeds varied less than the fruits and that the correlation between the biometric characteristics of seeds and fruits was relatively low, besides indicating a very low production of seeds per fruit. In assessing the tolerance of seeds exposed to the drying treatment at different times and temperatures, they showed a gradual reduction in the germination

percentage with an increase in temperature and drying time. The DNA ploidy assessed by flow cytometry of the embryonic axes of *Melanoxylon brauna* seeds, which were not subjected to artificial drying, indicated the existence of 2C, 4C and 8C nuclei. However, most of the cores tested showed the percentage of nuclei with 2C DNA ploidy (95%), indicating that most cells were in the G1 phase of the cell cycle. The seeds that were dried rapidly in a greenhouse also exhibited the presence of 2C, 4C and 8C nuclei and showed no significant differences ($p > 0.05$) in the percentage of nuclei with DNA ploidy of 2C, 4C and 8C in relation to seeds that were dried in an oven. The nucleotide sequences were obtained from the cloned fragments related to genes *CAT1*, *SPS1*, *ABI5*, *Transk* and *PM25*. The nucleotide sequences obtained for the respective genes will be used for the preparation of specific primers for further studies to analyze gene expression during *Melanoxylon brauna* seed germination subjected to drying in order to understand the possible causes of the loss of the physiological quality of these seeds.

INTRODUÇÃO GERAL

O bioma da Mata Atlântica é caracterizado pela alta diversidade de espécies e por alto grau de endemismo. No entanto, a intervenção humana, ao longo dos anos, causou a destruição da maior parte desse bioma, restando apenas cerca de 7% a 8% da sua área original (LAGOS; MULLER, 2007). Neste contexto, políticas públicas de âmbito nacional e internacional estão sendo direcionadas para a preservação dos recursos naturais (NETO; SILVA, 2007), especialmente das espécies arbóreas que vêm sendo ameaçadas de extinção.

Na busca de conhecimentos que podem fornecer informações sobre as espécies vegetais e auxiliar em sua classificação, em sua identificação, na produção de sementes e mudas, nos estudos de sucessão ecológica e na regeneração dos ecossistemas florestais, destaca-se a caracterização biométrica e física dos frutos e sementes.

A conservação *ex situ*, ou seja, fora da área de ocorrência natural das espécies, como nos bancos de sementes, constitui uma alternativa viável para a conservação dos recursos genéticos das espécies (BROW; HARDNER, 2000). Entretanto, a deficiência de conhecimento a respeito das condições ideais de secagem e da capacidade de armazenamento para as espécies florestais nativas tem sido um entrave para o sucesso dos programas de bancos de germoplasma no longo prazo, uma vez que nem todas as sementes apresentam o mesmo comportamento quanto à secagem e ao armazenamento (DAVIDE et al., 2003; JETTON et al., 2008; HONG et al., 1996). Para a efetiva conservação das sementes, é necessária a compreensão

dos aspectos fisiológicos, morfológicos, citológicos e moleculares durante a secagem e o armazenamento, já que nem todas as sementes são tolerantes à dessecação, exigindo condições especiais de armazenamento (HONG et al., 1996).

Melanoxylon brauna, popularmente conhecida como braúna, pertencente à família Leguminosae-Caesalpinioideae, ocorre na floresta pluvial atlântica e foi contemplada para este estudo por ser considerada uma das espécies arbóreas brasileiras com grande potencial econômico madeireiro (LORENZI, 1992) e por se encontrar, atualmente, na Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção do IBAMA na categoria vulnerável (IBAMA, 2009), sendo que a disponibilidade de árvores matrizes na região para a coleta de sementes e a facilidade no manuseio e armazenamento dessas sementes também contribuíram para a escolha.

No intuito de contribuir para o conhecimento a respeito da espécie *Melanoxylon brauna*, no primeiro capítulo, estudaram-se as características biométricas e físicas dos frutos e sementes e no segundo, a expressão do ciclo celular do eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ou não à secagem rápida em estufa ao longo da embebição e caracterizaram parcialmente alguns genes, supostamente envolvidos com o desenvolvimento, maturação, proteção, estresse osmótico e tolerância à dessecação.

Os resultados e discussões aqui obtidos servirão para subsidiar a criação de estratégias mais eficientes para os programas de preservação, principalmente das espécies que vêm sendo ameaçadas de extinção, uma vez que pouco se conhece sobre os mecanismos de sobrevivência, perpetuação, variabilidade e conservação *in situ* e *ex situ* dessas espécies. Além disso, podem contribuir para futuros trabalhos moleculares relacionados com a expressão gênica durante a germinação das sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas à secagem visando entender as possíveis causas da perda da qualidade fisiológica dessas sementes.

REFERÊNCIAS

BROWN, A. H. D.; HARDNER, C. M. Sampling the gene pools of forest trees for *ex situ* conservation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Eds.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000. p. 185-196.

DAVIDE, A. C.; CARVALHO, L. R.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M. Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família Lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. **Cerne**, Lavras, v. 9, n.1, p. 029-035, 2003.

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

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Lista Oficial de Flora Ameaçada de extinção**. Portaria nº. 37-N de 3 de abril de 1992. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/patrimonio/>>. Acesso em: 4 abr. 2009.

JETTON, R. M.; DVORAK, W. H.; WHITTIER, W. A. Ecological and genetic factors that define the natural distribution of Carolina hemlock in the southeastern United States and their role in situ conservation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, n. 8-9, p. 3212-3221, 2008.

LAGOS, A. R.; MULLER, B. L. A. Hotspot Brasileiro Mata Atlântica. **Saúde & Meio Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 35-45, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v. 2.

NETO, S. N. O.; SILVA, J. A. S. Áreas protegidas e a produção de sementes florestais sob o ponto de vista legal. In: PINA-RODRIGUES, F. C. et al. **Parâmetros técnicos para a produção de sementes florestais**. 1. ed. Seropédica: EDUR, 2007. v. 1.

CAPÍTULO 1

BIOMETRIA DOS FRUTOS E SEMENTES DE *Melanoxylon brauna* SCHOTT. (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEAE)

Mirian de Sousa Silva¹, Eduardo Euclides de Lima e Borges¹, Helio Garcia Leite¹

RESUMO

Melanoxylon brauna (Leguminosae-Caesalpinioideae) é uma espécie arbórea secundária inicial, de ocorrência natural na floresta pluvial da encosta atlântica e conhecida pelo seu grande potencial madeireiro. Devido à sua exploração indiscriminada, dificuldade de produção de sementes, crescimento lento, encontra-se na lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção do IBAMA, na categoria vulnerável. Os objetivos deste trabalho foram estudar as características biométricas e físicas dos frutos e sementes de *Melanoxylon brauna* e estabelecer estimativas de correlação entre as variáveis. Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva, de ajuste de distribuições estatísticas, de análise de correlação e de análise de regressão. A função-densidade de probabilidade Weibull foi ajustada para as características dos frutos e das sementes. Os valores de coeficiente de variação indicaram que as características biométricas das sementes variaram menos do que a dos frutos. As medidas tomadas dos frutos apresentaram, em média, 13,08 cm de comprimento,

¹ Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brasil (mirianfloresta@gmail.com).

4,10 cm de largura, 13,52 mm de espessura, 33,33 g de massa fresca e 17,00 g de massa seca. Já as sementes exibiram, em média, 9,86 mm de comprimento, 2,71 mm de largura e 2,02 de espessura. O número médio de estruturas membranosas por fruto foi de 10,30, enquanto o número médio de sementes consideradas normais por fruto, 2,50, sobressaindo grande quantidade de sementes malformadas. As estimativas de correlação das características biométricas e físicas dos frutos com as características das sementes apresentaram como maiores valores as correlações positivas significativas do comprimento do fruto com as estruturas membranosas do fruto, da massa da matéria fresca do fruto com estruturas membranosas por fruto e da massa da matéria fresca com o número de sementes normais. Os resultados apontaram para uma produção muito baixa de sementes por fruto, fator relevante, principalmente, para a regeneração natural e para a produção de mudas em viveiro.

Palavras-chave: Braúna, características biométricas e físicas. Correlação. Sementes florestais.

**BIOMETRICS OF FRUITS AND SEEDS OF *Melanoxylon brauna* SCHOTT.
(LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEAE)**

Mirian de Sousa Silva¹, Eduardo Euclides de Lima e Borges¹, Helio Garcia Leite¹

ABSTRACT

Melanoxylon brauna (Leguminosae-Caesalpinioideae) is an early secondary tree species, naturally occurring on the coast of the Atlantic rain forest and known for its great potential as timber. Because of its indiscriminate exploitation, poor seed production, and slow growth, it is found on the official list of Endangered Species of IBAMA, in the vulnerable category. The objectives of this study were to study the physical and biometric characteristics of the fruits and seeds of *Melanoxylon brauna* and establish correlation estimates between variables. The data were analyzed using descriptive statistics, distribution adjustment statistics, correlation analysis and regression analysis. The Weibull- function probability density was adjusted to the characteristics of the fruits and seeds. The coefficient of variation indicated that the biometric characteristics of the seeds varied less than the fruits. Measurements taken of the fruits were, on average, 13.08 cm long, 4.10 inches wide, 13.52 mm thick, 33.33 g of fresh weight and 17.00 g dry weight. The seeds exhibited an average of 9.86 mm length, 2.71 mm width and 2.02 mm thickness. The average number of membranous structures per fruit was 10.30, while the average number of seeds per

¹ Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brasil (mirianfloresta@gmail.com).

fruit considered normal was 2.50, keeping in mind the large amounts of malformed seeds. Correlation estimates of the biometric characteristics and physical characteristics of the fruits with the seeds showed greater values as the positive correlations of the length of the fruits with the membranous structures of the fruits, the fresh weight of fruits with the membranous structures in the fruits and mass of the fresh fruit matter with the number of normal seeds. The results indicated a very low production of seeds per fruit, which is a relevant factor, especially for natural regeneration and the production of seedlings in nurseries.

Keywords: Braun, biometric and physical characteristics. Correlation. Forest seeds.

1. INTRODUÇÃO

A família Leguminosae é uma das maiores e mais diversificadas dentre as dicotiledôneas. Possui mais de 18.000 espécies distribuídas em mais de 700 gêneros de grande importância econômica, além de ser um importante componente nas comunidades vegetais tropicais (LEWIS, 2005). A família é subdividida em três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (BIONDO et al., 2005), distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do território brasileiro (JOLY, 2002). Inserida nesse contexto, a *Melanoxylon brauna* Schott (Leguminosae-Caesalpinioideae), conhecida como braúna, baraúna, braúna-preta, graúna, ibitaúva, maria-preta, rabo-de-macaco, é uma das mais duras e incorruptíveis madeiras brasileiras (LORENZI, 1992). De acordo com a Portaria IBAMA 37/92, encontra-se atualmente na Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção, na categoria vulnerável (IBAMA, 2009). Ocorre no bioma da Mata Atlântica, nos estados de Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo. Sua época de frutificação compreende o período de setembro a outubro (LORENZI, 1992). É classificada, por Santos et al. (2004), como uma espécie secundária inicial.

Apesar de várias espécies arbóreas tropicais e subtropicais serem conhecidas por seu grande valor econômico, especialmente devido a sua madeira como, por exemplo, jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*), braúna (*Melanoxylon brauna*), vinhático (*Plathymenia reticulata*), pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*) (NOVAES et al., 2009), pouco se conhece sobre os

mecanismos de sobrevivência, perpetuação, variabilidade e conservação *in situ* e *ex situ* dessas espécies, principalmente entre aquelas ameaçadas de extinção.

A grande variabilidade existente nas espécies arbóreas tropicais, em relação às características morfológicas e físicas dos frutos e sementes, vem sendo comprovada por Amorim et al. (2008), Andrade et al. (2008), Gusmão et al. (2006), Macedo et al. (2009), Ramos e Ferraz (2008), Silva et al. (2008) e Vieira e Gusmão (2008). Esse tipo de estudo é importante para auxiliar na caracterização de famílias e/ou espécies do mesmo gênero (CRUZ; CARVALHO, 2003b), na identificação e certificação do material empregado na análise de sementes (AMARO et al., 2006), para dar suporte à produção de sementes e mudas e para contribuir nos estudos de sucessão ecológica e regeneração dos ecossistemas florestais. Entretanto, ainda são poucos os estudos dessa natureza, diante da grande diversidade de espécies arbóreas.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo a caracterização dos frutos e sementes de *Melanoxylon brauna*, visando determinar o tamanho, a massa de matéria fresca e seca, o número de estruturas membranosas por fruto, o número de estruturas membranosas vazias por fruto e o número de sementes normais, danificadas por insetos e malformadas por fruto. Além disso, procurou-se estabelecer estimativas de correlação entre essas variáveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta. Os frutos de *Melanoxylon brauna* foram coletados em setembro de 2008, no município de Leopoldina (MG, Brasil), em uma área de pastagem. O tipo climático da região é, segundo a classificação de Köppen (1948), o tropical úmido (Aw), com inverno seco e verão chuvoso e temperatura média anual de 21 °C.

Coleta e beneficiamento. Frutos maduros em estágio de dispersão foram colhidos diretamente de quatro árvores matrizes com o auxílio de podão. Os frutos foram transportados para o galpão de beneficiamento do Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) e foram pesados antes de serem expostos à temperatura ambiente para sua completa deiscência.

Caracterização dos frutos e sementes. Os frutos foram amostrados aleatoriamente, descartando-se aqueles visualmente danificados e com deformação. Os frutos foram individualmente identificados e, em 104 deles, foram feitas medições de comprimento, largura e espessura. O comprimento do fruto (CF) foi medido com o auxílio de régua graduada. Para a medição da largura (LF) e espessura (EF), feitas com o auxílio de um paquímetro digital, foram tomados três pontos, sendo dois nas extremidades e um na parte mediana. A massa de matéria fresca (MMF) foi determinada utilizando-se de balança com precisão de quatro casas decimais. Após as medições, os frutos foram deixados à temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foi determinada a massa de matéria seca (MMS) e feita a

contagem do número de estruturas membranosas por fruto (EM/F) e de estruturas membranosas vazias por fruto (EMV/F).

As sementes retiradas dos 104 frutos foram classificadas como normais (SN), danificadas por insetos (SDI) e malformadas (SMF). Foram consideradas sementes danificadas por insetos todas as que apresentaram orifício indicando a presença de larva ou inseto adulto (BRASIL, 1992), e consideradas sementes normais aquelas sem dano aparente. Após o beneficiamento de todos os frutos, foram amostradas 150 sementes para a caracterização física, sendo mensurados o comprimento, o diâmetro e a espessura delas. Considerou-se como comprimento a porção compreendida entre a porção basal e a apical da semente. A largura e a espessura foram medidas na parte intermediária da semente.

Análise dos dados. Os dados de biometria de frutos e sementes foram analisados por meio de ajuste de distribuições estatísticas e de estatísticas descritivas, que compreenderam medidas de posição (média, valores mínimo e máximo) e de dispersão (coeficientes de variação, de assimetria e de curtose), de análise de correlação e de análise de regressão.

Para a distribuição de frequências, foram testadas as seguintes funções: Beta, Burr, Dagum, Dagum (4P), Frechet, Frechet (3P), Gamma, Gamma (3P), Gumbel Max, Gumbel Min, Johnson SB, Log-Gamma, Log-Logistic, Log-Logistic (3P), Log-Pearson 3, Logistic, Lognormal, Lognormal (3P), Normal, Pareto, Weibull e Weibull (3P). Os ajustes foram feitos pelo método da máxima verossimilhança, e o teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar a aderência dos dados às distribuições.

Foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson a 5% de probabilidade para estudar a associação entre as características biométricas e físicas dos frutos e as características das sementes.

As relações entre o número de estruturas membranosas por fruto e o comprimento, entre esse número e a massa de matéria fresca do fruto e a relação entre o número de sementes normais e a massa de matéria fresca do fruto foram estudadas por meio de regressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características gerais dos frutos e sementes de *Melanoxylon brauna*. O fruto é um legume deiscente e seco que contém em seu interior estruturas membranosas envolvendo as sementes (Figura 1A-C), o que permite a dispersão das sementes pelo vento. Essas características também foram descritas por Barroso et al. (1999).

Neste estudo, constatou-se que as estruturas membranosas perfuradas por insetos contabilizaram 14,66% e as vazias, 2,05%. Já as sementes malformadas corresponderam a 59,01% e as aparentemente normais (Figura 1D), 24,28% .

Cruz e Carvalho (2003a) encontraram 6,7% de sementes vazias em frutos de *Couratari stellata*. Diferentes artigos publicados discutem a predação das sementes. Conforme descreveram Souza et al. (2007), sementes de *Senna spectabilis* apresentaram variações na intensidade de predação de acordo com a procedência. Santos et al. (2009) encontraram 33% de predação em sementes de *Hymenaea stigonocarpa* em relação ao total de sementes saudáveis. Segundo Silva et al. (citados por SANTOS et al., 2009), a quantidade de sementes saudáveis de *Acacia bahiensis* é sempre superior àquelas predadas. Consolaro e Guarino (citados por SANTOS et al., 2009) afirmaram que as maiores dimensões dos frutos e sementes são, em muitos casos, responsáveis pela predação.



Figura 1 – Frutos de *Melanoxylon brauna* na coleta (A) e após a secagem à temperatura ambiente (B). Estruturas membranosas que envolvem as sementes de *Melanoxylon brauna* (C) e sementes beneficiadas (D). As barras horizontais representam 1 cm.

Características biométricas e distribuição de frequências dos frutos e sementes. O coeficiente de variação das medidas dos frutos mostrou a grande variabilidade no que se refere à MMF, à MMS e, em escala intermediária, ao comprimento e à espessura (Tabela 1). Somente a largura se mostrou mais uniforme entre os frutos amostrados.

Vieira e Gusmão (2008) obtiveram maiores valores de desvio-padrão para a massa de matéria fresca e comprimento dos frutos de *Talisia esculenta* em relação às demais variáveis. Diferentemente, os frutos de *Manilkara huberi* diferiram entre si pela largura (FREITAS et al., 2009), enquanto os de *Cryptocarya aschersoniana* apresentaram tendência à alometria positiva e os de *Cryptocarya moschata*, à isometria.

Tabela 1 – Médias do comprimento (C), largura (L), espessura (E), massa de matéria fresca (MMF) e massa de matéria seca (MMS) dos frutos de *Melanoxylon brauna*. n: tamanho amostral, CV: coeficiente de variação, S: assimetria, K: curtose

Características biométricas	N	Mínimo	Média ± Erro-padrão	Máximo	CV (%)	S	K
C (cm)	104	7,00	13,08 ± 0,27	21,00	20,68	0,60	0,54
L (cm)	104	2,72	4,10 ± 0,60	5,85	14,71	0,47	-0,25
E (mm)	104	0,81	13,52 ± 0,25	2,01	19,17	0,19	-0,78
MMF (g)	104	12,37	33,33 ± 1,18	79,01	36,06	0,84	1,03
MMS (g)	104	5,52	17,00 ± 0,60	39,57	35,85	1,07	1,80

De acordo com os dados de Souza et al. (2007), as dimensões dos frutos de *Senna spectabilis* variaram com as procedências, demonstrando a influência do ambiente. Tais resultados estão de acordo com os de Moraes e Alves (2009), que, ao agruparem os indivíduos pelas dimensões dos frutos e sementes, verificaram relação parcial com o ambiente, bem assim com fatores genéticos.

Os valores dos parâmetros ajustados para a distribuição de frequências das variáveis e os valores do teste de Kolmogorov-Smirnov estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Estimativas das distribuições de frequências das variáveis comprimento (CF), largura (LF), espessura (EF), massa de matéria fresca (MMF) e massa de matéria seca dos frutos (MMS) e comprimento (CS), largura (LS) e espessura (ES) das sementes de *Melanoxylon brauna* e valores do teste de Kolmogorov-Smirnov

Variáveis	Distribuição	Estimativas das distribuições			Kolmogorov Smirnov	
CF	Weibull (3P)	2,5874	7,4056	6,4980	0,0760	
LF	Weibull (3P)	2,6859	1,6965	2,5967	0,0934	
EF	Weibull (3P)	2,5882	6,9407	7,3616	0,0732	
MMF	Weibull (3P)	1,8969	24,582	11,5070	0,0707	
MMS	Weibull (3P)	2,0621	13,479	5,0570	0,0641	
CS	Weibull (3P)	2,1176	2,6323	9,7364	0,0579	
LS	Normal			0,6893	6,0779	0,0929
ES	Weibull (3P)	1,769	1,0891	2,0073	0,1373	

Entre as funções ajustadas para as características do fruto e das sementes de *Melanoxylon brauna*, a maior aderência foi observada com a função Weibull (3P), à exceção para a largura da semente, cuja melhor distribuição foi a normal.

Todas as características biométricas dos frutos de *Melanoxylon brauna* apresentaram distribuição assimétrica à direita ($S > 0$), com distribuição mais achatada do que a normal (platicúrtica), em que $k < 3$ (Figura 2).

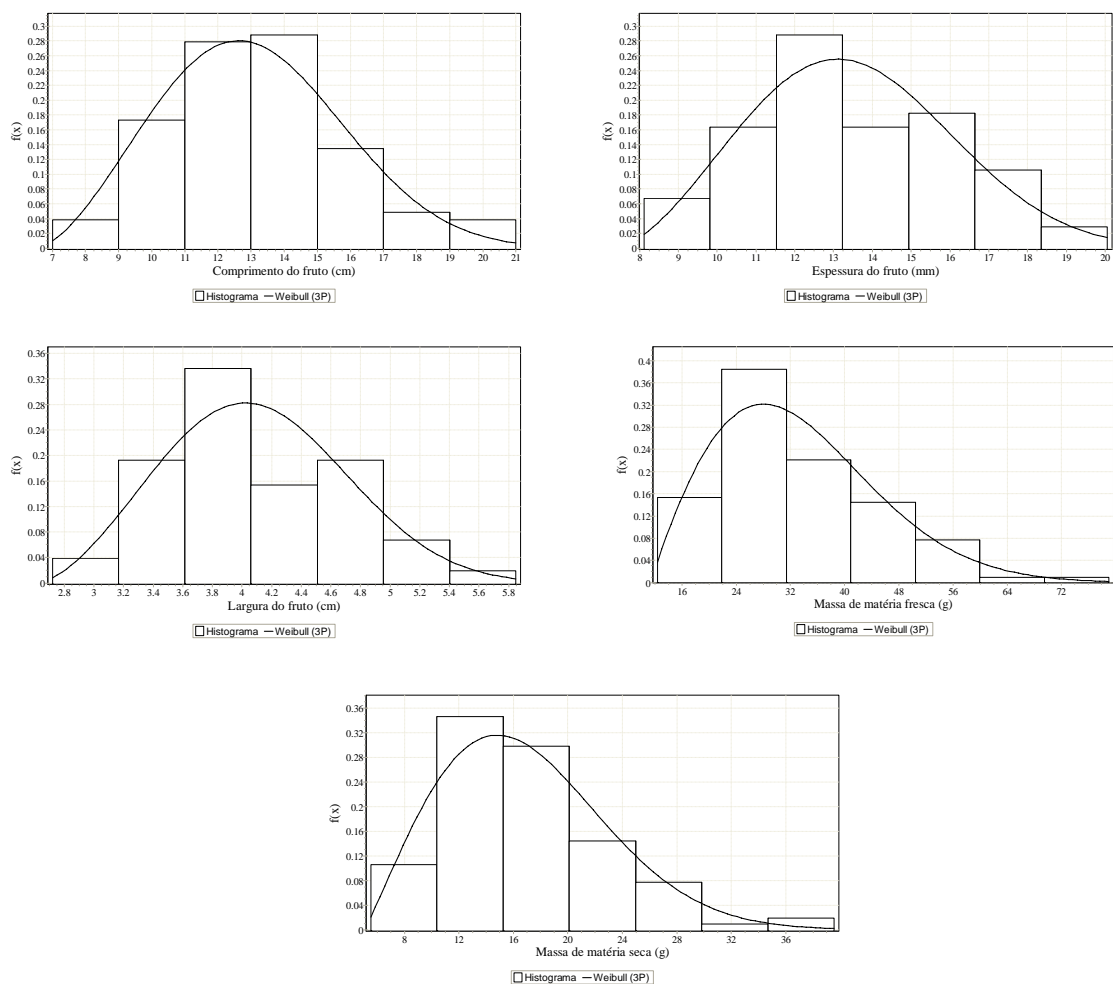


Figura 2 – Distribuição de frequências das variáveis comprimento (C), largura (L), espessura (E), massa de matéria fresca (MMF) e massa de matéria seca (MMS) dos frutos de *Melanoxylon brauna*, obtidas a partir das estimativas dos parâmetros da função Weibull (Tabela 2).

Os valores biométricos das sementes encontram-se na Tabela 3. A variação no comprimento e na largura das sementes foi menor do que a dos frutos, com menor variação entre máximo e mínimo da espessura. O comprimento e espessura da semente de *Melanoxylon brauna* apresentaram distribuição assimétrica à direita, enquanto a largura, distribuição assimétrica à esquerda.

Tabela 3 – Médias do comprimento (C), largura (L) e espessura (E) das sementes de *Melanoxylon brauna*. n: tamanho amostral, CV: coeficiente de variação, S: assimetria e K: curtose

Características biométricas	N	Mínimo	Média ± Erro-padrão	Máximo	CV (%)	S	K
C (mm)	150	9,86	12,06 ± 0,09	15,60	9,61	0,65	0,03
L (mm)	150	2,71	6,07 ± 0,05	8,14	11,34	-0,24	3,30
E (mm)	150	2,02	2,97 ± 0,05	6,99	19,81	3,50	20,11

Os resultados indicaram que sementes com maior comprimento e espessura predominaram na amostra analisada, enquanto a largura e espessura das sementes apresentaram distribuição mais “afilada” que a normal, denominada leptocúrtica, em que $k > 3$ (Figura 3).

Os valores de coeficiente de variação indicam que as características biométricas das sementes variaram menos do que a dos frutos (Tabelas 1 e 3), sugerindo que as variações no tamanho e peso dos frutos de *Melanoxylon brauna* estão pouco correlacionadas com as características biométricas das sementes.

Em sementes de *Talisia esculenta*, os maiores valores de desvio-padrão ocorreram com relação à massa de matéria fresca e ao comprimento (VIEIRA; GUSMÃO, 2008).

As presenças das estruturas membranosas e das sementes nos frutos encontram-se na Tabela 4. A ocorrência de estruturas vazias (EMV) é mínima, com as estruturas membranosas, em sua maior parte, ocupadas por sementes. Sobressai uma grande quantidade de sementes malformadas, em relação àquelas normais, embora fossem viáveis.

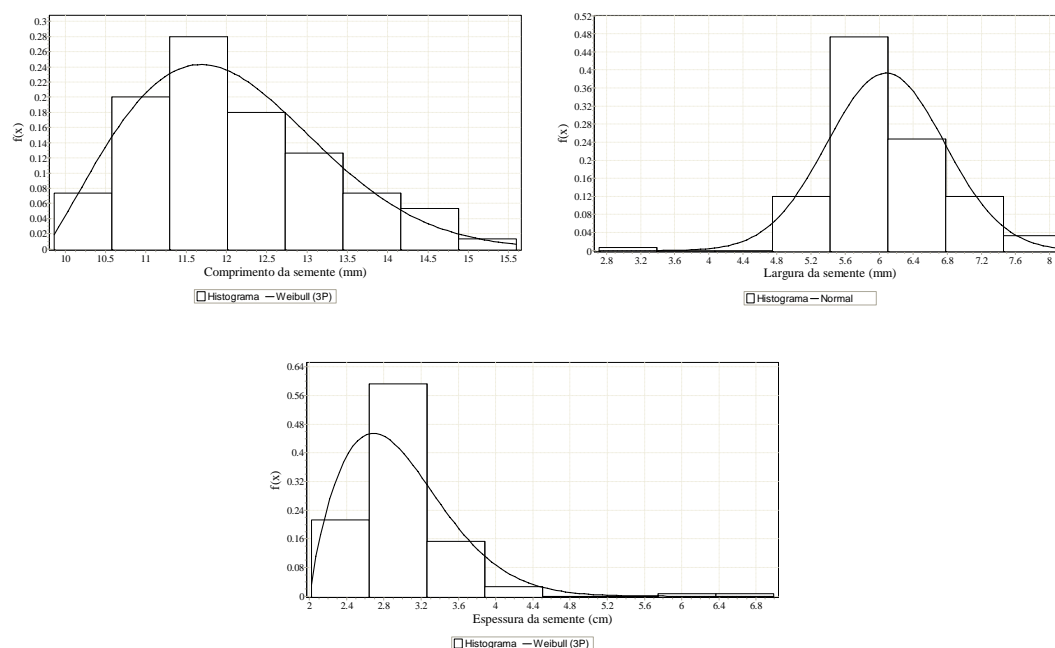


Figura 3 – Distribuição das frequências das variáveis comprimento (C), largura (L) e espessura (E) das sementes *Melanoxylon brauna* obtidas a partir das estimativas dos parâmetros da função Weibull e Normal (Tabela 2).

Tabela 4 – Número de estruturas membranosas por fruto (EM/F), número de estruturas membranosas vazias por fruto (EMV/F), número de sementes normais por fruto (SN/F), número de sementes danificadas por insetos por fruto (SDI/F), número de sementes malformadas por fruto (SMF/F) de *Melanoxylon brauna* n: tamanho amostral

Características	n	Mínimo	Média ± erro-padrão	Máximo
EM/F	104	2,00	10,30 ± 0,250	18,00
EMV/F	104	0,00	0,21± 0,054	3,00
SN/F	104	0,00	2,50 ± 0,250	11,00
SDI/F	104	0,00	1,51 ± 0,140	7,00
SMF/F	104	0,00	6,08 ± 0,320	15,00

As estimativas de correlação das características biométricas e físicas dos frutos com as características das sementes encontram-se na Tabela 5, tendo como maiores valores as correlações positivas significativas do comprimento do fruto com as estruturas membranosas do fruto (Figura 4), da massa da matéria fresca do fruto

com estruturas membranas por fruto (Figura 5) e da massa da matéria fresca com o número de sementes normais (Figura 6), e correlações negativa e significativa da largura do fruto com a estrutura membranosa por fruto e da largura do fruto com sementes malformadas por fruto.

Tabela 5 – Estimativas do coeficiente de correlação de Pearson (r) para comparar o número de estruturas membranas por fruto (EM/F), o número de estruturas membranas vazias por fruto (EMV/F), o número de sementes normais por fruto (SN/F), o número de sementes danificadas por insetos por fruto (SDI/F) e o número de sementes malformadas por fruto (SMF/F) com as características biométricas e físicas dos frutos de *Melanoxylon brauna*

Comparações	CF	LF	EF	MMF	MMS
EM/F	0,457*	-0,377*	-0,016 ^{ns}	0,319*	0,189 ^{ns}
EMV/F	0,050 ^{ns}	0,016 ^{ns}	-0,054 ^{ns}	0,015 ^{ns}	-0,024 ^{ns}
SN/F	0,215*	0,171 ^{ns}	0,148 ^{ns}	0,360*	0,246*
SDI/F	0,046 ^{ns}	-0,102 ^{ns}	-0,093 ^{ns}	0,046 ^{ns}	0,029 ^{ns}
SMF/F	0,161 ^{ns}	-0,393*	-0,080 ^{ns}	-0,059 ^{ns}	-0,057 ^{ns}

* e ^{ns} significativos e não significativos a 5% de probabilidade, respectivamente.

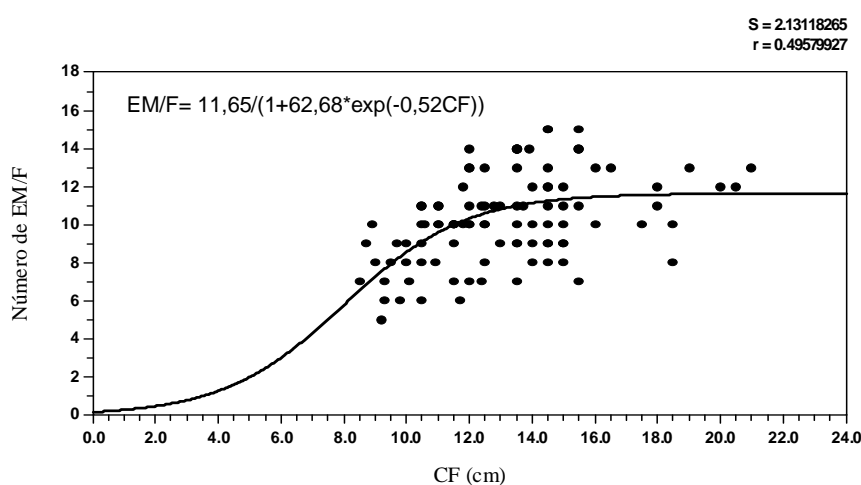


Figura 4 – Relação entre o número de estruturas membranas por fruto e o comprimento do fruto (cm) de *Melanoxylon brauna*.

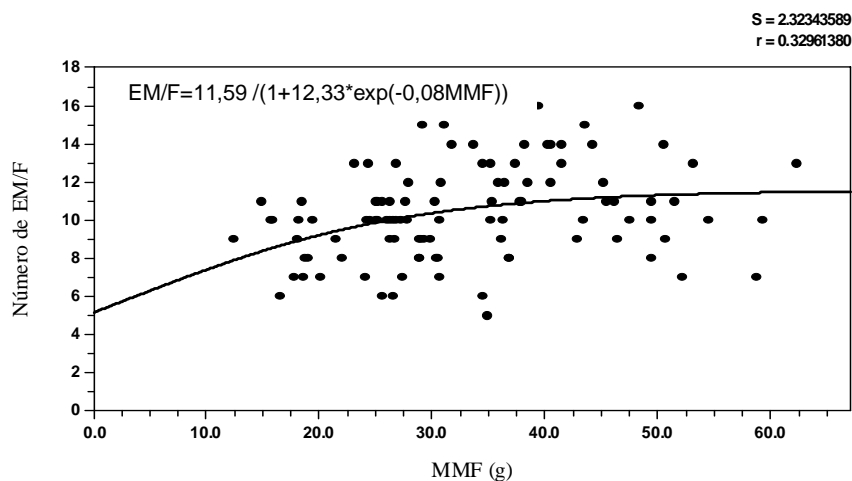


Figura 5 – Relação entre o número de estruturas membranosas por fruto e a massa de matéria fresca do fruto (g) de *Melanoxylon brauna*.

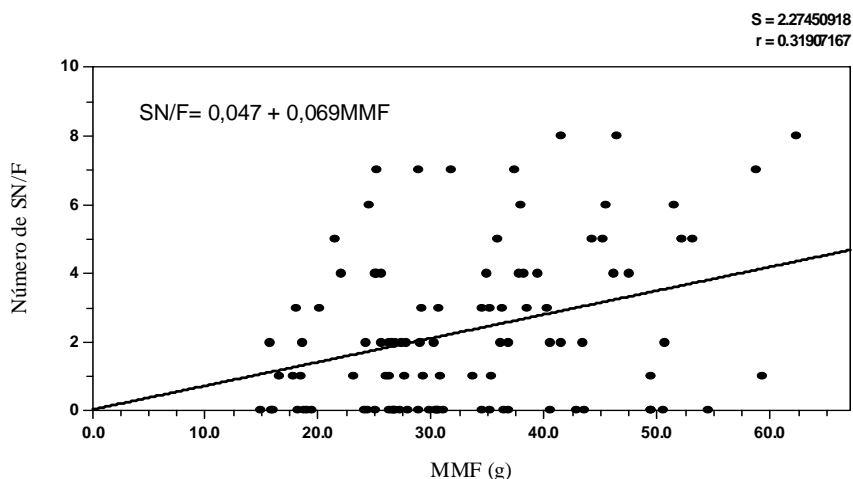


Figura 6 – Relação entre o número de sementes normais por fruto e a massa de matéria fresca do fruto (g) de *Melanoxylon brauna*.

A correlação positiva significativa da massa de matéria seca com o número de sementes normais (Figura 6) e desse com o comprimento do fruto apresentou valores intermediários.

Como as estruturas membranosas representam, principalmente, número de sementes normais, pode-se inferir que a massa de matéria fresca dos frutos está,

basicamente, relacionada com a presença das sementes, da mesma forma, embora em menor proporção, que a massa de matéria seca do fruto.

O comprimento do fruto é influenciado, em menor escala, pela presença de sementes normais e, em maior, pelas estruturas membranosas. Da mesma forma, a largura do fruto é definida de forma inversamente proporcional à presença de sementes malformadas e estruturas membranosas.

Moraes e Alves (2009) observaram grande variação na relação entre as dimensões dos frutos com seus diásporos em *Cryptocaria aschersoniana* e *C. moschata* e relataram que diásporos grandes aumentariam o sucesso germinativo, o crescimento e a sobrevivência da plântula, sendo mais vantajosos evolutivamente do que a dispersão. Já Cruz e Carvalho (2003a) não obtiveram relação entre tamanho do fruto e número de sementes por frutos para *Courataria stellata*.

As variações encontradas nas características biométricas e físicas dos frutos de *Melanoxylon brauna* podem estar associadas, principalmente, a fatores ambientais durante o florescimento e desenvolvimento, relacionadas possivelmente a uma alta variabilidade genética populacional (MACEDO, 2009). Já o número de sementes produzidas por fruto pode estar sendo influenciado principalmente pelas condições ambientais, como a disponibilidade de água durante o florescimento (MARCOS FILHO, 2005).

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados, chegou-se às seguintes conclusões:

- Os frutos de *Melanoxylon brauna* provenientes da área de estudo apresentaram alta variabilidade em relação à massa de matérias fresca e seca.
- Houve correlação positiva entre a massa de matéria fresca com o número de sementes normais.
- As dimensões médias do comprimento, largura e espessura dos frutos de *Melanoxylon brauna* ficaram em torno de 13,0 cm, 4,0 cm e 13,0 mm, respectivamente.
- As sementes de *Melanoxylon brauna* apresentaram, em média, 9,90 mm de comprimento, 2,70 de largura e 2 mm de espessura.
- Com relação à massa de matéria fresca dos frutos de *Melanoxylon braúna*, as massas mais frequentes ficaram entre 22,0 g e 32,0 g.
- O número médio de sementes de *Melanoxylon brauna* classificadas como normais por fruto foi em torno de 2,5.

AGRADECIMENTOS

À equipe do Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) da UFV, pelo apoio aos trabalhos de coleta e de análise; e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P.; CARVALHO, N. M. Influência da posição das sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) na planta sobre suas características físicas. In: CONGRESSO E EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL SOBRE FLORESTAS, 6., 2000, Porto Seguro, BA. **Anais...** Porto Seguro, BA: Instituto Ambiental Biosfera: Forest, 2000. p. 142.

AMARO, M. S.; FILHO, S. M.; GUIMARÃES, R. M.; TEÓFILO, E. M. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. – Apocynaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 1, p. 63-71, 2006.

AMORIM, I. L., DAVIDE, A. C., FERREIRA, R. A., CHAVES, M. M. F. 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, 2008.

ANDRADE, D. A. V.; ORTOLANI, F. A.; MORO, J. R.; MORO, F. V. Aspectos morfológicos de frutos e sementes e caracterização citogenética de *Crotalaria lanceolata* E. Mey. (Papilionoideae- Fabaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 621-625, 2008.

BARROSO, M. B.; MARIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes** – Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa, MG: UFV, 1999.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae-Leguminosae do sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 241-248, 2005.

BOTEZELLI, L.; DAVIDE, A. C.; MALAVASI, M. M. Características dos frutos e sementes de quatro procedências de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). **Cerne**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 009-018, 2000.

BRASIL – Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992.

CARDOSO, G. L.; LOMÔNACO, C. Variações fenotípicas e potencial olástico de *Eugenia calycina* Cambess. (Myrtaceae) em uma área de transição cerrado-vereda **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 131-140, 2003.

CRUZ, D. E.; MARTINS, F. O.; CARVALHO, J. E. U. Biometria de frutos e sementes e germinação de jatobá-curuba (*Hymenaea intermedia* Ducke, Leguminosae – Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 161-165, 2001.

CRUZ, D. E.; CARVALHO, J. E. U. Biometria de frutos e germinação de sementes de *Couratari stellata* A. C. Smith (Lecythidaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 33, n. 3, p. 381-388, 2003a.

CRUZ, D. E.; CARVALHO, J. E. U. Biometria de frutos e sementes e germinação de curupixá (*Micropholis* cf. *verrugosa* Mart. & Eichler – Sapotaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 33, n. 3, p. 389-398, 2003b.

FREITAS, A. D. D.; LEÃO, N. V. M.; CARRERA, R. H. A.; BENCHIMOL, R. L.; IKEDA, M. **Biometria, grau de umidade e número de sementes/Kg de sementes da espécie *Manilkara huberi* (maçaranduba) encontrada no Parque Ecológico de Gunma, município de Santa Barbara-Pa**. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/viiceb/resumos/347a.pdf>>. Acesso em: 25 maio 2009.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; FONSECA JUNIOR, E. M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex A. Juss.). **Cerne**, Lavras, v. 12, p. 84-91, 2006.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Lista Oficial de Flora Ameaçada de extinção. **Portaria nº. 37-N**, de 3 de abril de 1992. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/patrimonio>>. Acesso em: 4 abr. 2009.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora Nacional, 2002.

KOËPPEN, W. **Climatologia**. Buenos Aires: Panamericana, 1948.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew: The Royal Botanic Garden, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992. v. 2.

MACEDO, M. C.; SCALON, S. P. Q.; SARI, A. P.; FILHO, H. S.; ROSA, Y. B. C. J.; ROBAINA, A. D. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Magonia pubescens* ST. Hil (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 31, n. 2, p. 202-211, 2009.

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

MORAES, P. L. R.; ALVES, M. C. **Biometria de frutos e diásporos de *Cryptocarya aschersoniana* Mez e *Cryptocaria moschata* Nees (Lauraceae)**. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n1/pt/abstract?article+bno/302012002>>. Acesso em: 25 maio 2009.

NOVAES, R. M. L.; RODRIGUES, J. G.; LOVATO, M. B. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 86-96, 2009.

PEDRON, F. A.; MENZES, J. P.; MENEZES, N. L. Parâmetros biométricos de fruto, endocarpo e sementes de butiazeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 585-586, 2004.

RAMOS, M. B. P.; FERRAZ, I. D. K. Estudos morfológicos de frutos, sementes e plântulas de *Enterolobium schomburgkii* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 227-235, 2008.

SANTOS, J. H.; FERREIRA, R. L. C.; SILVA, J. A.A.; SOUZA, A.L.; SANTOS, E. S.; MEUNIER, I. M. J. Distinguição de grupos ecológicos de espécies florestais por meio de técnicas multivariadas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 387-396, 2004.

SANTOS, M. R.; BRAGA, D. L.; VELOSO, M. D. M.; NUNES, Y. R. F.; FAGUNDES, M. **Biometria de frutos e predação de sementes de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne – Fabaceae-caesalpinioideae)**. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/viiceb/resumos/666a.pdf>>. Acesso em: 25 maio 2009.

SILVA, K. B.; ALVES, U. E.; BRUNO, R. L. A.; MATOS, V. P.; GONÇALVES, E. P. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e de *Erythrina velutina* Willd., Leguminosae – Papilionidae. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 30, n. 3, p. 104-114, 2008.

SOUZA, S. C. A.; BRAGA, L. L.; TOLENTINO, G. S.; MATOS, A. M. M.; RODRIGUES, P. M. S.; NUNES, Y. R. F. Biometria de frutos e predação de sementes de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn. provenientes de três localidades do norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 864-866, 2007. Suplemento 1.

VIEIRA, F. A.; GUSMÃO E. Biometria, armazenamento de sementes e emergência de plântulas de *Talisia esculenta* Radlk. (Sapindaceae). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1073-1079, 2008.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE GENES E EXPRESSÃO DO CICLO CELULAR DO EIXO EMBRIONÁRIO DE SEMENTES DE *Melanoxylon* *brauna* SCHOTT. (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEAE)

Mirian de Sousa Silva¹, Eduardo Euclides de Lima e Borges¹,
Sérgio Hermínio Brommonschenkel², José Márcio Rocha Faria³,
Carlos Roberto de Carvalho⁴

RESUMO

Este trabalho foi realizado com os objetivos de estudar a expressão do ciclo celular do eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ou não à secagem rápida em estufa ao longo da embebição e caracterizar parcialmente alguns supostos genes supostamente envolvidos com o desenvolvimento, maturação, proteção, estresse osmótico e tolerância à dessecação. Inicialmente, as sementes foram submetidas à secagem rápida em estufa nas temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80 °C, nos tempos de 24, 48 e 72 h e, em seguida, submetidas ao teste de germinação e determinação do teor de água. A avaliação da ploidia de DNA por citometria de fluxo das sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ou não à secagem em estufa

¹ Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

² Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

³ Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

foi realizada em sementes secas na temperatura de 50 °C por 24 h e em sementes mantidas a 25 °C. Para a obtenção das sequências de nucleotídeos, 19 genes de *arabidopsis* (*ABI3-2*, *Ald. Dehyd*, *BADH*, *CAT1*, *CSD2*, *ELIP*, *(Mn)SOD*, *PER1*, *RD28*, *SC514*, *PM25*, *SPS1*, *Transk*, *ABI5*, *PKABA*, *LEC1*, *EM6*, *ABI3* e *PRX*) envolvidos no desenvolvimento e germinação de sementes foram selecionados, e oligonucleotídeos degenerados foram desenhados visando à amplificação de sequências homólogas a partir de sementes de *Melanoxylon brauna*. RNA total foi extraído a partir do eixo embrionário das sementes de *Melanoxylon brauna*, e posteriormente foi realizada a confecção do cDNA, que foi utilizado como molde para amplificação das sequências-alvo. Os produtos de PCR (fragmentos de cDNA) obtidos foram purificados e clonados no vetor *pGEM-T Easy* e sequenciados. As sementes apresentaram redução gradativa na porcentagem de germinação com o aumento da temperatura e tempo de secagem, e foi verificada a existência de núcleos 2C, 4C e 8C nos eixos embrionários das sementes de *Melanoxylon brauna*, submetidas ou não à secagem artificial em estufa. Entretanto, a maioria dos núcleos avaliados apresentou o percentual de núcleos com ploidia de DNA 2C (95%), indicando que a maioria das células se encontrava na fase G1 do ciclo celular. Já as sementes que foram submetidas à secagem rápida em estufa também exibiram a presença de núcleos 2C, 4C e 8C e não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no percentual de núcleos com ploidia de DNA 2C, 4C e 8C em relação às sementes que não foram submetidas a essa secagem. Foram obtidas as sequências de nucleotídeos dos fragmentos clonados referentes aos genes *CAT1*, *SPS1*, *ABI5*, *Transk* e *PM25*. A análise de similaridade das sequências obtidas com as sequências depositadas em bancos de dados revelou a similaridade com os genes *CAT1*, *SPS1*, *Transk* e *PM25* de outras espécies. As sequências de nucleotídeos obtidas dos respectivos genes servirão para a confecção de oligonucleotídeos específicos para posteriores estudos de expressão gênica durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas à secagem visando entender as possíveis causas da perda da qualidade fisiológica dessas sementes.

Palavras-chave: Braúna, genes, ploidia de DNA. Secagem rápida. Sequenciamento.

**PARTIAL CHARACTERIZATION OF GENES AND CELL CYCLE
EXPRESSION OF EMBRYONIC AXIS SEEDS OF *Melanoxylon brauna*
SCHOTT. (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEAE)**

Mirian de Sousa Silva¹, Eduardo Euclides de Lima e Borges¹,
Sérgio Hermínio Brommonschenkel², José Márcio Rocha Faria³,
Carlos Roberto de Carvalho⁴

ABSTRACT

This work was carried out with the aim of assessing the cell cycle expression of the embryonic axis of *Melanoxylon brauna* seeds subjected or not to a fast-drying oven during soaking and to partially characterize some putative genes supposedly involved in the development, maturation, protection, osmotic stress and desiccation tolerance. Initially, seeds were dried rapidly in an oven at temperatures of 40, 50, 60, 70 and 80 ° C, at times of 24, 48 and 72 h and then subjected to germination tests and the determination of water content. The evaluation of DNA ploidy by flow cytometry of the *Melanoxylon brauna* seeds with or without oven drying was carried out on dry seeds at 50 ° C for 24 h and on seeds maintained at 25 ° C. To obtain the nucleotide sequences, 19 *arabidopsis* genes (*ABI3-2*, *Ald. Dehyd*, *BADH*, *CAT1*, *CSD2*, *ELIP*, (*Mn*) *SOD*, *PER1*, *RD28*, *SC514*, *PM25*, *SPS1*, *Transk*, *Abi5*, *PKABA*, *LEC1*, *EM6*, *ABI3* and *PRX*) involved in developing and germinating seeds were selected, and

¹ Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

² Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

³ Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

degenerate oligonucleotides were designed with the aim of amplifying the homologous sequences of *Melanoxyton brauna* seeds. Total RNA was extracted from the embryonic axis of *Melanoxyton brauna* seeds, and later the production of the cDNA was carried out, which was used as a template to amplify the target sequences. The PCR products (cDNA fragments) obtained were purified and cloned into vector *pGEM-T Easy* and sequenced. The seeds showed a gradual reduction in germination percentage with increased temperature and drying time, and were checked for nuclei 2C, 4C and 8C in the embryonic *Melanoxyton brauna* seed, with and without the artificial drying oven. However, most of the cores tested showed the percentage of nuclei with 2C DNA ploidy (95%), indicating that most cells were in the G1 phase of the cell cycle. The seeds that were dried rapidly in a greenhouse also exhibited the presence of nuclei 2C, 4C and 8C and showed no significant differences ($p > 0.05$) in the percentage of nuclei with DNA ploidy of 2C, 4C and 8C in relation to seeds that were not subjected to this drying. We obtained the nucleotide sequences of the cloned fragments related to genes *CAT1*, *SPS1*, *Abi5*, *Transk* and *PM25*. The similarity analysis of the sequences obtained with the sequences deposited in databases revealed similarities with genes *CAT1*, *SPS1*, *Transk* and *PM25* from other species. The nucleotide sequences obtained from the respective genes will be used for the preparation of specific primers for further studies of gene expression during *Melanoxyton brauna* seed germination submitted to drying in order to understand the possible causes of the loss of the seeds physiological quality.

Keywords: Braun, genes, DNA ploidy. Fast drying. Sequencing.

1. INTRODUÇÃO

A conservação *ex situ* de sementes é empregada como alternativa viável para a conservação dos recursos genéticos das espécies (BROWN; HARDNER, 2000), como acontece, por exemplo, nos bancos de germoplasma de espécies arbóreas tropicais e subtropicais, principalmente aquelas ameaçadas de extinção, visto que a semente é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (MASETTO, 2008; SANTOS, 2000). Entretanto, a deficiência de conhecimento a respeito das condições ideais de secagem e da capacidade de armazenamento para as espécies florestais nativas vem sendo entrave para o sucesso dos programas de bancos de germoplasma, já que nem todas as sementes apresentam o mesmo comportamento quanto à secagem e ao armazenamento (DAVIDE et al., 2003; JETTON et al., 2008; HONG et al., 1996).

O processo de secagem torna-se necessário porque as sementes recém-colhidas apresentam, geralmente, teor de água inadequado para o armazenamento com segurança (VILLELA; PERES, 2004), constituindo umas das principais causas da perda do poder germinativo e do vigor das sementes. Segundo Carvalho e Nakagawa (2000), a secagem permite a obtenção de sementes de melhor qualidade por possibilitar colheitas antecipadas e evitar danos que ocorrem no campo devido às condições climáticas, ataques de insetos e de microrganismos, entre outros, além de reduzir a taxa de deterioração das sementes durante o armazenamento. De acordo com a classificação proposta por Roberts (1973), as sementes que podem ser secas a baixos níveis de umidade (2% - 5%) e armazenadas a temperaturas baixas são

denominadas ortodoxas, enquanto as que são dispersas com alto grau de umidade, metabolicamente ativas e não toleram a dessecação a baixos níveis de umidade (< 12%), nem o armazenamento a baixas temperaturas, são denominadas recalcitrantes. Ellis et al. (1990) propuseram uma terceira categoria, denominada intermediária, que tolera a dessecação somente até o teor de umidade de 7 a 10% e não suporta temperaturas baixas por tempo prolongado.

É, assim, fundamental, também, que se determine a temperatura adequada para a secagem, bem como o tempo de exposição à temperatura, para evitar danos e a consequente perda de qualidade das sementes, independentemente do nível de tolerância à dessecação. Miyasaki e Cândido (1978) verificaram decréscimo na qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* determinada pelo tempo de secagem. Pinto et al. (1986) verificaram que o aumento no tempo de secagem de sementes de *Tabebuia avellanedae* resultou na queda da qualidade de sementes quando usada a temperatura de 40 °C. Sementes de *Araucaria angustifolia*, secas em temperaturas de 30 a 40 °C por até 16 h, tiveram o vigor significativamente reduzido, tanto pelo efeito da temperatura quanto pelo tempo de secagem, muito embora a redução no teor de água mostrasse efeito significativo somente da temperatura (RAMOS; CARNEIRO, 1988). No entanto, a secagem de sementes de *Chorisia speciosa* não afetou seu vigor, mesmo em temperatura de até 60 °C por até 150 min (LOTTI et al., 1995).

O ciclo celular, processo pelo qual acontecem a síntese de DNA e a divisão celular (TAIZ; ZEIGER, 2004), tem sido indicado como marcador para a determinação das possíveis mudanças ocorridas no estado fisiológico da semente durante seu desenvolvimento, maturação, secagem e germinação (DOLEZEL et al., 1999; SLIWINSKA, 2009). No ciclo celular, o conteúdo de DNA nuclear 2C é encontrado em células na fase de pré-síntese (G_1) e o 4C, em células nas quais a replicação do DNA já ocorreu (G_2). A constante C denota o conteúdo de DNA para a condição haploide.

Pesquisas indicam que células na fase G_1 (2C) do ciclo celular são mais resistentes a estresses e possuem maior longevidade, em comparação com células na fase G_2 (4C) (DELTOUR, 1985; SARACCO et al., 1995). Já o baixo conteúdo de água durante a maturação das sementes pode causar a inibição da síntese de DNA (DELTOUR, 1985) e resultar na acumulação de núcleos na fase G_1 do ciclo celular (KOZEKO; TROYAN, 2000).

A reativação do ciclo mitótico durante a germinação de sementes ortodoxas ocorre depois do período de embebição (KOZEKO; TROYAN, 2000), e a síntese de DNA precede a mitose, porque a maioria das células meristemáticas de sementes maduras possui conteúdo de DNA 2C (BEWLEY; BLACK, 1994).

As fases da morfogênese, maturação e germinação das sementes são pouco integradas (MCCARTY, 1995). Milhares de genes são conhecidos por atuarem durante o desenvolvimento da semente, entre os quais alguns codificam enzimas essenciais, relacionadas à mobilização de reservas, proteínas estruturais do citoesqueleto e das membranas e proteínas de reservas, enquanto outros genes regulam aspectos específicos do desenvolvimento do embrião (NAKABAYASHI et al., 2005).

Genes codificadores de produtos associados à tolerância à dessecação, especialmente aqueles envolvidos em mudanças metabólicas (LEPRINCE et al., 2000; WALTERS et al., 2002b), proteção contra oxidação (PUKACKA; RATAJCZAK, 2005) e outras supostas moléculas protetoras, têm mostrado um padrão de expressão particular durante a dessecação.

A aquisição da tolerância à dessecação de sementes ortodoxas durante seu desenvolvimento tem sido relacionada com a expressão de diferentes genes, como *ABI3*, *ABI5*, *LEC1* (JONES et al., 1997; KOORNNEEF et al., 1984; PARCY et al., 1994; HARADA, 2001), entre outros.

ABI3 (*Abscisic acid insensitive*) é expresso especificamente em sementes, sendo um dos genes mais estudados em relação ao desenvolvimento da semente (PARCY et al., 1994). Fatores de transcrição, como *ABA-Insensitive3/Viviparous1* (*ABI3/VPI*), atuam como intermediários na regulação de respostas ao ABA, que promove o processo de maturação da semente incluindo a deposição de reservas, a imposição de dormência e a aquisição de tolerância à dessecação (LI; FOLEY, 1997; MCCARTY, 1995; ZENG et al., 2003).

As proteínas de maturação, assim como os açúcares, também possuem habilidade de proteger componentes intracelulares durante a dessecação. Seu mecanismo pode atuar de forma análoga ao das proteínas resistentes ao calor na prevenção e reparo de danos, e sua ocorrência pode ser correlacionada com a tolerância à dessecação na maturação e germinação (BLACKMAN et al., 1991).

As enzimas *aldeido desidrogenase* catalisam reações irreversíveis de oxidação de aldeídos, correspondentes aos ácidos carboxílicos. Shin et al. (2009), estudando aldeído desidrogenases em arroz, verificaram que o gene *ALDH7* está envolvido na remoção de vários aldeídos formados durante o estresse oxidativo que ocorre na dessecação de sementes, sendo importante na manutenção da viabilidade e maturação de sementes pela desintoxicação de aldeídos, que geralmente ocorre por peroxidação de lipídios.

Os genes *CAT* (*catalase*), *CSD2* (*Cu/Zn superoxide dismutase*) e *SC514* (*lipoxigenase*) são considerados antioxidantes. O gene *CAT*, em *Arabidopsis*, é membro de uma pequena família multigênica, que inclui os genes *CAT1*, *CAT2* e *CAT3*, os quais catalisam a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e têm papel importante no controle homeostático de espécies reativas com oxigênio. Algumas evidências sugerem que a expressão e atividade da catalase estão sempre relacionadas a estresses em *Arabidopsis* (WILLIAMSON; SCANDALIOS, 1992; ORENDI et al., 2001; VANDENABEELE et al., 2004; VERSLUES et al., 2007; XING et al., 2007).

Os genes *EM6* (*Early methionine 6*), *PER1* (*1-Cys peroxiredoxin*), *PKABA1* (*Abscisic acid induced Kinase*) e *sHSP* (*Small heat-shock protein*) mostram-se relacionados com o estresse e também com a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas (DELSENY et al., 2001; AALEN, 1999; ANDERBERG; WALKER-SIMMONS, 1992; WEHMEYER; VIERLING, 2000). Os genes *LEC* (*Leafy cotyledon*) são definidos por mutações em três locos, em *Arabidopsis*, *LEC1*, *LEC2* e *FUSCA3* (*FUS3*), e estão envolvidos principalmente no desenvolvimento do embrião (HARADA, 2001).

Peroxiredoxins são enzimas antioxidantes que fazem parte do complexo de mecanismos de proteção envolvidos no reparo de danos causados por radicais livres, durante a dessecação e início da embebição, e também estão envolvidas na manutenção e proteção durante a dormência (HASLEKAS et al., 1998; MOWLA et al., 2002). Os genes *1-Cys Prx* são expressos sozinhos em sementes e somente nas partes tolerantes à dessecação (AALEN, 1999). Observou-se aumento do nível de sua expressão em sementes em desenvolvimento, bem como a sua manutenção em sementes maduras durante o armazenamento (MOWLA et al., 2002).

A síntese de sHSPs (*small heat-shock proteins*), cuja principal função é proteger as células durante a dessecação e reidratação (COCA et al., 1994; DEROCHER; VIERLING, 1994; ALAMILLO et al., 1995), ocorre em resposta a condições de altas temperaturas, e sua expressão acontece em estágios específicos do desenvolvimento da planta (WEHMEYER; VIERLING, 2000). Diversos estudos mostram que, em plantas, as sHSPs são divididas em cinco famílias gênicas, sendo estas baseadas na análise da sequência do DNA, reatividade imunológica e localização intracelular (WATERS et al., 1996).

A ativação da *sucrose phosphate syntase*, enzima reguladora na assimilação e distribuição do carbono nas plantas, ocorre durante estresse osmótico em tecidos foliares no escuro, que funciona como facilitador da formação de sucrose para a osmorregulação em células fotossintéticas e na conversão do amido ou lipídio em sucrose na germinação de sementes (HUBER, S.; HUBER, J., 1996; BÁRCENAS et al., 2000). A síntese de sucrose em folhas e sementes de plantas superiores tolerantes à dessecação, quando estressadas, ocorre com o aumento de açúcares específicos relacionados com a tolerância à dessecação (KOSTER; LEOPOLD, 1988; CROWE et al., 1984).

Transketolases, por sua vez, são enzima-chaves que atuam na redução e oxidação da via da pentose fosfato, sendo responsáveis pela síntese de intermediários do açúcar fosfato, os quais podem ser utilizados no metabolismo de carboidratos, ácidos nucleicos e reações de biossíntese de aminoácidos (RACKER, 1961). De acordo com Bernacchia et al. (1995), a expressão diferencial da família gênica durante a fase de reidratação, em plantas de *Craterostigma plantagineum*, sugeriu a hipótese de que as *transketolases* podem atuar na conversão de açúcares, fenômeno principal no processo de reidratação. Assim, para a efetiva conservação das sementes é necessária a compreensão dos aspectos fisiológicos, morfológicos, citológicos e moleculares durante a secagem e o armazenamento, já que nem todas as sementes são tolerantes à dessecação.

Melanoxylon brauna (braúna), pertencente à família Leguminosae-Caesalpinioideae, é nativa do Brasil, encontrada principalmente nas regiões Sul da Bahia, de São Paulo e Minas Gerais, na floresta pluvial atlântica. A espécie alcança de 15 a 25 m de altura, e seu fruto é um legume deiscente que contém várias sementes envoltas por uma estrutura membranácea, o que possibilita sua dispersão pelo vento. Sua época de frutificação compreende o período de setembro a outubro

(BARROSO et al., 1999; LORENZI, 1992). Entre as madeiras brasileiras, a sua é conhecida como uma das mais duras e incorruptíveis, sendo empregadas em obras externas e hidráulicas, para moirões, postes, dormentes, pontes, na construção civil e na confecção de instrumentos musicais. Atualmente, encontra-se, segundo a Portaria IBAMA 37/92, na Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção, na categoria vulnerável (IBAMA, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a expressão do ciclo celular do eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ou não à secagem artificial ao longo da embebição e caracterizar parcialmente a presença de alguns supostos genes envolvidos com desenvolvimento, maturação, proteção, estresse osmótico e tolerância à dessecação.

2.2. Os objetivos específicos

- Quantificar, pelo teste de germinação, a tolerância das sementes de *Melanoxylon brauna* à secagem rápida em estufas submetidas a diferentes tempos e temperaturas.
- Avaliar a ploidia de DNA por citometria de fluxo das sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ou não à secagem rápida em estufa na temperatura de 50 °C por 24 h ao longo da embebição.
- Caracterizar parcialmente alguns genes expressos no eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: Sementes de *Melanoxylon brauna* foram obtidas dos frutos de quatro árvores-matriz, localizadas em uma área de pastagem, no Estado de Minas Gerais, no Município de Leopoldina, onde o clima é classificado como tropical úmido (Aw), com inverno seco e verão chuvoso e temperatura média anual de 21°C (KÖPPEN, 1948). Os frutos foram coletados em setembro de 2008 e transportados para o Laboratório de Análises de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil). Após secagem à temperatura ambiente para a sua completa deiscência, as sementes foram selecionadas manualmente – eliminando-se aquelas imaturas, deterioradas ou danificadas – e posteriormente armazenadas em saco plástico colocado dentro de tubos de papelão na câmara fria (60% UR a 5 °C).

Determinação do teor de água: Foi realizada pelo método de estufa, à temperatura de 105°C ± (3 °C) por 24 h (BRASIL, 1992), utilizando-se três repetições de 20 sementes.

Teste de germinação: As sementes foram desinfestadas com Captan (7%, v/v) durante 5 min e distribuídas em placas de Petri; revestidas com duas folhas de papel umedecidas com água e colocadas em câmara de germinação (TE-401 Tecnal), na temperatura de 25 °C e luz constante (quatro lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, 20 W). A germinação foi acompanhada diariamente e a protrusão radicular, definida como critério para a germinação. Foram utilizados cinco repetições de 20 sementes.

Curva de embebição: As sementes foram embebidas em água destilada, nas mesmas condições do experimento de germinação descrito anteriormente. As pesagens foram realizadas com o auxílio de balança analítica a cada 6 h de embebição, durante as primeiras 24 h, a cada 12 h, no período compreendido entre 24 e 96 h e, a partir daí, a cada 24 h. Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes.

Secagem em estufa: Sementes de *Melanoxylon brauna* foram retiradas aleatoriamente do lote original e submetidas à secagem em estufa de circulação e renovação de ar (TE-394/2), nas temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80 °C por 24, 48 e 72 h e, em seguida, submetidas ao teste de germinação, como descrito anteriormente.

Avaliação da ploidia de DNA por citometria de fluxo: Com base nos resultados da porcentagem de germinação final em cada temperatura, as sementes de *Melanoxylon brauna* foram secas na temperatura de 50 °C por 24 h e submetidas aos tratamentos, conforme Tabela 1. Como controle foram utilizadas sementes mantidas a 25 °C por 96, 132 e 168 h. Para a análise do percentual de núcleos com ploidia de DNA (2x, 4x, 8x etc.) dentro do ciclo celular, os eixos embrionários foram removidos manualmente com o auxílio de um alicate, em cada tratamento. Em seguida, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em microtubos, devidamente identificados, até a data das análises. As amostras foram levadas para o Laboratório de Citogenética e Citometria de Plantas do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, para o preparo das suspensões de núcleos intactos, de acordo com a metodologia proposta por Carvalho et al. (2005), e para posterior análise no citômetro de fluxo Partec PAS II/III (Partec GmbH, Munster, Germany). Para análise do núcleo corado com DAPI, foi usada uma lâmpada de mercúrio de alta pressão (HBO-100 W) com filtros KG 1, BG 38 e GG 435. Cada suspensão nuclear foi processada no citômetro com pelo menos 5.000 núcleos. As amostras apresentaram coeficientes de variação menores que 5%. Cada tratamento consistiu em três repetições com três triplicatas.

Tabela 1 – Tratamentos aplicados à análise de citometria de fluxo, a partir do eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna*

Tratamentos	Amostra
1	Sementes mantidas a 25 °C por 96 h (Controle)
2	Sementes embebidas a 25 °C por 96 h
3	Sementes secas a 50 °C por 24 h e mantidas a 25 °C por 96 h
4	Sementes secas a 50 °C por 24 h e embebidas a 25 °C por 96 h
5	Sementes mantidas a 25 °C por 132 h (Controle)
6	Sementes secas a 50 °C por 24 h e mantidas a 25 °C por 132 h
7	Sementes secas a 50 °C por 24 h e embebidas a 25 °C por 132 h
8	Sementes mantidas a 25 °C por 168 h (Controle)
9	Sementes secas a 50 °C por 24 horas e mantidas a 25 °C por 168 h
10	Sementes secas a 50 °C por 24 h e embebidas a 25 °C por 168 h

Primers degenerados: As sequências dos 20 *primers* foram fornecidas pelo grupo de pesquisa em sementes florestais da Universidade Federal de Lavras, sendo esses correspondentes a genes envolvidos com o desenvolvimento, maturação, proteção, estresse osmótico e tolerância à dessecação em sementes ou em plantas (Tabela 2). Os *primers* foram desenhados com o auxílio do software GeneFisher (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/submission.html>) a partir de sequências disponíveis no banco do GenBank/NCBI, National Center for Biotechnology Information, para *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Medicago sativa*, *Medicago truncatula*, *Mimosa pudica*, *Populus trichocarpa* e *Zea mays*, entre outras espécies.

Tabela 2 – Genes selecionados para o desenho dos primers degenerados

Sigla do gene	Nome do gene	Função
<i>ABI3</i>	<i>Abscisic acid insensitive 3</i>	Desenvolvimento
<i>ABI5</i>	<i>Abscisic acid insensitive 5</i>	Desenvolvimento
<i>Ald. Dehyd</i>	<i>Aldehyde dehydrogenase</i>	Maturação
<i>BADH</i>	<i>Betaine aldehyde dehydrogenase</i>	Estresse osmótico
<i>CAT1</i>	<i>Catalase 1</i>	Antioxidante
<i>CSD2</i>	<i>Cu/Zn superoxide dismutase</i>	Antioxidante
<i>ELIP</i>	<i>Early light induced protein</i>	Fotoprotetora
<i>EM6</i>	<i>Early methionine 6</i>	Tolerância à dessecação
<i>(Mn) SOD</i>	<i>(Mn) superoxide dismutase</i>	Tolerância à dessecação
<i>LEC1</i>	<i>Leafy cotyledon1</i>	Desenvolvimento
<i>PER1</i>	<i>1- Cys peroxiredoxin</i>	Tolerância à dessecação
<i>PKABA</i>	<i>Abscisic acid induced Kinase</i>	Tolerância à dessecação
<i>PM25</i>	<i>Maturation protein</i>	Maturação
<i>Prx</i>	<i>Peroxiredoxins</i>	Tolerância à dessecação
<i>RD28</i>	<i>Responsive to desiccation</i>	Estresse osmótico
<i>SC514</i>	<i>Lipoxygenase</i>	Antioxidante
<i>sHSP</i>	<i>Small heat-shock protein</i>	Tolerância à dessecação
<i>SPS1</i>	<i>Sucrose phosphate syntase</i>	Tolerância à dessecação
<i>Transk</i>	<i>Transketolase</i>	Tolerância à dessecação

Extração do RNA total: O RNA total foi extraído a partir de eixos embrionários de sementes de *Melanoxylon brauna*, que foram macerados em nitrogênio líquido. Foram transferidos 100 mg de material de cada amostra para microtubo de 1,5 mL. Em cada tubo, foram adicionados 500 µL do reagente Kit PureLink™ PlantRNA, em que permaneceram incubados à temperatura ambiente durante 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 120 seg a 12. 000 rpm, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo livre de RNase. Para 250µL da alíquota da amostra, foram adicionados 50 µL de NaCl 5 M e 1,5 µL de clorofórmio, e novamente as amostras foram centrifugadas por

10 min a 12.000 rpm. Foi adicionada ao sobrenadante a mesma proporção de álcool isopropanol, deixando-se por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida foi feita nova centrifugação por 10 min a 12.000 rpm, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, adicionando-se 1,0 mL de etanol 75% e centrifugado por 60 seg. Novamente o sobrenadante foi descartado, e o microtubo permaneceu aberto por 10 min, para a secagem do precipitado. Este foi ressuscitado em 30 µL com água livre de RNase e armazenado a -70 °C. A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose contendo formaldeído (FA) 1,2% (1,2 g de agarose, 10 mL de 10X FA tampão gel, 100 mL de água livre de RNase, 9 µL de formaldeído e 2 µL de brometo de etídio). As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese durante 60 min a 65 V e as imagens, registradas através de um aparelho de fotodocumentação, El Logic 200 Imaging system. O RNA foi quantificado em Nanodrop (Spectrophotometer ND 1000).

Confecção do cDNA: A síntese do cDNA foi realizada usando-se o Kit *Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR*, conforme instruções do fabricante (Invitrogen)

Validação dos primers degenerados: Para verificar a especificidade de amplificação, utilizou-se DNA genômico, extraído de folhas de *Arabidopsis thaliana*, para a reação da polimerase em cadeia (PCR). Foram utilizados 1 µL de DNA (15 ng), 2 µL de tampão de reação de PCR (10X), 0,5 µL do *primer* reverse (10 µM), 0,5 µL do *primer* forward (10 µM), 0,6 µL de dNTP (2,5 mM), 0,9 µL de enzima Taq polimerase e 14,5 µL de água ultrapura. A reação foi programada para 94 °C por 2 min, com ciclo de 94 °C por 30 seg, para que ocorresse a desnaturação do DNA, 50 °C por 2 min para o anelamento dos *primers*, 72 °C por 1 h e 30 minutos, para extensão dos iniciadores pela Taq polimerase, sendo este ciclo repetido 40 vezes e à temperatura de 72 °C por 5 min. Foram aplicados 20 µL da reação em cada canaleta do gel de agarose 1% (1,0 g de agarose, 100 mL de tampão TAE) e submetidas à eletroforese durante 20 min a 70 V. Após o término da corrida, adicionaram-se 2 µL de brometo de etídio sob agitação por 20 min. O gel foi visualizado sob luz UV, a identificação da amplificação de interesse foi feita através da comparação do produto da PCR com o marcador de peso molecular e, em seguida, as imagens foram registradas.

Reação da cadeia da polimerase com cDNA de *Melanoxylon brauna*: Os oligonucleotídeos degenerados referentes aos genes selecionados (*CAT1*, *PM25*,

SPS1, *Transk*, *ABI5*, *PER1*, *RD28*, *sHSP*, *LEC1* e *ABI3*), que apresentaram amplificação positiva com a utilização do DNA de *Arabidopsis thaliana*, foram selecionados para a amplificação a partir do cDNA. Para a reação, foram utilizados 2 μL de cDNA, 2 μL de tampão de reação de PCR (10X), 0,5 μL do *primer reverse* (100 μM), 0,5 μL do *primer forward* (10 μM), 0,6 μL de dNTP (2,5 mM), 0,9 μL de enzima Taq polimerase e 13,5 μL de água ultrapura. A reação foi programada para 94 °C por 2 min, com ciclo de 94 °C por 30 seg para que ocorresse a desnaturação do DNA, 52 °C por 30 seg para o anelamento dos *primers*, 72 °C por 1 min para extensão dos iniciadores pela Taq polimerase, sendo este ciclo repetido 40 vezes e à temperatura de 72 °C por 5 min. Foram aplicados 10 μL da reação em cada canaleta do gel de agarose 1%. Os procedimentos seguintes foram os mesmos anteriormente citados.

Clonagem dos fragmentos amplificados a partir do cDNA: O produto de PCR das sequências que foram amplificadas, referente aos genes anteriormente citados, foram clonados utilizando-se o vetor pGEM®-TEasy (Promega, USA). Foram utilizados na reação de ligação 5 μL do tampão 2X ligação rápida, 1 μL de vetor pGEM®-TEasy (50 ng), 3 μL do produto do PCR e 1 μL do T₄ DNA ligase. A reação foi incubada a 4 °C *overnight*. Em 50 μL de células competentes (TOPO® Shotgun Subcloning) foram adicionados 4 μL da reação de ligação que foram a seguir incubadas por 30 min no gelo. Em seguida, as amostras foram submetidas ao choque térmico na temperatura de 42 °C por 60 seg e 2 min no gelo. Foram adicionados 500 μL de meio LB e submetidos à agitação (Forma Orbital Shaker) a 180 rpm por 1 h, à temperatura de 37 °C. Foram aplicados 150 μL da transformação em placas de Petri com meio LB contendo ampicilina (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), IPTG (0,1 mM) e X-Gal (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Foram selecionadas colônias brancas isoladas para confirmação das clonagens por reação de PCR, empregando-se as mesmas condições de PCR utilizadas na amplificação a partir do cDNA. Para a extração do DNA plasmidial dos clones positivos foi utilizado o Kit-NucleoSpin®Plasmid (Promega,USA). Foram seguidas as instruções recomendadas pelo fabricante.

Sequenciamento: Os produtos da PCR dos genes *CAT1*, *PM25*, *SPS1*, *Transk* e *ABI5* foram selecionados para o sequenciamento gênico que foi realizado pelo Laboratório de Genômica do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, da Universidade Federal de Viçosa, no sequenciador MEGABACE 1000.

Análises BLAST e alinhamento: As sequências obtidas do sequenciamento para os genes *CAT1*, *PM25*, *SPS1*, *Transk* e *ABI5* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados internacional do GenBank/NCBI, National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), utilizando-se o algoritmo *BlastN*. As sequências obtidas no NCBI que apresentaram similaridade com a sequência de nucleotídeos dos genes *CAT1*, *PM25*, *SPS1*, *Transk* e *ABI5* foram submetidas ao alinhamento realizado com o programa CAP3 (<http://deepc2.psi.iastate.edu/aat/cap/cap.htm>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A embebição das sementes de *Melanoxylon brauna* seguiu o padrão trifásico proposto por Bewley e Black (1994) (Figura 1). Durante a fase I, verificou-se rápida embebição de água pela semente até atingir a fase II, em torno de 36 h de embebição. Na fase II, as sementes permaneceram sem aumento significativo de peso fresco, culminando em um aumento repentino no peso fresco a partir de 96 h de embebição, como consequência da germinação.

A fase I é caracterizada, entre outras atividades, pela ativação das enzimas, reparação de DNA e mitocôndrias e pela síntese de proteínas a partir de mRNAs formados durante o desenvolvimento da semente (COPERLAND; MCDONALD, 1999; BEWLEY, 1997).

A fase III culmina com o aumento da massa fresca juntamente com a protrusão radicular, que primeiramente ocorre por alongação celular, após ter tido seu ciclo celular ativado com a embebição, e somente após o rompimento do tegumento é que começa haver divisões mitóticas (COPERLAND; MCDONALD, 1999). Nesta fase ocorrem a síntese de DNA e o aumento da atividade respiratória (BEWLEY, 1997).

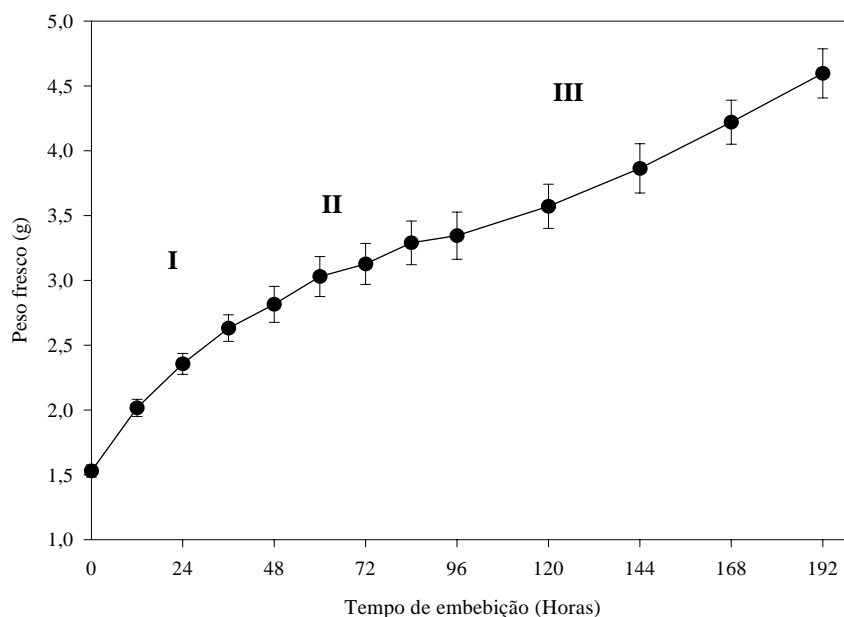


Figura 1 – Curva de embebição de sementes de *Melanoxylon brauna*. Cada ponto no gráfico representa a média de cinco repetições de 20 sementes; as barras representam o desvio-padrão.

A germinação das sementes de *Melanoxylon brauna* retiradas do lote original e embebidas em água, sob luz constante e temperatura de 25 °C (controle), teve início com a protrusão da radícula, a partir de 72 h de embebição. No período de 96 a 132 h de embebição, verificou-se aumento na germinação de 20% para 70%, que alcançou 95% ao final de 168 h (Figura 2). As sementes que foram expostas ao tratamento de secagem em diferentes tempos e temperaturas apresentaram redução gradativa na porcentagem de germinação (Figura 2). A temperatura de secagem, a partir de 40 °C durante 24 h (Figura 2A), já foi suficiente para provocar alterações na qualidade fisiológica das sementes. A elevação da temperatura de secagem acelerou a velocidade de secagem e, conseqüentemente, a perda da qualidade das sementes. Segundo White et al. (1980), Carvalho e Nakagawa (2000) e Baker et al. (1991), a intensidade dos danos imediatos da secagem em temperaturas mais elevadas varia de acordo com a espécie e depende da interação entre a temperatura do ar da secagem e o grau da umidade inicial das sementes, entre outros fatores. De acordo com Berjak e Pammenter (2003), as duas principais causas da perda de viabilidade das sementes pela desidratação são a ocorrência de um metabolismo desequilibrado durante a desidratação e o dano causado pela desidratação, visto que a água é essencial para a integridade de estruturas intracelulares.

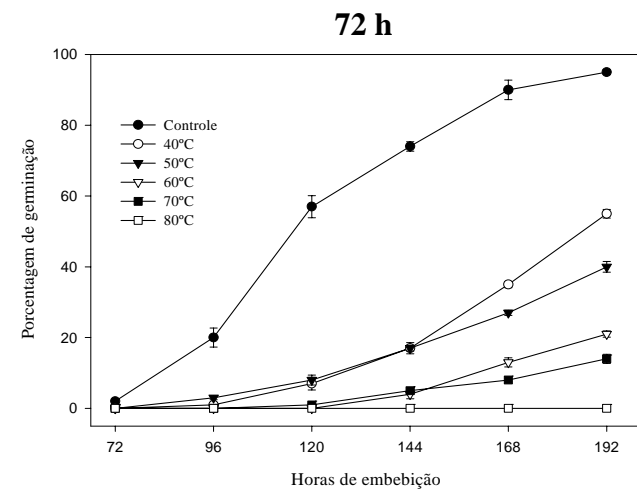
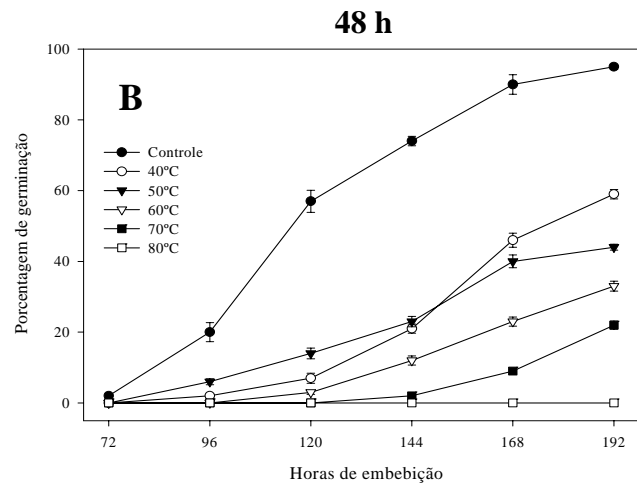
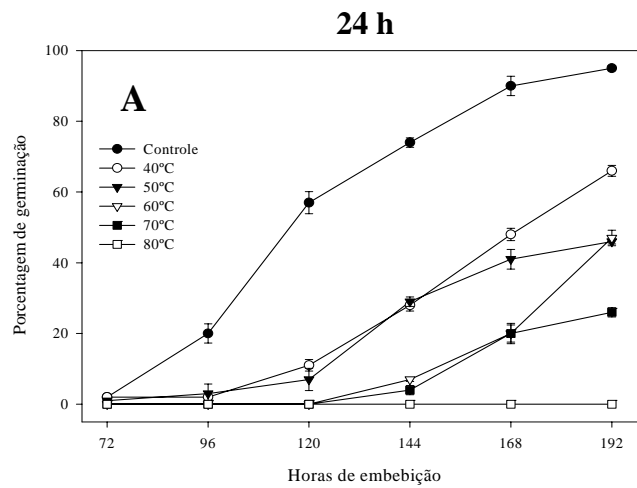


Figura 2 – Germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas à secagem em estufa por 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas, nas temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Controle (sementes secas à temperatura ambiente). Cada ponto é a média de cinco repetições de 20 sementes. Barra representa o desvio-padrão da média.

As sementes foram dispersas com reduzido teor de água (aproximadamente 13%), e a perda de água acompanhou o aumento da temperatura e o tempo de secagem (Figura 3). A perda de água foi mais rápida nas primeiras 24 h em todas as temperaturas de secagem, com predominância das temperaturas mais altas.

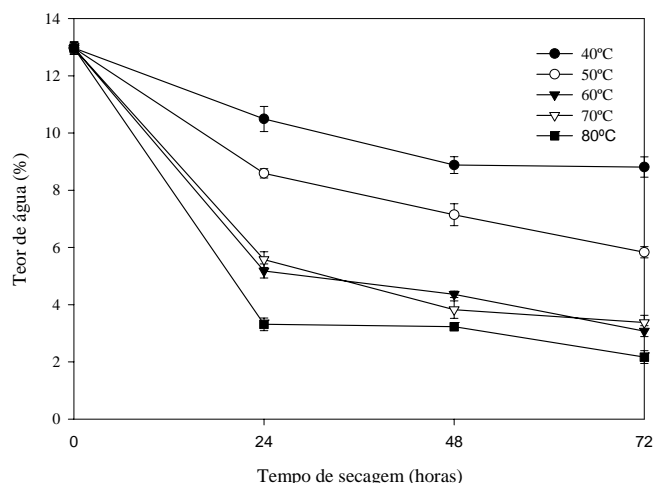


Figura 3 – Mudanças nos teores de água (%) das sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas à secagem em estufa no período de 24, 48 e 72 h, nas temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Cada ponto é a média de cinco repetições de 20 sementes. Barra representa o desvio-padrão da média.

A redução no teor de água para 10,5% e 7%, respectivamente nas temperaturas de 40 °C e 50 °C, no período de 24 h, já foi suficiente para diminuir a qualidade fisiológica das sementes. Entretanto, aquelas que apresentaram o teor de água abaixo de 6%, depois de submetidas à secagem, foram as que tiveram germinação final abaixo de 47%. Cabe ressaltar que o teor de água, em torno de 3,5%, das sementes que foram secas nas temperaturas de 60 e 70 °C, no período de 72 h, não foi suficiente para a perda da viabilidade total das sementes. A secagem na temperatura de 80 °C ocasionou a morte das sementes quando atingiram 2% do teor de água (Figura 2). Tal tolerância à dessecação, presente nas sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas à secagem nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C, não pode ser atribuída a um simples mecanismo de proteção. Ao contrário disso, parece ser um fenômeno multifatorial, em que cada componente é igualmente crítico,

agindo em sinergismo e controlado pelo genoma (LEPRINCE et al., 1993). Há evidências de que a desidratação pode ocasionar a perda da capacidade das células de sintetizar DNA, RNA, enzimas e proteínas durante a reidratação (LEPRINCE et al., 1990). Além disso, os níveis críticos de umidade podem afetar a atividade metabólica e causar danos aos tecidos sensíveis à desidratação (VETUCCI; FERRANT, 1995; WALTERS et al., 2002a).

4.1. Expressão do ciclo celular do eixo embrionário

A avaliação da ploidia de DNA por citometria de fluxo dos eixos embrionários das sementes de *Melanoxylon brauna*, as quais não foram submetidas à secagem artificial (controles), indicaram a existência de núcleos 2C, 4C e 8C (Figura 4A). Entretanto, a maioria dos núcleos avaliados apresentou o percentual de núcleos com ploidia de DNA 2C (95%), indicando que a maioria das células se encontrava na fase G1 do ciclo celular. A retenção e o acúmulo de células na fase G1 estão relacionados com a acentuada queda no conteúdo de água, decorrente da secagem, que ocorre durante a maturação em sementes ortodoxas (DELTOUR, 1985).

As sementes submetidas à secagem rápida em estufa a 50 °C por 24 h e mantidas a 25 °C por 96 h e as secas nessas mesmas condições e embebidas a 25 °C por 96 h (Tratamentos 3 e 4) também exibiram a presença de núcleos 2C, 4C e 8C (Figura 4CD) e não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no percentual de núcleos com ploidia de DNA 2C, 4C e 8C em relação às sementes que não foram submetidas à secagem em estufa (Figura 5). Esses resultados demonstram que não houve alterações na ploidia de DNA dos eixos embrionários de sementes de *Melanoxylon brauna* entre aquelas submetidas a secagens natural e artificial. Isso indica que a perda na capacidade germinativa das sementes que sofreram redução no grau de umidade de 13% para 9% na secagem rápida em estufa a 50 °C por 24 h não está relacionada com a atividade do ciclo celular.

As sementes de *Melanoxylon brauna* mantidas a 25 °C por 132 e 168 h (Tratamentos 5 e 8), aquelas submetidas à secagem rápida em estufa a 50 °C por 24 h e mantidas a 25 °C por 132 e 168 h (Tratamentos 6 e 9) e as que foram secas a 50 °C por 24 h e mantidas a 25 °C por 132 e 168 h (Tratamentos 7 e 10) também exibiram a presença de núcleos 2C, 4C e 8C nos eixos embrionários; a maioria dos núcleos apresentou o percentual de núcleos com ploidia de DNA 2C (Figuras 6 e 7).

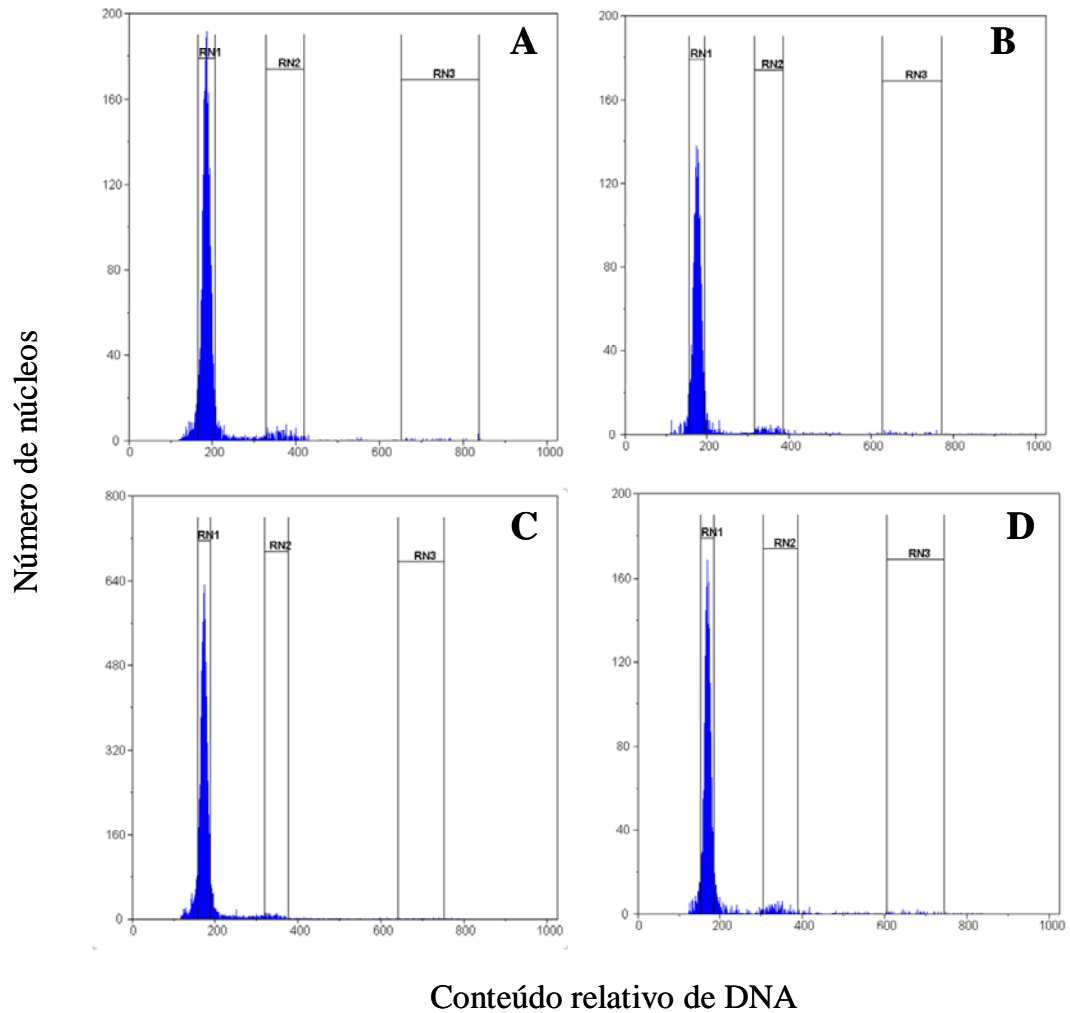


Figura 4 – Histogramas de análise de citometria de fluxo de núcleos do eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna*. (A) Controle; (B) Sementes embebidas a 25 °C por 96 h; (C) Sementes secas a 50 °C por 24 h e mantidas a 25 °C por 96 h; (D) Sementes secas a 50 °C por 24 h e embebidas a 25 °C por 96 h. RN1 = (2C); RN2 = (4C); e RN3 = (8C).

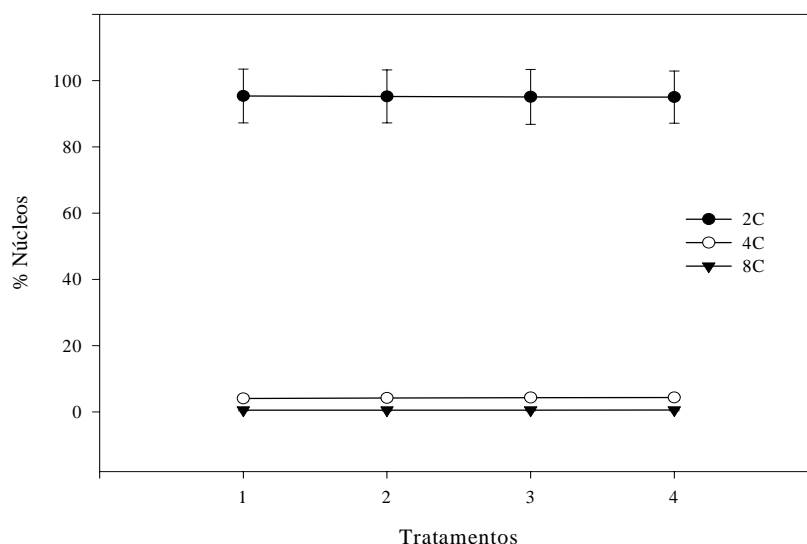


Figura 5 – Médias da porcentagem de núcleos 2C, 4C e 8C. 1- Controle. 2- Sementes embebidas a 25 °C por 96 h. 3- Sementes secas a 50 °C por 24 h e mantidas a 25 °C por 96 h. 4- Sementes secas a 50 °C por 24 h e embebidas a 25 °C por 96 h. As barras representam o desvio-padrão. As médias entre os tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

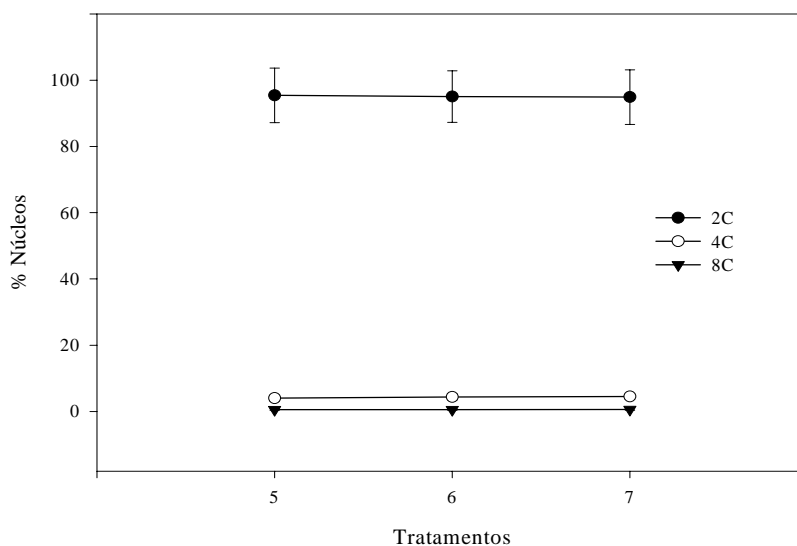


Figura 6 – Médias da porcentagem de núcleos 2C, 4C e 8C. 5- Controle. 6- Sementes secas a 50 °C por 24 h e mantidas a 25 °C por 132 h. 7- Sementes secas a 50 °C por 24 h e embebidas a 25 °C por 132 h. As médias entre os tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

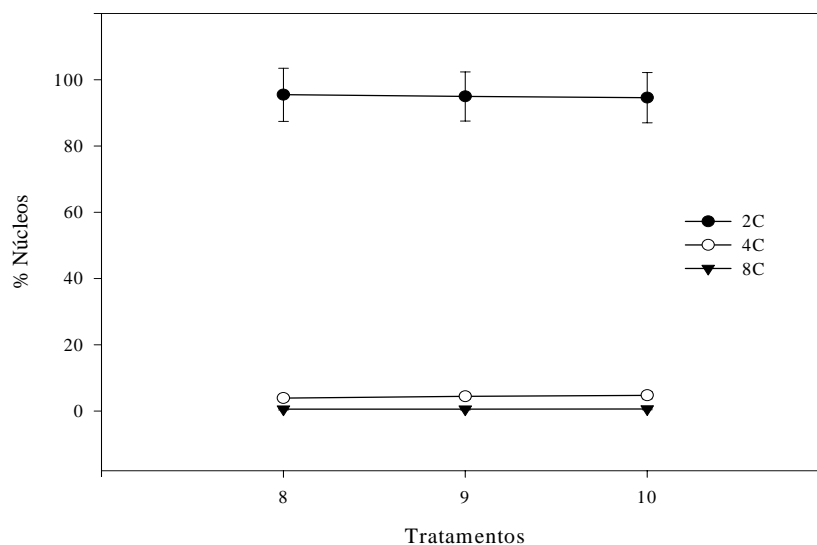


Figura 7 – Médias da porcentagem de núcleos 2C, 4C e 8C. 8- Controle. 9- Sementes secas a 50 °C por 24 h e mantidas a 25 °C por 168 h. 10- Sementes secas a 50 °C por 24 h e embebidas a 25 °C por 168 h. As médias entre os tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A presença de alto percentual de núcleos 2C em sementes maduras e secas tem sido observada no início da germinação para *Acer saccharinum* (KOZEKO; TROYAN, 2000), *Arabidopsis thaliana* (RAZ et al., 2001), *Coffea arabica* (SILVA et al., 2008), *Inga vera* (FARIA et al., 2004) e *Leucaena leucocephala* (OLIVEIRA, 2009), entre outras espécies.

4.2. Caracterização parcial de genes expressos no eixo embrionário

A extração do RNA total a partir de eixos embrionários de sementes de *Melanoxylon brauna*, utilizando-se o reagente Kit PureLink™ PlantRNA, mostrou-se eficiente para a obtenção de RNAs de qualidade, adequados para posterior síntese de cDNA (Figura 8).

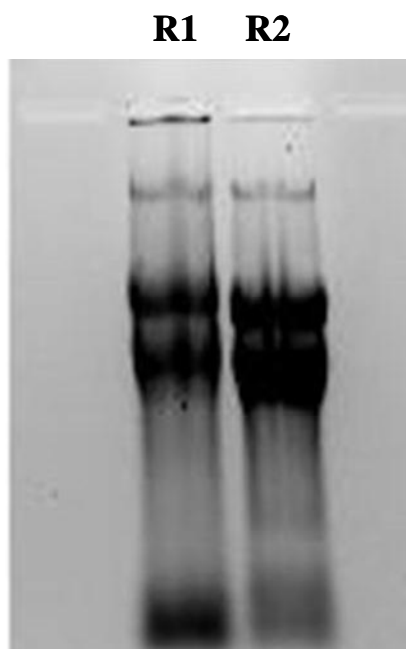


Figura 8 – Análise da qualidade do RNA total extraído a partir de embriões de sementes de *Melanoxylon brauna* em gel de agarose formaldeído 1,2%. R2 = amostra diluída 2X em relação a R1.

Dos 20 pares de oligonucleotídeos testados com DNA extraído de folhas de *Arabidopsis thaliana*, foram selecionados cinco relacionados com os genes *CAT1*, *SPS1*, *ABI5*, *Transk* e *PM25* para amplificação de sequências homólogas a partir do cDNA de *Melanoxylon brauna*. A escolha dos pares de oligonucleotídeos foi baseada na correspondência do tamanho de fragmento amplificado com o tamanho predito com base na sequência de *Arabidopsis* utilizada para o desenho dos oligonucleotídeos (Figura 9).

Como pode ser observado na Figura 10, através da técnica da reação da cadeia da polimerase foi possível verificar produtos da amplificação gerados a partir da utilização dos cinco pares de *primers* selecionados e o cDNA de *Melanoxylon brauna*.

Em relação aos produtos gerados a partir dessa análise, pôde-se observar mais de um fragmento nos pares de oligonucleotídeos avaliados.

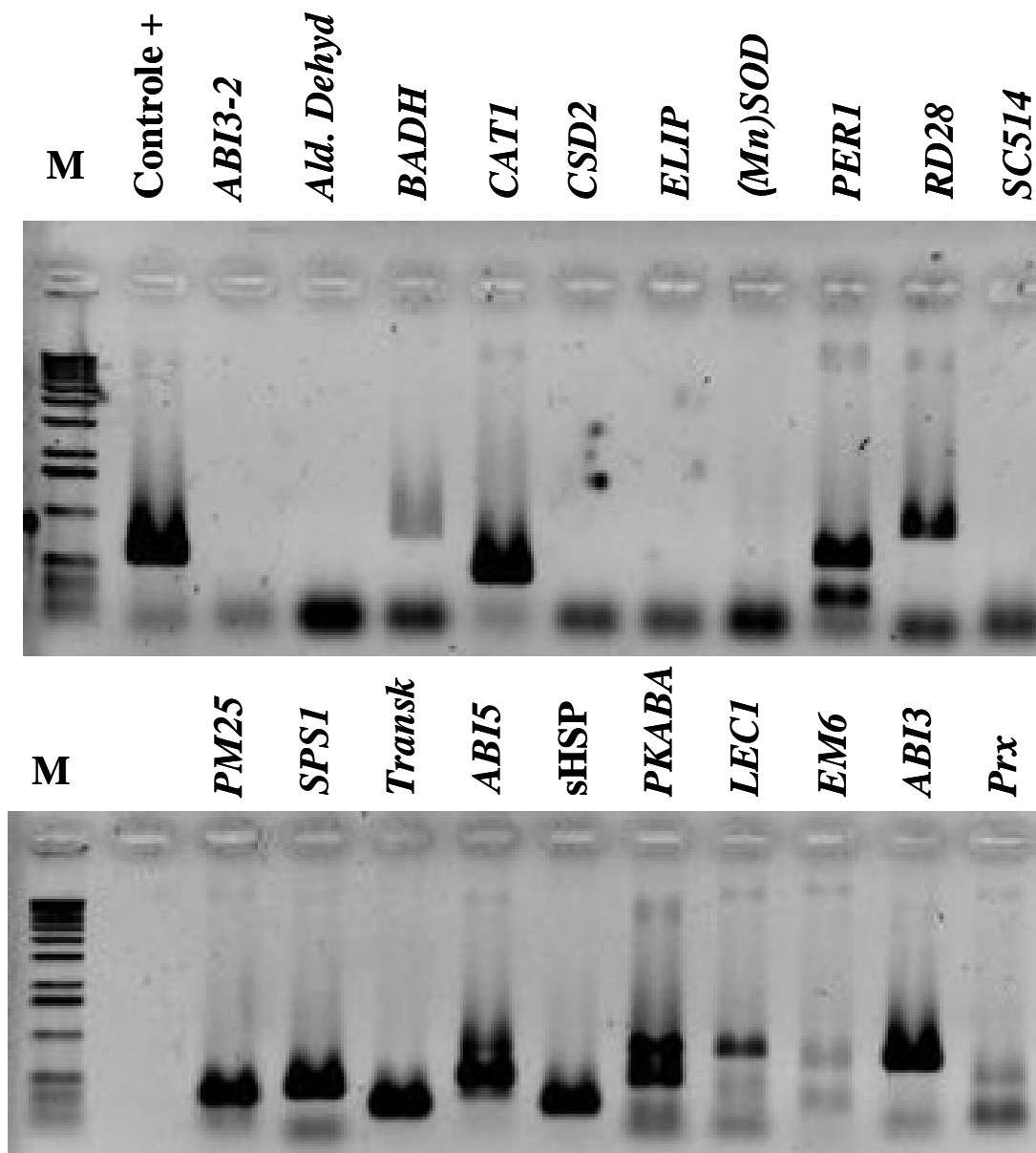


Figura 9 – Análise eletroforética em gel de agarose 1% para validação da capacidade de amplificação dos pares de oligonucleotídeos degenerados utilizando DNA extraído de folhas de *Arabidopsis thaliana*. M: 1kb Plus DNA Ladder; Controle +: *primer* específico para *Arabidopsis thaliana*. Na parte superior das canaletas, encontram-se as siglas referentes aos genes utilizados para a confecção dos *primers*.

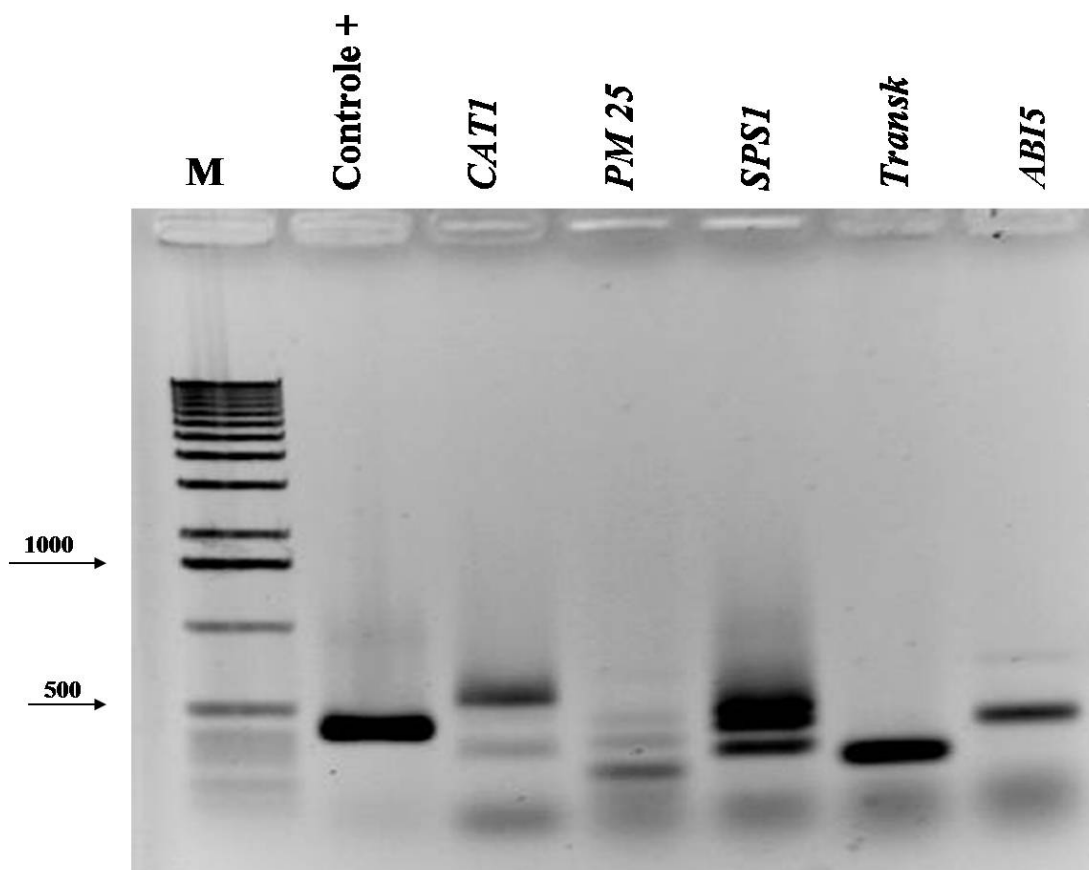


Figura 10 – Análise eletroforética em gel de agarose 1% para validação da capacidade de amplificação de *primers* degenerados utilizando cDNA de *Melanoxylon brauna*. M: 1kb Plus DNA Ladder; Controle +: DNA de *Arabidopsis thaliana* e *primer* referente ao gene *CAT1*. Na parte superior das canaletas, encontram-se as siglas referentes aos genes utilizados para a confecção dos *primers*.

Após a confirmação da clonagem de fragmentos obtidos a partir da amplificação utilizando *primers* para os genes *CAT1*, *SPS1*, *ABI5*, *Transk* e *PM25* e cDNA de *Melanoxylon brauna* (Figura 11), foram submetidos ao sequenciamento os clones referentes aos genes *CAT1* (amostras 1 e 5), *SPS1* (amostras 3, 4 e 5), *ABI5* (amostras 8 e 9), *Transk* (amostra 4) e *PM25* (amostras 4 e 5), que apresentaram fragmentos amplificados de tamanho igual ao obtido a partir da amplificação do cDNA.

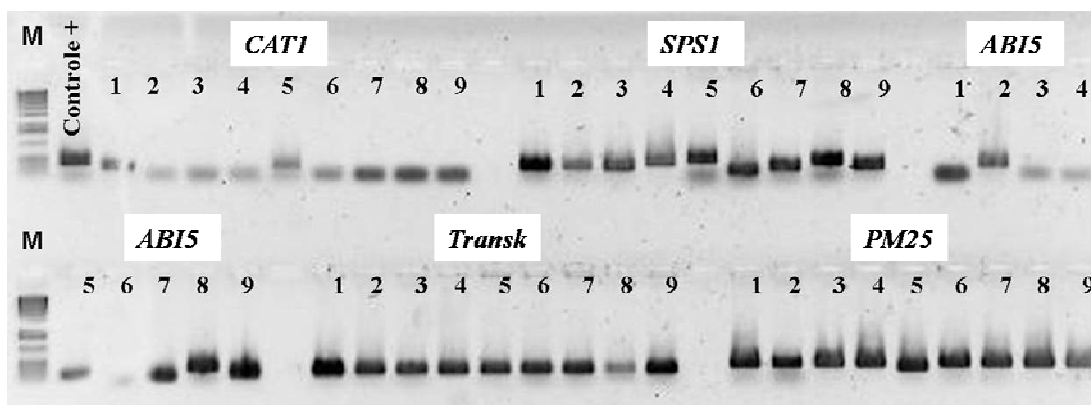


Figura 11 – Análise eletroforética do produto de PCR de colônias para a confirmação da clonagem de fragmentos obtidos a partir da amplificação de cDNA de eixo embrionário de *Melanoxylon brauna* utilizando pares de oligonucleotídeos degenerados desenhados a partir de sequências de genes de *Arabidopsis* expressos em sementes e relacionados com o desenvolvimento, maturação, proteção e tolerância à dessecação. M: 1kb Plus DNA Ladder; Controle +: DNA de *Arabidopsis thaliana* e primer referente ao gene *CAT1*. Na 1 a 9: DNA bactérias transformadas e primers dos genes selecionados. Na parte superior das canaletas, encontram-se as siglas referentes aos genes utilizados para a confecção dos primers.

Verificou-se a similaridade das sequências obtidas com as sequências dos genes homólogos caracterizados em outras espécies de plantas, confirmando a amplificação e clonagem das sequências dos genes as sequências de nucleotídeos obtidas a partir das amostras 5 para o gene *CAT1*, 3 e 5 para o gene *SPS1*, 4 para o gene *Transk* e 8 para o gene *PM25*, utilizados para a confecção dos primers (Tabela 3).

Com as sequências de nucleotídeos obtidas desses genes, pares de oligonucleotídeos específicos poderão ser futuramente desenhados para posteriores estudos de expressão gênica visando correlacionar a expressão dos genes selecionados com a perda da capacidade germinativa de sementes de *Melanoxylon brauna*.

Tabela 3 – Análise da similaridade das sequências clonadas correspondentes aos genes *CAT1*, *SPS1*, *PM25* e *Transk* com sequências depositadas em bancos de dados do NCBI. N°. de acesso: identificação da sequência de nucleotídeo no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) das espécies. Tamanho: número de nucleotídeos. *e-value*: indicativo da probabilidade de o alinhamento das sequências ocorrer ao acaso. Identidade: porcentagem de identidade com a sequência depositada

Genes	Espécies	N°. de Acesso (NCBI)	Tamanho (pb)	e-value	Identidade (%)
<i>CAT1-5</i>	<i>G. Max</i>	AF035252.1	1733	2e-110	88
<i>SPS1-3</i>	<i>Medicago</i>	AF322116.2	3579	2e-104	87
	<i>V.faba</i>	Z56278.1	3419	8e-104	87
	<i>H. lupulus</i>	EF624248.1	963	3e-103	87
<i>SPS1-5</i>	<i>V.faba</i>	Z56278.1	3419	1e-91	88
<i>PM25-8</i>	<i>A. thaliana</i>	D64139.1	1080	8e-79	100
	<i>A. thaliana</i>	NM_113148.1	998	1e-44	83
<i>Transk-4</i>	<i>G. Max</i>	AK244017.1	1224	9e-83	87

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados, chegou-se às seguintes conclusões:

- As sementes de *Melanoxylon brauna* que foram submetidas à secagem em estufa, em diferentes tempos e temperaturas, apresentaram redução gradativa na porcentagem de germinação.
- Os eixos embrionários das sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ou não à secagem artificial em estufa apresentaram núcleos 2C, 4C e 8C.
- A maioria dos núcleos avaliados apresentou o percentual de núcleos com ploidia de DNA 2C (95%), indicando que a maioria das células se encontrava na fase G1 do ciclo celular.
- As sementes submetidas à secagem rápida em estufa também exibiram a presença de núcleos 2C, 4C e 8C e não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no percentual de núcleos com ploidia de DNA 2C, 4C e 8C em relação às sementes que não foram submetidas à secagem em estufa.
- Foram caracterizados parcialmente os genes *CAT1*, *SPS1*, *ABI5*, *Transk* e *PM25* de *Melanoxylon brauna* expressos no eixo embrionário de sementes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à equipe do Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa (UFV), especialmente ao doutorando Gustavo Augusto Moreira Guimarães e ao mestrando Ricardo Roberto da Silva, pela disposição e pelos ensinamentos; também à equipe do Laboratório de Sementes da UFV e da Universidade Federal de Lavras, pela indispensável contribuição; ao pesquisador Marcos Deon Vilela de Resende, pela ajuda nas análises dos dados de Citometria; e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

6. REFERÊNCIAS

AALEN, R. B. Peroxiredoxin antioxidants in seed physiology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, p. 285-295, 1999.

ALAMILLO, J.; ALMOGUERA, C.; BARTELS, D.; JORDANO, J. Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **Plant Molecular Biology**, Dodrecht, v. 29, p. 1093-1099, 1995.

ANDERBERG, R. J.; WALKER-SIMMONS, M. K. Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 89, p. 10183-10187, 1992.

BAKER, K. D.; PAULSEN, M. R.; ZWEDEN, J. V. Hybrid and rying rate effects on seed cornviability. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 34, n. 2, p. 499-506, mar./apr. 1991.

BARROSO, M. B.; MARIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes** – Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa, MG: UFV, 1999.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Chapter 4: Orthodox and Recalcitrant Seeds. In: USDA Forest Service's/Reforestation, Nurseries; Genetics Resources. **Tropical tree seed manual**, 2003. p. 137-147.

BERNACCHIA, G.; SCHWALL, G.; LOTTSPEICH, F.; SALAMINI.; BARTELS, D. The transketolase gene family of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*: differential expression during the rehydration phase. **The EMBO Journal**, v.14, n. 3, p. 610-618, 1995.

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

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

BLACKMAN, S. A.; WETTAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 868-874, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: 1992.

BROWN, A. H. D.; HARDNER, C. M. Sampling the gene pools of Forest trees for *ex situ* conservation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Eds.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000. p.185-196.

CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; PRAÇA, M. M., ARAÚJO, F. S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L.: an important biofuel plant. **Plant Science**, Clare, v. 174, n. 6, p. 613-617, 2008.

CARVALHO, N. M ; NAKAGAWA. J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal, SP: Editora Funep, 2000.

COCA, M.; ALMOGUERA, C.; JORDANO, J. Expression of sunflower low molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. **Plant Molecular Biology**, Dodrecht, v. 25, p. 479-492, 1994.

COPERLAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology**. London: Kluwer Academic Publishers, 1999.

DAVIDE, A. C.; CARVALHO, L. R.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M. Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família Lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. **Cerne**, Lavras, v. 9, n.1, p. 29-35, 2003.

DELSENY, M.; BIES-ETHEVE, N.; CARLES, C.; HULL, G.; VICIENT, C.; RAYNAL, M.; GRELLET, F.; ASPART, L. Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein gene regulation during Arabidopsis seed maturation. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 158, p. 419-427, 2001.

DELTOUR, R. Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 75, n. 1, p. 43-83, 1985.

DEROCHER, A.; VIERLING, E. Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. **The Plant Journal**, Clare, v. 5, p. 93-102, 1994.

DOLEZEL, J.; MACAS, J.; LUCRETTI, S. Flow analysis and sorting of plant chromosomes – In: ROBINSON, J. P. et al. (Eds.). **Current Protocols in Cytometry**. New York: John Wiley & Sons, 1999. p. 531-5333.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

FARIA, J. M. R.; LAMMEREN, A. A. M. van; HILHORST, H. W. M. Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera* subsp. *affinis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, p.165-178, 2004.

HARADA, J. J. Role of Arabidopsis LEAFY COTYLEDON genes in seed development. **Journal of Physiology**, v. 158, p. 405-409, 2001

HASLEKAS, C.; STACY, R. A. P.; NYGAARD, V.; CULIANEZ-MACIA, F. A.; AALEN, R. B. The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, AtPer1, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. **Plant Molecular Biology**, Dodrecht, v. 36, n. 6, p. 833-845, 1998.

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

HUBER, S. C.; HUBER, J. L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 431-444, 1996.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Lista Oficial de Flora Ameaçada de extinção. **Portaria nº. 37-N**, de 3 de abril de 1992. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/patrimonio>>. Acesso em: 4 abr. 2009.

JETTON, R. M.; DVORAK, W. H.; WHITTIER, W.A. Ecological and genetic factors that define the natural distribution of *Carolina hemlock* in the southeastern United States and their role in situ conservation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, n. 8-9, p. 3212-3221, 2008.

JONES, H. D.; PETERS, N. C.; HOLDS WORTH, M. J. Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of the VIVIPAROUS 1 homologue in embryos of *Avena fatua*. **The Plant Journal**, Clare, v. 12, n. 4, p. 911-920, 1997.

KOËPPEN, W. **Climatologia**. Buenos Aires: Panamericana, 1948.

KOORNNEEF, M.; REULING, G.; KARSSSEN, C. M. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 61, p. 377-383, 1984.

KOZEKO, L. E.; TROYAN, V. M. The relationship between the mitotic activity and moisture content of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum* (L.) during maturation, post maturation drying and germination. **Seed Science Research**, v. 10, p. 225-232, 2000.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JACOBSEN, I.; NEI, N. **MEGA**: Molecular evolutionary genetics analysis. Aryzona: Pennsylvania and Aryzona Stade University, 2000. Version 2.0.

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

LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P. C.; ATHERTON, N. W.; HENDRY, G. A. F. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, Oxford, v.116, p. 573-580, 1990.

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

LI, B.; FOLEY, M. E. Genetic and molecular control of seed dormancy. **Trends in the Plant Science**, Oxford, v. 2, p. 384-389, 1997.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v. 2.

LOTTI, D. M.; BARBOSA, J. M.; ABUHAB, P. P.; SANTOS, M. R. O. Efeitos de tratamentos de secagem em estufa e em balança determinadora de umidade sobre a qualidade de sementes de *Chorisia speciosa* St. Hil (paineira). **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 5, n. 2, p.193, 1995.

MASETTO, T. E. **Restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis***. 2008. 82 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

MCCARTY, D. R. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 71-93, 1995.

MIYASAKI, J. M.; CÂNDIDO, J. F. Secagem de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* Vall/Don). **Seiva**, Viçosa, v. 39, n. 85, p. 12-17, 1978.

MOWLA, S. B.; THOMSON, J. A.; FARRANT, J. M.; MUNDREE, S. G. A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. **Planta**, Berlin, v. 215, p. 716-726, 2002.

NAKABAYASHI, K.; OKAMOTO, M.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y.; NAMBARA, E. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. **The Plant Journal**, Dodrecht, v. 41, p. 697-709, 2005.

OLIVEIRA, J. M. de. **Tolerância à dessecação em sementes de *Leucaena leucocephala* durante a germinação.** 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2009.

ORENDI, G.; ZIMMERMANN, P.; BAAR, C.; ZENTGRAF, U. Loss of stress-induced expression of catalase 3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress. **Plant Science**, Clare, v. 161, p. 301-314, 2001.

PARCY, F.; VALON, C.; RAYNAL, M.; GAUBIER-COMELLA, P.; DELSENY, M.; GIRAUDAT, J. Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 1567-1582, 1994.

PINTO, M. M.; SADER, R.; BARBOSA, J. M. Influência do tempo de secagem e do armazenamento sobre a viabilidade das sementes de ipê-rosa. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 37-47, 1986.

PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E. Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 162, n. 8, p. 873-885, 2005.

RACKER, A. In: BOYER, P.; LARDY, H.; MYRBACK, K. (Eds.). **The Enzymes**. New York: Academic Press, 1961. v. 5, p. 397-406.

RAMOS, A.; CARNEIRO, J.G.A. Alterações fisiológicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. armazenadas após secagem em estufa. In: CONGRESSO FLORESTAL DO PARANÁ, 1988, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1988. p. 628-643.

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

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

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SARACCO, F.; BINO, R. J.; BERGERVOET, J. H. W.; LANTERI, S. Influence of priming-induced nuclear replication activity on storability of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed. **Seed Science Research**, Wallington, v. 5, n. 1, p. 25-29, mar. 1995.

SHIN, J. H.; KIM, S.R.; AN, G. Rice rice aldehyde dehydrogenase 7 is needed for seed maturation and viability. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 2, p. 905-915, 2009.

SILVA, E. A. A. da; TOOROP, P. E.; LAMMEREN, A. A. M. van; HILHORST, H. W. M. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'rubi') seed germination. **Annals of Botany**, London, v. 102, n.3, p. 425-433, sept. 2008.

SLIWINSKA, E. Nuclear DNA replication and seed quality. **Seed Science Research**, v. 19, p. 15-25, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

VERSLUES, P. E.; BATELLI, G.; GRILLO, S.; AGIUS, F.; KIM, Y.; ZHU, J.; ZHU, J.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J. Interaction of SOS2 with NDPK2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H₂O₂ signaling in Arabidopsis. **Molecular Cell Biology**, Washington, v. 27, p. 7771-7780, 2007.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIEGEL, J.; GALILI, G. (Eds.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 237-271.

VILLELA, F. A.; PERES, W. B. Coleta, beneficiamento e a armazenamento. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

WALTERS, C. T.; TOUCHELL, D. H.; POWER, P.; WESLEY, S. J.; ANTOLIN, M. F. Desiccation stress and damage. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Eds.). **Desiccation and survival in plants**. Wallingford: CABI, 2002a. p. 263-282.

WALTERS, C. T.; TOUCHELL, D. H.; POWER, P.; WESLEY, S. J.; ANTOLIN, M. F. A cryopreservation protocol for embryos of the endangered species *Zizania texana*. **Cryo Letters**, London, v. 23, n. 5, p. 291-298, 2002b.

WATERS, E.; LEE, G.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 47, p. 325-338, 1996.

WEHMEYER, N.; VIERLING, E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 1099-1108, 2000.

WILLIAMSON, J. D.; SCANDALIOS, J. G. Differential response of Maize catalases to abscisic acid: Vp1 transcriptional activator is not required for abscisic acid-regulated *cat1* expression. In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1992, USA. **Proceedings...** USA, 1992. v. 89, p. 8842-8846.

XING, Y.; JIA, W.; ZHANG, J. AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of *CAT1* catalase by triggering H₂O₂ production in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, p. 1-13, 2007.

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