

RENATA CONDURU RIBEIRO REIS

**TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS EM SEMENTES DE
Erythrina velutina Willd. (LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE)
NATIVA DA CAATINGA.**

FEIRA DE SANTANA- BA

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS EM SEMENTES DE
***Erythrina velutina* Willd. (LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE)**
NATIVA DA CAATINGA.

RENATA CONDURU RIBEIRO REIS

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana como parte dos requisitos para a obtenção do título de *Doutor em Botânica*.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLAUDINÉIA REGINA PELACANI (UEFS)

CO-ORIENTADORA: DRA. BÁRBARA FRANÇA DANTAS (EMBRAPA-CPATSA)

FEIRA DE SANTANA- BA

2012

Catálogo-na-Publicação: Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Reis, Renata Conduru Ribeiro

R298t Tolerância a estresses abióticos em sementes de *Erythrina velutina* Willd, (Leguminosae - Papilionoideae) nativa da caatinga. / Renata Conduru Ribeiro Reis. – Feira de Santana - BA, 2012.

132f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Claudinéia Regina Pelacani

Coorientadora: Dra. Bárbara França Dantas

Tese (Doutorado em Botânica)– Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2012.

1. Mulungu. 2. Leguminosae. 3. *Erythrina velutina* Willd. 4.

Estresse abiótico - semente. I. Pelacani, Claudinéia Regina. II.

Dantas, Bárbara França. III. Universidade Estadual de Feira de Santana.

Programa de Pós-Graduação em Botânica. IV. Título.

CDU: 582.736

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elza Alves

(Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho)

Prof. Dr. José Aliçandro Bezerra da Silva

(Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco)

Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Profa. Dra. Barbara França Dantas

(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido)

Co-Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA

2012

A minha avó Eulina (In memoriam) uma guerreira que me ensinou a lutar sempre pelos meus sonhos.

Obrigada meu amor.

Dedico

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos, como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é um tipo de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto apenas pelas pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá atingir completamente este objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A força superior que nos protege “Deus”, pela conquista;

Aos meus pais Manoel Joaquim e Risete e irmãs Arianne e Nadir, pela confiança, amizade, incentivo, apoio, amor incondicional que me deram toda vida e que me fez tornar quem sou;

Ao meu esposo Fernando pelo apoio, compreensão, amizade e ser uma presença imprescindível na minha vida;

À Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS por ser berço da minha formação e ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, pela oportunidade de realização do curso;

A Dra. Claudinéia Regina Pelacani pela orientação, confiança e ensinamentos, pode ter certeza que você sempre será muito importante para mim;

A Dra. Bárbara França Dantas pela enorme parceria, amizade, alegria, colaboração, compreensão, estímulo, co-orientação e ao mesmo tempo orientação, ainda estaremos juntas, nem que seja no nosso bom jogo de tênis;

Aos colegas do Laboratório de Análise de Sementes, Alberto, Manoel (Zizinho), Armando, Rita, Janete, Fabrício e Marcelo, pela ajuda, alegria e saudável convivência nestes anos;

As amigas Yara e Daiane pela amizade e ajuda no início do trabalho;

À Embrapa Semiárido pelo apoio, disponibilidade de sua estrutura física de laboratórios, equipamentos para a condução dos trabalhos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que, de alguma maneira contribuíram para que eu conseguisse chegar até aqui, seja com um sorriso, um incentivo ou simplesmente com a força positiva do pensamento em mim.

Agradeço a todos, com muito carinho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1	CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE.....	10
2	OBJETIVO	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
	CAPÍTULO I	24
	INFLUENCIA DA TEMPERATURA NA MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Erythrina velutina</i> Willd. (LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE)	24
	RESUMO	25
	ABSTRACT	26
	INTRODUÇÃO	27
	METODOLOGIA	28
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
	CONCLUSÕES	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
	CAPÍTULO II.....	45
	EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO NA MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Erythrina velutina</i> Willd. (LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE)	45
	RESUMO	46
	ABSTRACT	47
	INTRODUÇÃO	48
	METODOLOGIA	50
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
	CAPÍTULO III	64
	EFEITO DO ESTRESSE SALINO NA MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Erythrina velutina</i> Willd. (LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE)	64
	RESUMO	65
	ABSTRACT	66
	INTRODUÇÃO	67

METODOLOGIA	69
RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CAPÍTULO IV	84
EFEITO DO ESTRESSE SALINO NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS	
<i>Erythrina velutina</i> Willd. (LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE)	84
RESUMO	85
ABSTRACT	86
INTRODUÇÃO	87
METODOLOGIA	89
RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
CAPÍTULO V	105
ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E ACÚMULO DE PROLINA EM	
SEMENTES DE <i>Erythrina velutina</i> Willd. (LEGUMINOSAE – PAPILIONOIDEAE)	
SUBMETIDAS A ESTRESSES ABIÓTICOS DURANTE A GERMINAÇÃO	105
RESUMO	106
ABSTRACT	107
INTRODUÇÃO	108
METODOLOGIA	110
RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
RESUMO GERAL	131
ABSTRACT	132

1 INTRODUÇÃO GERAL

A busca crescente pelo desenvolvimento sustentável e melhorias na qualidade de vida também envolvem o despertar de tecnologias para produção de espécies vegetais cada vez em maiores quantidades e com menores agressões ao meio. É essa conscientização crescente da população, no tocante a conservação do ambiente, e o uso de agroquímicos têm impulsionado a buscas por novas tecnologias, voltadas à proteção das plantas contra os agentes bióticos e abióticos. Nesse contexto, de exploração sustentável e proteção de plantas, além de novos produtos fitoterápicos, podemos inserir a indução de resistência vegetal, que pode ser vista como de ocorrência natural, ou podendo ser induzida por fatores bióticos ou abióticos, os quais precisam ser decifrados para serem usados em favor de produtos eficientes e ambientalmente corretos na busca de maior produtividade econômica com qualidade (GAZIM, 2005).

As plantas, assim como todos os outros seres vivos, estão sujeitas freqüentemente a agressões causadas por agentes bióticos e abióticos. Esses estresses são fatores limitantes mais importantes para a produtividade do vegetal. Existem diversas situações ambientais capazes de produzir estresse, como a seca e as altas temperaturas, um dos biomas que se enquadra nesses aspectos é a caatinga.

O semiárido brasileiro tem área de 969.589,4 km² (cerca de 11% do território brasileiro). Possui 12,3% da população do país (20.858,264 habitantes) em 1.133 municípios, o que representa, respectivamente, 21 habitantes/km² e 22% dos municípios brasileiros. Essa população está distribuída na zona urbana (11.747.381) e zona rural (9.085.266), (MI,2005).

Integrado no polígono das secas, o semiárido apresenta-se como uma região marcada pela condição climática, definida por sua sazonalidade quando referido ao cinturão de climas áridos e semiáridos tropicais e subtropicais do globo. O clima nessa região é quente com baixa pluviosidade, em torno de 250 a 800 mm anuais. A quantidade de chuvas pode variar, alcançando em anos de muitas chuvas até 1.000 mm.ano⁻¹ e em anos de seca, apenas 200 mm.ano⁻¹, em certas regiões. A temperatura média se situa entre 24 e 26°C e varia pouco durante o ano (MAIA, 2004). Além dessas condições climáticas rigorosas, a região está submetida a ventos fortes e secos, que contribuem para a aridez da paisagem nos meses de seca (SAMPAIO & RODAL, 2000).

Como parte do Semiárido nordestino, a Caatinga é um dos maiores biomas brasileiros, com uma grande diversidade biológica e alto nível de endemismo, pois abriga uma ampla gama de espécies adaptadas a este tipo de clima. É marcada por uma forte sazonalidade climática, com alternância entre estações chuvosa e seca. Muitas plantas da Caatinga, sobretudo as perenes se ajustam a periodicidade do regime climático tornando-se decíduas no período seco, estratégia positiva adotada para economia de água. Outras plantas adotam escapar do rigor do período seco, tendo todo o seu ciclo de vida concentrado no período chuvoso, o que ocorre principalmente com as ervas terófitas (ARAÚJO et al., 2002; ARAÚJO & FERRAZ, 2003). Assim a sazonalidade climática tem sido vista como um fator de estresse, influenciando a dinâmica das populações e o ritmo biológico das plantas do bioma Caatinga, sobretudo no que diz respeito ao crescimento e época de reprodução das plantas (MACHADO et al., 1997; ARAÚJO, 1998; MACHADO & LOPES, 2002; ARAÚJO & FERRAZ, 2003).

Giulietti et al. (2002), em pesquisa sobre endemismo na Caatinga, descreveram 18 gêneros e 318 espécies vegetais endêmicas. Posteriormente, estimaram que, pelo menos, 932 espécies já foram registradas para a região, das quais 380 são endêmicas, projetando que ocorra, neste bioma, cerca de duas mil a três mil espécies de plantas (GIULIETTI et al., 2004). Trata-se de números bastante expressivos para uma área com longa história de antropização, e que tende a ampliar, à medida que mais pesquisadores se dedicam a estudar este bioma. A Caatinga condiciona profundamente a atividade humana do semiárido nordestino, nessa região existe uma grande demanda por recursos florestais em pequenas propriedades, onde cada vez mais, as árvores assumem um importante papel na economia rural, outros produtos florestais não-madeireiros como frutos, plantas medicinais, fibras, mel, entre outros, têm elevada importância para a população e a economia da região (BRASIL, 2008).

Além disso, as plantas deste ecossistema enfrentam problemas com a retenção de água nos solos, que possuem potencial osmótico negativo e elevadas concentrações de íons potencialmente tóxicos como o sódio, carbonato e cloro (VIÉGAS, 2001; PARIDA, 2005). É significativo o nível de conhecimento relativo às características de adaptação vegetativa das espécies vegetais as condições ambientais da Caatinga, mas pouco se sabe sobre os mecanismos de adaptação das sementes dessas espécies a tais condições.

A conservação da biodiversidade dos ecossistemas florestais tropicais tem sido uma das principais preocupações da humanidade nas últimas décadas. Em decorrência da devastação florestal para a extração de madeira visando o atendimento das necessidades do país e da expansão da agricultura, tem-se observado um comprometimento do potencial genético de muitas espécies. Desta forma a produção de sementes de espécies florestais ganhou grande importância em programa de reposição florestal, reflorestamento, recuperação de áreas degradadas, arborização urbana e a preservação das espécies florestais nativas em extinção, entre outras atividades.

Sementes têm sido consideradas como objeto de estudo em diferentes linhas de pesquisa, promovendo um avanço significativo sobre os processos morfológicos e fisiológicos que acontecem durante o desenvolvimento, germinação e crescimento pós-germinativo (COMAI & HARADA, 1990; BEWLEY, 1997; HARADA, 1997; HILHORST et al., 1998). No entanto, informações sobre os mecanismos que controlam estes processos começaram a surgir somente após a introdução das tecnologias genéticas e moleculares neste campo de pesquisa (GALAU, 1991; BEWLEY & BLACK, 1994; GOLDBERG et al., 1994; KOORNNEEF & KARSSSEN, 1994; HILHORST, 1995; KERMODE, 1995; HARADA, 1997; RAGHAVAN, 1997). Desde então, as análises das mudanças no padrão de expressão de genes, e mecanismos de controle do ciclo celular, que acontecem durante o desenvolvimento e germinação de sementes, e durante o crescimento pós-germinativo, tem contribuído significativamente com evidências sobre os programas regulatórios que governam ambas as fases do desenvolvimento das plantas superiores (DURE et al., 1981; CHLAN & DURE, 1983; DE CASTRO et al., 2001; DE CASTRO & HILHORST, 2000, 2006).

Dentre os diversos fatores ambientais capazes de influenciar o processo germinativo e o desenvolvimento de plântulas, a indisponibilidade de água é um dos mais importantes. Esta condição é vista como um fator limitante à iniciação da germinação de sementes e estabelecimento de plântulas no campo. Isso porque afeta diretamente as relações hídricas em sementes e subsequente desenvolvimento de plântulas, implicando direta ou indiretamente em todas as demais etapas do metabolismo, incluindo reativação do ciclo celular e crescimento (ROCHA, 1996; DE CASTRO et al., 2000). Conseqüentemente, ocorrem também alterações no perfil de expressão de genes em resposta a considerada condição de estresse hídrico por 'seca' (VERSLUES et al., 2006).

Para que a germinação ocorra satisfatoriamente, a semente, viva e não dormente, deve dispor de condições favoráveis de ambiente. Os fatores ambientais essenciais à germinação das sementes são a temperatura, água e o oxigênio. O grau de exigência desses fatores é variável entre as espécies e é determinado pelo genótipo e pelas condições ambientais prevalentes durante a formação das sementes (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989).

De acordo com Nonogaki et al. (2010), a germinação é um processo complexo em que a semente deve recuperar-se rapidamente da secagem sofrida no final do processo de maturação, retomando uma intensidade sustentada do metabolismo, que proporcione eventos celulares essenciais para permitir a emergência do embrião, e se preparar para o crescimento subsequente das mudas. O início desse processo se dá pela absorção de água pela semente seca até que todas as matrizes e os conteúdos celulares estejam completamente hidratados. Essa é uma fase crítica do biociclo vegetal pelo fato do processo estar associado a vários fatores de natureza extrínseca (fatores do ambiente físico) e intrínseca, ou seja, a processos fisiológicos e metabólicos (POPINIGIS, 1977; BEWLEY & BLACK, 1994; SANTOS, 1999; MARCOS FILHO, 2005).

Durante a germinação, as reservas insolúveis de alto peso molecular presente nas sementes, como lipídeos, proteínas e açúcares, são degradadas e convertidas a formas solúveis, que são rapidamente transportadas aos tecidos em crescimento e utilizadas em reações de síntese ou de produção de energia. As modificações metabólicas que ocorrem nesses estádios são resultado da atividade de várias enzimas de hidrólise e transferência (BEWLEY & BLACK, 1994; BUCKERIDGE, et al., 2004) e podem expressar a qualidade fisiológica de semente.

O potencial fisiológico agrupa subsídios sobre a viabilidade e vigor das sementes. O teste de germinação é eficiente, pois fornece informações sobre o potencial de uma amostra para germinar sob condições ótimas de ambiente. Ainda que o resultado do teste de germinação apresentem alto grau de confiabilidade para analistas e produtores de sementes, o mesmo não ocorre quando se trata da utilização do material para semeadura em campo onde, é comum resultados de emergência em campo serem diferentes daqueles obtidos no laboratório. Desta forma os tecnologistas de sementes buscam desenvolver

métodos que permitam avaliar o potencial fisiológico das sementes (MARCOS FILHO, 1999, 2005).

A temperatura influencia o metabolismo das sementes, alterando processos bioquímicos ou fisiológicos, existindo temperaturas limitantes e ótimas para a germinação. A temperatura é responsável não somente pela velocidade de germinação como também pelo percentual final de germinação (CARVALHO et al., 2001; FERRAZ-GRANDE & TAKAKI, 2001; MEDEIROS-SILVA et al., 2002; SOCOLOWSKI & TAKAKI, 2004).

Cada espécie possui um espectro de temperatura em que a germinação irá ocorrer, embora à faixa de 20°C a 30°C mostre-se adequada para a germinação de grande número de espécies subtropicais e tropicais (BORGES & RENA, 1993). A temperatura ótima proporciona a máxima porcentagem de germinação no menor espaço de tempo (BEWLEY & BLACK, 1994). Sob temperatura baixa, a embebição pode ocorrer, mas poderá não ser seguida pelo crescimento, ou promover ainda danos ao embrião ou as plântulas, também poderão impedir a conclusão do processo. Similarmente, altas temperaturas podem permitir a embebição, mas não permitem o crescimento do embrião e o estabelecimento da plântula (BRADBEER, 1988). Estas diferenças de comportamento na germinação, em relação à temperatura, estão em função da qualidade fisiológica da semente, ou seja, seu grau de maturidade fisiológica na colheita ou do progresso da deterioração.

Além da temperatura a disponibilidade de água é capaz de influenciar o processo germinativo e o desenvolvimento pós-germinativos de plântulas. Essa condição é vista como um fator limitante à iniciação da germinação de sementes e estabelecimento de plântulas no campo. Isso porque afeta diretamente as relações hídricas em sementes e subsequente desenvolvimento de plântulas, implicando direta ou indiretamente em todas as demais etapas do metabolismo, incluindo reativação do ciclo celular e crescimento (ROCHA, 1996, DE CASTRO et al., 2000).

Como resultado do déficit hídrico, há geralmente elevação de sais solúveis (salinidade) que podem influenciar, significativamente, na resposta germinativa das espécies. O excesso de sais solúveis provoca uma redução do potencial hídrico do solo, induzindo menor capacidade de absorção de água pelas sementes. Esta redução do potencial hídrico e os efeitos tóxicos dos sais interferem inicialmente no processo de

absorção de água pelas sementes, influenciando na germinação (CAVALCANTE & PEREZ, 1995).

O alto teor de sais no solo, especialmente de cloreto de sódio (NaCl), pode inibir a germinação, primariamente, em razão do efeito osmótico (FANTI & PEREZ, 1996). Também, o incremento na concentração salina produz um aumento na porcentagem de plântulas anormais, em virtude da ação tóxica dos sais sobre as sementes (CAMPOS & ASSUNÇÃO, 1990). O crescimento e a sobrevivência das plantas a condições de alta salinidade dependem da adaptação a baixos potenciais hídricos e altas concentrações de sódio. Três aspectos são relevantes à tolerância das plantas ao sal: (1) homeostase iônica, (2) detoxificação e (3) controle do crescimento (ZHU, 2001).

Em respostas a esses estresses ambientais, muitas plantas sintetizam e acumulam compostos de massa molecular pequena, assim como açúcares álcoois, prolina e glicina betaina (HELLEBUST, 1976; YANCEY et al., 1982), os quais são denominados de osmólitos, osmoprotetores ou solutos compatíveis. A função exata desses compostos, nas plantas, embora seja desconhecida, pode estar relacionada à proteção dos vegetais a estresses abióticos, funcionando como uma ferramenta para o ajustamento osmótico celular (HELLEBUST, 1976). Além dessa função principal no ajustamento osmótico, os solutos compatíveis podem ajudar na estabilização de macromoléculas (osmoprotetores) e proteção contra danos oxidativos sob condições adversas (YEO, 1998). Vários trabalhos têm recentemente discutido a osmoproteção em plantas e sua potencial aplicação na tolerância à seca e a salinidade (HOLMSTROM et al., 1996; HARE & CRESS, 1997; ZHANG et al., 1999; RATHINASABAPATHI, 2000).

A tolerância ao estresse osmótico e iônico induzido pela restrição de água e por sais constituem processos complexos e geralmente interligados, envolvendo a interação de várias propriedades (ZHU, 2002; FOOLAD, 2004; VERSLUES et al., 2006). Do ponto de vista molecular, a transdução de sinais dos estresses por seca e por sais consistem em cadeias de sinais vinculadas as homeostases iônica e osmótica, cadeias de resposta a desintoxicação (controle de danos e reparos), e cadeias de regulação do crescimento, com efeito sobre a ativação ciclo celular e crescimento (ZHU, 2002). Os mecanismos fisiológicos de sobrevivência sob estresse hídrico (seca) e salino e também por calor têm sido bastante estudados em sementes de espécies vegetais cultivadas.

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) tem sido relatada por vários autores como produto do estresse biótico e abiótico (FOYER & NOCTOR, 2000; REDDY et al., 2004).

A seca e o acúmulo de íons tóxicos compõem-se tipos de estresse oxidativo para os vegetais. Radicais livres são formados sob condições de estresse oxidativo bem como pelas reações normais da cadeia de transporte de elétrons, mas que são altamente reguladas (CHAOUÏ et al., 1997; MAZHOUDI et al., 1997; GREGGAINS et al., 2000), todavia esta regulação pode ser perdida se o estresse for mais severo aumentando consideravelmente a produção de radicais livres que podem levar a uma cascata de evento que começando com a peroxidação de lipídeos, avançam para degradação de membranas e para morte celular (GREGGAINS et al., 2000). O superóxido é o primeiro produto da redução do oxigênio molecular. Ele pode reagir para produzir várias outras espécies reativas e pode formar H_2O_2 tanto enzimática ou espontaneamente (PITCHER & ZILINSKAS, 1996).

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, mas participa como oxidante e redutor em muitas reações celulares (PRICE et al., 1989). É altamente difusível através das membranas e compartimentos aquosos e pode inativar diretamente enzimas sensíveis em baixas concentrações. Tal como o superóxido, o H_2O_2 é pouco estável e, portanto menos tóxico que outras espécies reativas de oxigênio; a principal ameaça imposta por estes radicais está na habilidade de gerarem altas quantidades de radicais hidroxil, que é a mais potente espécie oxidante encontrada em sistemas biológicos. Ele reage de forma não específica com qualquer molécula biológica (SGHERRI & NAVARI-IZZO, 1995; BARTELS, 2001).

De acordo com Foyer et al. (1997) o aumento nos oxidantes celulares pode levar a super expressão de genes de enzimas de desintoxicação como as superóxido dismutases (SOD) (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977), catalase (CAT), peroxidase (PRX) e enzimas do ciclo ascorbato-glutationa (SUNG & JENG, 1994; BAILLY et al, 1998) como parte de uma estratégia requerida para superar o estresse oxidativo.

Tradicionalmente, os estudos mostram a ação das EROs apenas como geradores de dano oxidativo. Entretanto, ao longo destes anos, vários estudos fisiológicos encontraram correlação entre níveis de antioxidantes e o nível de tolerância ao estresse em espécies, variedades e biótipos de plantas. Pesquisas recentes demonstram que diversas respostas

celulares a estímulos fisiológicos normais ou a estresses são induzidas pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em compartimentos celulares específicos (EDREVA, 2005; KWAK et al., 2006; FEDOROFF, 2006) mostrando seu papel importante na sinalização celular. No entanto, o efeito danoso das EROs depende de um delicado equilíbrio espacial e temporal entre a produção e remoção das mesmas.

Uma ampla gama de outros compostos, incluindo oligossacarídeos, glicoproteínas e peptídeos, pode mediar a indução das reações de defesa nas plantas (BENHAMOU & NICOLE, 1999; JUNG et al., 2000). De forma análoga, a resistência ao frio ou aos choques de calor podem ser aumentados por elevação na concentração de compostos fenólicos (RIVERO et al., 2001) ou por alguns aminoácidos envolvidos na síntese de fenólicos (MACHADO NETO et al., 2004). Em sementes a incapacidade de os tecidos sensíveis à dessecação efetuarem adequada proteção contra eventos oxidativos, conseqüentes do metabolismo alterado existente durante a desidratação, pode ser considerada como uma das principais causas da sensibilidade à dessecação e da reduzida longevidade (LEPRINCE et al., 1993).

Assim como em plantas diversas alterações podem ocorrer nas sementes durante a exposição a estresses. A sensibilidade à dessecação, por exemplo, é um fenômeno fisiológico complexo e envolve uma série de mecanismos deletérios e/ou protetores dependendo das condições da dessecação (LI & SUN, 1999).

São vários os mecanismos sugeridos e relacionados com a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas, tais como o acúmulo de reservas insolúveis e a presença de um sistema de reparo durante a reidratação de sementes secas. A ausência ou expressão insuficiente de um ou mais desses mecanismos é considerada a causa da sensibilidade à dessecação em sementes recalcitrantes (PAMMENTER & BERJAK, 1999). Isso pode também explicar e determinar o momento durante a embebição no qual sementes ortodoxas perdem a capacidade de tolerância a uma eventual condição de restrição hídrica, afetando diretamente a germinação e o estabelecimento plântulas (BUITINK et al., 2003). Portanto, o estudo da tolerância a estresses por seca converge com o entendimento da tolerância à dessecação. Estudos com sementes ortodoxas e com plantas tolerantes à desidratação têm possibilitado a identificação de vários genes envolvidos na tolerância à dessecação, como *ABI5*, genes *LEA* e 'heat-shock' (VIERLING, 1991; VICIENT et al., 2000, BARTELS &

SALAMINI, 2001; RAMANJULU & BARTELS, 2002; SEKI et al., 2003; BERNACCHIA & FURINI, 2004).

Aparentemente, a imposição de estresse osmótico as sementes pode induzir tolerância a outros tipos de estresses em espécies cultivadas, incluindo tolerância à seca e a sais (SAVINO et al., 1979; KRETSCHMER, 1982; BURGASS & POWELL, 1984; BRUGGINK et al., 1995; CAYUELA et al., 1996; CADMAN et al., 2006). Não obstante, esse parece ser um fenômeno evolutivo natural em espécies nativas, de adaptação a condições adversas. Dentro desse enfoque, percebe-se a importância das pesquisas relativas a estresses em sementes, como componente essencial e inicial de tolerância às condições adversas ao longo do ciclo de vida natural da maioria das espécies vegetais.

Nesse sentido, são necessários avanços no desenvolvimento de metodologias adequadas, as quais somente poderão existir com o conhecimento das necessidades ecológicas e do comportamento fisiológico das espécies. A fim de suprir essa necessidade, as pesquisas sobre os mecanismos de germinação e conservação de sementes de espécies nativas, de valor econômico e potencial agrônomo ou biotecnológico devem ser consideradas prioritárias.

A utilização de espécies adequadas à ecologia das diferentes regiões é um dos fatores básicos primordiais para o sucesso em programas de adaptação e utilização agrônoma de recursos genéticos vegetais (SILVA et al., 1995), como também a utilização de sementes de boa qualidade. Desta forma, o comportamento fisiológico das sementes deve ser estudado para que se possa entender melhor a qualidade fisiológica e os mecanismos de germinação das sementes sob condições ambientais intrínsecas do seu habitat, e assim otimizar protocolos de conservação e multiplicação das espécies, e seu uso sustentável.

1.1 CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

Algumas espécies vegetais nativas da caatinga têm grande importância biológica devido ao potencial de uso popular, avaliados através de levantamentos etnobotânicos, à confirmação científica da produção de compostos naturais considerados 'úteis' por suas aplicações em indústrias de medicamentos e também à pressão antrópica que sofrem pelo extrativismo das mesmas, levando à inclusão de algumas na lista das espécies ameaçadas de extinção. Entre as espécies de importância biológica está o **Mulungu** (*Erythrina velutina* Willd., LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE) (Figura 1).

O gênero *Erythrina* (família FABACEAE) é amplamente conhecido, ocorrendo nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Possui cerca de 110 espécies, das quais 70 são nativas da América (VASCONCELOS et al., 2003). O nome *Erythrina* vem do grego "erythros", que significa vermelho, em alusão à cor de suas flores. São empregadas como ornamentais, madeiras e sombreadoras de lavouras de café e cacau, além de substâncias como alcalóides e tanino. No Brasil são relacionadas cerca de doze espécies (EPAMIG, 1993), sendo as duas principais *E. velutina*, originária do nordeste e *E. mulungu*, nativa do sudeste.

A *E. velutina*, espécie ameaçada de extinção é chamada popularmente de mulungu, suinã, canivete e corticeira (LORENZI & MATOS, 2002). O mulungu é uma espécie nativa do semiárido, sendo, portanto uma planta que está submetida às condições de seca e a altas temperaturas na maior parte do ano. É uma árvore comumente usada em jardins e parques no nordeste brasileiro (DA-CUNHA et al., 1996). Planta decídua, heliófita, característica de várzeas úmidas e beira de rios da caatinga da região semiárida do nordeste brasileiro. É também encontrada na orla marítima de Pernambuco e na floresta latifoliada semidecídua de Minas Gerais e São Paulo. Ocorre preferencialmente nas formações secundárias apresentando, entretanto, dispersão bastante irregular e descontínua. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis, sendo este seu principal método de propagação. Floresce a partir do final do mês de agosto com a planta totalmente despida de folhagem, prolongando-se até dezembro. Os frutos amadurecem em janeiro/fevereiro (LORENZI, 1992).

E. velutina apresenta árvore de médio porte com 8 a 12 metros de altura, bastante copada, caule espinhento e ramos armados; folhas trifolioladas, pecíolo de 13-15

milímetros; folíolos largos, decíduos durante a floração; raques compridas, armada de acúleos. Flores vermelhas ou vermelho-alaranjadas, curto-pediceladas, em racemos multifloros; cálice truncado-campanulado de 16-18 milímetros de comprimento, corola de 5-6 centímetros de comprimento; carena ligeiramente menor, arredondada de pétalas livres. Estame vexilar conato apenas na base, de filetes avermelhados. Legume estipulado, polispermo, com várias sementes de 1 cm, vermelhas, duras, vernicosas, no formato de feijão (EPAMIG, 1993).

A madeira da *E. velutina* é leve, macia e pouco resistente aos agentes decompositores. É empregada na confecção de tamancos, jangadas, brinquedos e caixotaria. A árvore é extremamente ornamental, principalmente quando em flor, isto tem estimulado seu uso no paisagismo, principalmente na arborização de ruas, jardins e alamedas (LORENZI, 1992), também é utilizada como cerca viva por ser espinhenta, no entanto propaga-se muito mal por estacas. As flores são frequentemente visitadas por pássaros que sugam seu néctar.

Na medicina popular, a casca é utilizada como sudorípara, calmante, sedativo de tosses e bronquites (RABELO, 2001) e no tratamento de verminoses e hemorróidas. Ao fruto seco, atribui-se ação anestésica local, o decocto é utilizado para acelerar a maturação de abscessos gengivais (LORENZI & MATOS, 2002). Além destes usos, as plantas deste gênero, também parecem apresentar atividade no SNC, uma vez que são consumidas popularmente como tranqüilizantes e em casos de insônia (ONUSIC et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2004).

O “mulungu“, nome comum de várias espécies de *Erythrina*, foi escolhido como árvore símbolo da EMBRAPA – Agrobiologia e tem inúmeras funções ligadas a agroecologia. Beneficia-se do processo de fixação biológica de nitrogênio dispensando adubos nitrogenados. É recomendado para a recuperação de matas ciliares e de ecossistemas degradados e na manutenção da fauna silvestre, pois suas flores atraem as aves (EMBRAPA, 2004).



Figura 1. Aspectos da espécie *Erythrina velutina* – A- Árvore, B- Flores, C- Frutos, D- Sementes (Fotos: RIBEIRO-REIS, R.C.).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo foi conduzido com o objetivo de caracterizar o comportamento fisiológico, metabólico, atividade de enzimas antioxidantes de sementes e plântulas de mulungu (*Erythrina velutina*) em função do estresse abiótico aplicado e otimizar protocolos de conservação e multiplicação e uso sustentável da espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar parâmetros fisiológicos relativos à germinação e dormência, vigor, longevidade e tolerância à dessecação;
2. Avaliar parâmetros do metabolismo germinativo das sementes em resposta ao estresse térmico, hídrico e salino;
3. Avaliar parâmetros de atividade de enzimas antioxidantes das sementes e plântulas em resposta ao estresse térmico, hídrico e salino;

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, E.L. Aspectos da dinâmica populacional de duas espécies em floresta tropical (caatinga), Nordeste do Brasil. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 1998.

ARAÚJO, E.L.; FERRAZ, E.M.N. Processos ecológicos mantedores da diversidade vegetal na caatinga: estado atual do conhecimento. In: CLAUDINO, S.V. (Org), **Ecosistemas brasileiros: manejos e conservação**. Expressão Gráfica, Fortaleza, pp.115-128, 2003.

ARAÚJO, E.L.; SILVA, S.I.; FERRAZ, E.M.N. Herbáceas da caatinga de Pernambuco. In: SILVA, J.M.; TABARELLI, M. (Orgs), **Diagnósticos da biodiversidade do estado de Pernambuco**. SECTMA, Recife, pp.183-206, 2002.

BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; COME, D. Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.646-652, 1998.

BARTELS, D. Targeting detoxification pathways. An efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? **Trends in Plant Science**, v.6, p.284-286, 2001.

BARTELS, D., F. SALAMINI. Desiccation tolerance in resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. **Plant Physiology**, v.127, p.1346–1353, 2001.

BENHAMOU, N.; NICOLE, M. Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, n.10, p.703-719, 1999.

BERNACCHIA, G.; FURINI, A. Biochemical and molecular responses to water stress in resurrection plants. **Physiologia Plantarum**, v.121, p.75-181, 2004.

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

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

BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑARODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coord.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, p.83-136, 1993.

BRADBEER, J. W. **Seed dormancy and germination**. Glasgow: Blackie, 1988. 146 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Departamento de Florestas. Programa Nacional de Florestas. Unidade de Apoio do PNF no Nordeste. **Manejo sustentável dos recursos florestais da Caatinga/MMA**. 28p.:il. 2008.

BRUGGINK, G.T.; VAN DER TOORN, P. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, v.5, p.1-4, 1995.

BUCKERIDGE, M.S. et al. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 324 p., 2004.

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

BURGAS, R.W.; POWELL, A.A. Evidence for repair processes in the invigoration of seeds by hydration. **Annals of Botany**, v.53, p.753-757, 1984.

CADMAN, C.S.C.; TOOROP, P.E.; HILHORST, H.W.M.; FINCH-SAVAGE, W.E. Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during cycling through dormant and non-dormant states indicate a common underlying dormancy control mechanism. **Plant Journal**. (In Press), 2006.

CAMPOS, I.S.; ASSUNÇÃO, M.V. Efeito do cloreto de sódio na germinação e vigor de plântulas de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.6, p.837-843, 1990.

CARVALHO, P.G.B.de et al. Temperature dependent germination and endo-bmannanase activity in sesame seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.139-148, 2001.

CAYUELA, E.; PÉREZ-ALFOCEA, F.; CARO, M.; BOLARÍN, M.C. Priming of seeds with NaCl induces physiological changes in tomato plants grown under salt stress. **Physiology Plant**, v. 96, p.231-236, 1996.

CAVALCANTE, A.M.B.; PEREZ, S.C.J.G. de A. Efeitos dos estresses hídrico e salino sobre a germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Witt. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n. 2, p. 281-289, 1995.

CHAOUI, A. C.; MAZHOUD, S.; GHORBAL, M. H.; FERJANI, E. EL. Cadmiun and zinc induction of lipid peroxidation na effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, v.127, p.139-147, 1997.

CHLAN, C.A.; DURE, L.I. Plant seed embryogenesis as a tool for molecular biology. **Molecular and Cell Biochemistry**, v.55, p.5-15, 1983.

COMAI, L.; HARADA, J.J. Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of the transition from embryogeny to germination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.87, p.2671-26.74, 1990.

DA-CUNHA, E.V.L.; DIAS, C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GRAY, A.I. Eryvellutinone, an isoflavanone from the stem bark of *Erythrina vellutina*. **Phytochemistry**, v.43, n.6, p. 1371 – 1373, 1996.

DE CASTRO, R.D. et al. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, v.122, p.327–335, 2000.

DE CASTRO, R.D. et al. Depth of dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds is related to the progression of the cell cycle prior to the induction of dormancy. **Seed Science Research**, v.11, p.45-54, 2001.

DE CASTRO, R.D. DE; HILHORST, H.W.M. Hormonal control of seed development in GA- and ABA-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Moneymaker) mutants. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.09.014>. **Plant Science**, v.170, n.3, p.462-470, 2006.

DURE, L.I.; GREENWAY, S.C.; GALAU, G.A. Developmental biochemistry of cotton-seed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro protein synthesis. **Biochemistry**, v.20, p.4162-4168, 1981.

EDREVA, A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v.106, p.135-146, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/leguminosas/eritrina.html> Acesso em 21 de setembro de 2011.

EPAMIG - **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**. O Gênero *Erythrina* L. no PAMG - Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. *Daphne*, v.3, p.20-25, 1993.

FANTI, S.C.; PEREZ, S.C.J.G. A. Efeitos de estresse hídrico e salino na germinação de *Bauhinia forficata* Link. **Revista Ceres**, v.43, n.249, p.654-662, 1996.

FEDOROFF, N. Redox Regulatory Mechanisms in Cellular Stress Responses. **Annals of Botany**, v.98, n.2, p.289-300, 2006.

FERRAZ-GRANDE, F. G.A.; TAKAKI, M. Temperature dependent seed germination of *Dalbergia nigra* Allem (Leguminosae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, p.401-404, 2001.

FOOLAD, M.R.; Recent Advances in Genetics of Salt Tolerance in Tomato. **Plant Cell**, v.76, n.2, p.101-119, February, 2004.

FOYER, C.H.; LOPEZ DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. **Plant Physiology**, v.100, p.241-254, 1997.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. **New Phytologist**, v.146, p.359-388, 2000.

GALAU, G.A.; JAKOBSEN, K.S. E HUGHES, D.W. The controls of late dicot embryogenesis and early germination. **Plant Physiology**, v.81, p.280-288, 1991.

GAZIM, Z.C. Determinação qualitativa e quantitativa dos constituintes químicos do óleo essencial de calêndula (*Calendula officinalis* L. Asteraceae) por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e avaliação da atividade antimicrobiana e

condições de plantio. Maringá, **Dissertação de Mestrado** - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, 2005, 92p.

GIANNOPOLITIS, C.N.; REIS, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

GIULIETTI, A.M. et al. Espécies endêmicas da caatinga. In: SAMPAIO, E.V.S.B.; GIULIETTI, A.M.; VIRGINIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L. (Ed.). **Vegetação e flora da caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste: Centro Nordestino de Informação sobre Plantas, p.103-108, 2002.

GIULIETTI, A.M., et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. (orgs.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. p.48-90. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2004.

GOLDBERG, R.B.; DE PAIVA, G. E YEDEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed. **Science**, v. 266, p. 605-614, 1994.

GREGGAINS, V. *et al.* Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moiststored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, v.148, n.02, p.267-276, 2000.

HARADA, J.J. Seed maturation and control of germination. In: **Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development**, (Larkins, B.A. e Vasil, I.K., eds). Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers, p. 545-592, 1997.

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v.21, p.79-102, 1997.

HELLEBUST, J.A. Osmoregulation. **Annual Review of Plant Physiol**, v.27, p.485-505, 1976.

HILHORST, H.W.M.; GROOT, S.P.C.; BINO, R.J. The tomato seed as a model system to study seed development and germination. **Acta Botanica Neerlandica**, v.47, p.169-183, 1998.

HILHORST, H.W.M. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. **Seed Science Research**, v.5, p.61-73, 1995.

HOLMSTROM, K.O. et al. Drought tolerance in tobacco. **Science**, v.379, p.683-684, 1996.

JUNG, S.; KIM, J.S.; CHO, K.Y.; TAE, G.S.; KANG, B.G.; Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs. **Plant Science**, v.153, n.2, p.145-154, 2000.

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

KOORNNEEF, M., KARSSSEN, C.M. Seed dormancy and germination, in: E.M. Meyerowitz, C.R. Somerville (Eds.), *Arabidopsis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, p. 313–334, 1994.

KRETSCHMER, M. Extension of the temperature tolerance of *Lactuca* achenes with PEG and red light. **Gartenbauwissenschaft**, v.47, p.152-157, 1982.

KWAK, J.M., NGUYEN, V.; SCHROEDER, J.I. The Role of Reactive Oxygen Species in Hormonal Responses. **Plant Physiology**, v.141, p.323–329, 2006.

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

LI, C.; SUN, W. Desiccation sensitivity and activities of free radical scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.9, n.3, p.209-217, 1999.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Editora Plantarum, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

MACHADO, I.S.; SANTOS, L.M.; SAMPAIO, E.V.S.B. Phenology of caatinga species at Serra Talhada, PE, northeastern Brazil. **Biotropica**, v.29, p.57-68, 1997.

MACHADO, I.S.; LOPES, A. A polinização em ecossistemas de Pernambuco: uma revisão do estado atual do conhecimento. In: SILVA, J.M.; TABARELLI, M. (Orgs), **Diagnóstico da biodiversidade do estado de Pernambuco**. SECTMA. p.583-595, 2002.

MACHADO NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C.; GATTI, A.B.; PRIOLI, M.R.; CARDOSO, V.J.M. Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p. 330-337, 2004.

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. 1º ed. São Paulo. Editora D & Z, 2004.

MARCOS FILHO, J. Testes de Vigor: Importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.1.1-1.21.

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

MAYER, A.C.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. London: Pergamon Press, 1989. 270p.

MAZHOUDI, S.; CHAOUI, A.; GHORBAL, M.H.; EL FERJANI, E. Response of antioxidative enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). **Plant Sci.**, v.127, p.129-137, 1997.

MEDEIROS-SILVA, L.M. de; RODRIGUES, T. de J.D.; AGUIAR, I.B. de. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Árvore**, v.26, p.691-697, 2002.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D. Germination-still a mystery. **Plant Science**. (Article in Press), 2010.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Saafey**, v.60, n.03, p.324-349, 2005.

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

PITCHER, L.H.; ZILINSKAS, B.A. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozoneinduced foliar necrosis. **Plant Physiology**, v.110, p.583-588, 1996.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Ministério da Agricultura – AGIPLAN, p.97-105, 1977.

PRICE, A.H.; ATHERTON, N.M.; HENDRY, G.A.F. Plants under drought-stress generated activated oxygen. **Free Radical Research Community**, v.8, p.61-66, 1989.

RABELO, L.A. et al. Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, n.5, p.543-544, 2001.

RAGHAVAN, V. **Molecular Embryology of Flowering Plants**. First Edition. Cambridge University Press, New York, 1997.

RAMANJULU, S; BARTELS, D. Drought – and desiccation – induced modulation of gene expression in plants. **Plant Cell Environmental**, v. 25, p.141-151, 2002.

RATHINASABAPATHI, B. Metabolic Engineering for Stress Tolerance: Installing Osmoprotectant Synthesis Pathways. **Annals of Botany**, v.86, p.709-716, 2000.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1189-1202, 2004.

RIVERO, R.M. et al. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, v.160, p.315-321, 2001.

ROCHA, G.R. Efeito da temperatura e do potencial hídrico na germinação de sementes de doze cultivares de Feijão- Mungo- Verde [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. Jaboticabal-SP. Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP- **para graduação em Agronomia**, 1996.

SAMPAIO, E.V.S.B.; RODAL, M.J. Fitofisionomias da caatinga. **Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e**

repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga. In: Biodiversidade da caatinga, <http://www.biodiversitas.org/caatinga>, Petrolina, 2000.

SANTOS, S.R.G. Efeito da temperatura na germinação de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (Branquilha). 76f. **Dissertação (Mestrado)** - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 1999.

SAVINO, G. et al. Effects of pre-soaking upon seed vigor and viability during storage. **Seed Science & Technology**, v.7, p.57-64, 1979.

SEKI, M. et al. Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. **Science**, v.296, n.5565, p.141-145, 2003.

SGHERRI, C.L.M.; NAVARRI-IZZO, F. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms. **Physiologia Plantarum**, v.93, p.25-30, 1995.

SILVA, D.N.; MEURER, E.; KAMPF, N. & BORKET, C.M. Mineralogia e formas de potássio em dois latossolos do Estado do Paraná e suas relações com a disponibilidade para as plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.19, n.3, p.433-439, 1995.

SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Germination of *Jacaranda mimosifolia* (D. Don - Bignoniaceae) seeds: effects of light, temperature and water stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.785-792, 2004.

SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated ageing of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, v.91, p.51-55, 1994.

VASCONCELOS, S.M.M. et al. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.7, p.946-949, 2003.

VASCONCELOS, S.M.M. et al. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.56, n.3, p.389-393, 2004.

VERSLUES, P.E. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v.45, n.4, p.523-539, February, 2006.

VIÉGAS, R.A. et al. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.05, n.02, p.216-222, 2001.

VIERLING, E. The role of Heat Shock Proteins in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42 p.579-620, 1991.

VICIENT C. M.; GRUBER, V; DELSENY, N. The Arabidopsis AtEm1 promoter is active in *Brassica napus* L. and is temporally and spatially regulated. **Journal Experimental Botany**, v.52, n.360, p.1587-1591, 2001.

YANCEY, P.H.; CLARKE, M.E.; HAND, S.C.; BOWLUS, R.D.; SOMERO, G.N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v.217, p.1214-1222, 1982.

YEO, A. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.913-929, 1998.

ZHANG, J.; NGUYEN, H.T.; Blum, A. Genetic analysis of adjustment in crop plants. **Journal of experimental botany**, v.50, p.291-302, 1999.

ZHU, J.K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, p.56-71, 2001.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.247-273, 2002.

CAPÍTULO I

INFLUENCIA DA TEMPERATURA NA MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Erythrina velutina* Willd. (LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE)

RESUMO - Influencia da temperatura na mobilização de reservas e germinação de sementes de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) - A temperatura influencia o metabolismo das sementes, alterando processos bioquímicos ou fisiológicos, existindo desta forma temperaturas limitantes e ótimas para a germinação. Objetivou-se avaliar a influência de diferentes temperaturas na germinação e mobilização de reservas em sementes de *E. velutina* espécie nativa do semiárido. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Semiárido- LASESA, Petrolina – PE. Sementes mulungu foram escarificadas, distribuídas em rolos germitest de papel e mantidas em câmaras ajustados para 15, 25, 35 e 40 ° C constante, fotoperíodo de 12 h, durante 10 dias. Foram avaliadas a percentagem, o tempo médio, a velocidade média, índice de velocidade e coeficiente de uniformidade de germinação. As principais macromoléculas (açúcares solúveis totais, açúcares redutores, proteínas solúveis e aminoácidos totais) foram quantificados nos cotilédones, eixo embrionário, parte aérea, raiz e cotilédones de sementes quiescentes. Houve influência da temperatura para todas as variáveis analisadas durante a germinação. A maior taxa de germinação (%) ocorreu em 25°C (99% de sementes germinadas), e média de 2,99 dias. A mobilização dos compostos de reserva analisados nas sementes de *E. velutina* foi fortemente relacionada com a influência das diferentes temperaturas no processo germinativo. A temperatura 25°C foi ótima para a espécie, sendo observado redução dos AST, AR, PT e aumento de AA livres, esses resultados foram bem relacionados com a mobilização das reservas de carbono e nitrogênio para o crescimento do eixo embrionário. A germinação foi inibida em 40 ° C, sendo atribuída a elevada taxa de degradação das macromoléculas nas sementes de mulungu. Todas as variáveis analisadas durante a germinação apresentaram variações em função da temperatura contínua no intervalo de 15 à 40°C.

Palavras-chave: Estresse térmico, germinação, mobilização de reservas, mulungu, caatinga

ABSTRACT - Influence of temperature on reserves mobilization and seeds germination of *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) - The temperature influences the metabolism of seeds by changing physiological or biochemical processes, therefore there is limiting and optimum temperatures for germination. The objective was to evaluate the influence of different temperatures on germination and mobilization of reserves in *E. velutina* seeds, native species the semiarid. The tests were conducted at the Laboratory of Seed Analysis of Embrapa Semiárid- LASESA, Petrolina – PE. Mulungu seeds were scarified, distributed in germitest paper rolls and kept in chambers adjusted for 15, 25, 35 and 40°C constant, photoperiod of 12h, during 10 days. Were assessed the percentage, average time, average speed, index of speed and coefficient of uniformity of germination. The main macromolecules (total soluble sugars, reducing sugars, soluble protein and total amino acids) were quantified in cotyledons, embryo, shoot, root, and cotyledons of quiescent seeds. There was influence of temperature for all variables analyzed during the germination. The highest rate of germination (%) occurred in 25°C (99% seeds germinated), and average of 2,99 days. The mobilization of reserves in seeds of *E. velutina* was strongly related with the influence of different temperatures in germination process. The temperature 25 °C was optimal for the specie, being observed reduction of TS, RS and PT and increase of free AA; all these compounds were well related with the mobilization of carbon and nitrogen for growth the embryonic axis. The germination was inhibited under 40 °C, being attributed to high rate of degradation the macromolecules in mulungu seeds. All variables during germination present variations in continuous function of temperature in the range of 15 to 40 ° C.

Key words: heat stress, germination, mobilization of reserves, mulungu, caatinga

INTRODUÇÃO

Erythrina velutina Willd. (mulungu, suinã, canivete e corticeira), pertencente à família Leguminosae – Papilionoideae é uma espécie nativa do semiárido nordestino, portanto, uma planta que se desenvolve em meio às condições de limitações hídricas e a altas temperaturas na maior parte do ano. Produz, anualmente, grande quantidade de sementes viáveis, sendo este seu principal método de propagação. Além disso, a espécie está ameaçada de extinção devido à forte pressão antrópica, notadamente, pelo modelo exclusivamente extrativista por possuir importância econômica, ecológica e medicinal (LORENZI & MATOS, 2002).

O conhecimento sobre o comportamento germinativo das sementes de espécies florestais nativas é de fundamental relevância para a utilização na restauração de áreas degradadas. Tal conhecimento constitui providência essencial para proteger as espécies contra a ameaça de extinção (LABOURIAU, 1983), para a recomposição da paisagem (ARAÚJO NETO et al., 2003) e para a conservação da biodiversidade regional (CABRAL et al., 2003).

O estudo das condições ideais para a germinação de sementes de uma dada espécie é de grande importância, principalmente pelos diferentes padrões de comportamento que cada espécie pode apresentar. A germinação de sementes é um processo complexo e depende de diversos fatores ambientais, tais como temperatura, luz, umidade, substrato e composição de gases na atmosfera (GHERSA et al., 1992), os quais durante essa fase podem afetar o estabelecimento das comunidades vegetais (VÁSQUES-YANES & OROZCO-SEGOVIA, 1993; GOMES & FERNANDES, 2002). Diversos autores consideram a luz e a temperatura os principais fatores que atuam no controle da germinação (LABOURIAU, 1983; BASKIN & BASKIN, 1988; BEWLEY & BLACK, 1994; BENECH-ARNOLD & SÁNCHEZ, 1995), podendo ser manipulados, a fim de otimizar a porcentagem, a velocidade e a sincronização do processo germinativo, desta forma as plântulas formadas serão mais vigorosas (NASSIF et al., 2004).

O processo de embebição pelas sementes é dependente da temperatura e da quantidade de água disponível, a capacidade de retenção, da água absorvida, determinará o sucesso do processo germinativo (BANSAL et al., 1980; PEREZ & MORAES, 1991). A temperatura influencia o metabolismo das sementes, alterando processos bioquímicos e

fisiológicos, atuando de forma direta nas reações químicas que irão mobilizar ou degradar as reservas armazenadas e na síntese de várias substâncias para o crescimento das plântulas (BEWLEY & BLACK, 1994). Além disso, temperaturas altas e baixas, podem provocar alterações na membrana plasmática (HENDRICKS & TAYLORSON, 1976; THOMPSON, 1977).

Cada espécie possui um espectro de temperaturas em que a germinação das sementes irá ocorrer, existindo temperaturas limitantes e ótimas para a germinação, embora à faixa de 20°C a 30°C mostre-se adequada para a germinação de grande número de espécies subtropicais e tropicais (BORGES & RENA, 1993). A temperatura é responsável não somente pela velocidade de germinação como também pelo percentual final de germinação (CARVALHO et al., 2001; FERRAZ-GRANDE & TAKAKI, 2001; MEDEIROS-SILVA et al., 2002; SOCOLOWSKI & TAKAKI, 2004). A faixa de temperatura na qual as sementes germinam refletem muitas vezes as características térmicas do habitat onde tais espécies ocorrem (MEDINA, 1984).

Considerando-se que o conhecimento sobre as alterações físicas e fisiológicas que ocorrem durante a germinação das sementes de espécies florestais nativas é deficitário objetivou-se com esse trabalho verificar a qualidade fisiológica de sementes de *E. velutina* submetidas a diferentes temperaturas durante a germinação.

METODOLOGIA

Obtenção de sementes

Foram utilizadas sementes de *E. velutina* provenientes de matrizes do Município de Juaí (Lagoa Grande -PE), cujas coordenadas são W 37° 18' 03" S 90° 52' 92" coletadas em outubro de 2009. As sementes foram beneficiadas manualmente, acondicionada em saco plástico transparente (0,15 mm de espessura) e mantidas em temperatura ambiente (30°C±5°C, 56±6% UR) no Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Semiárido – LASESA, Petrolina –PE, local onde foram conduzidos os ensaios.

Teste de germinação

Previamente aos ensaios fisiológicos procedeu-se a escarificação mecânica do tegumento externo das sementes com o auxílio de uma mini-retífica (Western R-40). Em seguida as sementes escarificadas foram submetidas à assepsia utilizando-se solução de hipoclorito de sódio (2%) durante 2 minutos sendo posteriormente lavadas em água destilada. Em seguida as sementes foram acondicionadas em substrato tipo rolos de papel germitest, umedecidos com água destilada com volume correspondente a 2,5 vezes o peso do substrato, adaptadas de Brasil (2009).

Os rolos contendo as sementes foram incubados em germinadores do tipo BOD ajustados a temperaturas constantes de 15, 25, 35 e 40°C, fotoperíodo de 12h de acordo com trabalhos preliminares, por um período de 10 dias consecutivos. A avaliação foi realizada diariamente sendo consideradas germinadas as sementes que protruíram radícula com pelo menos 2 mm de comprimento sendo estas contadas e posteriormente descartadas. As variáveis avaliadas foram: porcentagem de germinação, tempo médio, velocidade média, velocidade de germinação e coeficiente de uniformidade de germinação (SANTANA & RANAL, 2004).

Extração e análise de Macromoléculas

Sementes de mulungu escarificadas foram submetidas a diferentes temperaturas 15, 25, 35 e 40°C em rolos de papel germitest, sendo mantidas em germinador com fotoperíodo de 12h durante 4, 7 e 10 dias. Ao final desses períodos de embebição os cotilédones, embrião, parte aérea, raiz, bem como os cotilédones das sementes quiescentes foram coletados e congelados em *freezer* -20°C até o momento da extração. Simultaneamente a esse procedimento foi avaliado a germinação das sementes a cada período de coleta realizada.

A extração das macromoléculas foi realizada após homogeneização de 0,5 g das amostras coletadas em 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5 e centrifugadas a 10.000 xg durante 20 min a 4°C. A partir do extrato obtido foram determinados os teores de compostos solúveis espectrofotometricamente. Os açúcares solúveis totais (AST) foram determinados através das reações com antrona (MORRIS, 1948; YEMM & WILLIS, 1954); açúcares redutores (AR) foram quantificados utilizando-se o ácido 3,5,

dinitrosalicílico (DNS) para oxidação desses compostos (MILLER, 1959); as proteínas solúveis (PT) foram quantificadas seguindo à metodologia descrita por Bradford (1976) e os aminoácidos totais (AA) foram quantificados segundo metodologia proposta por Rosen (1957).

Delineamento e Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos de temperatura (15, 25, 35 e 40°C) e quatro repetições de 25 sementes. Os dados de porcentagem, tempo médio, velocidade média, índice de velocidade, coeficiente de uniformidade da germinação e das macromoléculas foram analisados mediante análise de variância utilizando o programa Assistat (SILVA, 2006). As diferenças entre as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para efeito da análise de variância, os dados de porcentagem de germinação foram transformados pela função $(x + 0,5)^{0,5}$ foi estabelecido também o erro padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alem da germinação (%), as demais variáveis cinéticas do processo germinativo das sementes de mulungu foram influenciadas pelos diferentes intervalos de temperaturas estudados. A variação não foi significativa somente para a velocidade média de germinação (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (G), tempo médio de germinação (Tm), velocidade média de germinação (Vm), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade na germinação (CUG), de sementes de *Erythrina velutina* submetidas a diferentes temperaturas durante a germinação.

Fonte de variação	G	Tm	Vm	IVG	CUG
F de Tratamentos	577,23*	22,195*	0,695 ^{ns}	111,47*	8,517*
C.V. (%)	5,46	21,45	50,86	12,76	65,96

ns= não significativo, *= significativo a 5%.

O valor mais elevado da porcentagem de germinação (99%) foi obtido em sementes submetidas a germinação na temperatura de 25°C (Figura 1). Para esse tratamento foram

necessários 2,99 dias para que o processo de germinação ocorresse. Pôde-se observar que a temperatura de 15°C também favoreceu a germinação, (92%), contudo, nessas condições o processo ocorreu mais lentamente, sendo necessários 4,54 dias (Tabela 2).

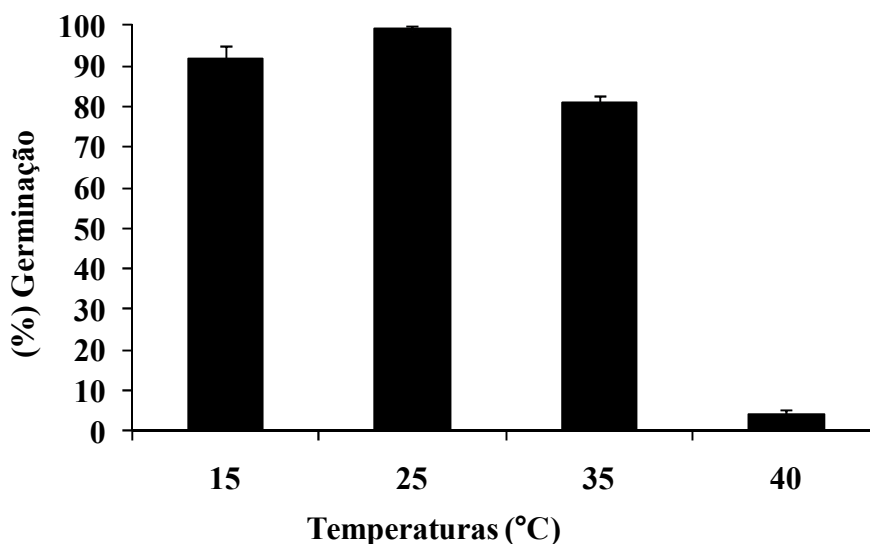


Figura 1. Porcentagem de germinação em sementes de *Erythrina velutina* Willd. submetidas a diferentes temperaturas. Média de quatro repetições \pm EPM.

Em sementes submetidas a temperatura de 35°C não houve diferença estatística para o tempo médio de germinação (Tabela 2), mas causou redução na porcentagem de germinação para 81% (Figura 1), embora seja uma taxa elevada de germinação. Os resultados permitem constatar que o tempo médio, o índice de velocidade de germinação e o coeficiente de uniformidade são fatores mais sensíveis às variações da temperatura. Desta forma, o conceito de temperatura ótima de germinação, deve considerar outros parâmetros cinéticos além da porcentagem final de germinação.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com as afirmações de Bewley & Black (1994), que afirma que, a temperatura afeta tanto a capacidade quanto a velocidade de germinação. As sementes têm a capacidade de germinar dentro de uma determinada faixa de temperatura, característica para cada espécie, mas o tempo necessário para se obter a porcentagem máxima de germinação é dependente da temperatura.

Resultados demonstrando o efeito da temperatura na germinação de outras espécies leguminosas também foram descritos por Varela et al. (2005) com itaubarana (*Acosmium nitens* (Vog.) Yakovlev) uma Caesalpinioideae, onde para os valores de porcentagem de germinação, a temperatura de 25°C foi significativamente superior quando comparada a 20, 30 e 35°C. Souza Filho, (2000) verificou que a temperatura de 35°C proporcionou melhor porcentagem e velocidade de germinação para sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit). Em sementes de monjoleiro (*Acacia polyphylla* DC.) uma mimosoideae, a germinação foi prejudicada na temperatura de 15°C, os melhores valores de germinação foram obtidos também a 25°C para essa espécie (ARAÚJO NETO et al., 2003). Segundo Valadares et al. (2008) em sementes de coração- de -negro (*Poecilanthe parviflora* Benth.) a germinação pode ser conduzida de forma satisfatória nas temperaturas constantes de 25°C ou 30°C.

Tabela 2. Tempo médio (Tm, dias), velocidade média (Vm, dias⁻¹), índice de velocidade de germinação (IVG, protrusão de radícula.dia⁻¹) e coeficiente de uniformidade na germinação (CUG) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a diferentes temperaturas durante a germinação.

Tratamentos (°C)	Tm	Vm	IVG	CUG
15	4,54 b	0,22 a	5,99 b	0,35 bc
25	2,99 c	0,34 a	9,04 a	1,43 ab
35	2,94 c	0,34 a	7,43 b	1,85 a
40	5,85 a	0,17 b	3,18 c	0,25 c

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com Carvalho & Nakagawa (1988), temperaturas inferiores ou superiores à ótima, tendem a reduzir a velocidade do processo germinativo, expondo as sementes por um maior período a fatores adversos, o que pode levar à redução no total de germinação. Os valores obtidos na temperatura de 40°C corroboram com essa afirmação, verificou-se que todas as variáveis foram reduzidas exceto para o tempo médio de germinação, revelando-se desta forma estatisticamente inferior as demais (Figura 1 e Tabela 2).

O efeito da temperatura na germinação de sementes arbóreas nativas é bastante variável, a temperatura adequada para a germinação de sementes arbóreas nativas vem sendo determinada por alguns pesquisadores ao longo dos últimos anos (RANDI & FELIPPE, 1981; PEREZ & MORAES, 1990; LEAL FILHO & BORGES, 1992;

VALADARES et al., 2008; LIMA, et al., 2011) onde a faixa de 20°C a 35°C mostra-se adequada para a germinação de várias espécies.

O resultados obtidos para a mobilização de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), proteínas totais (PT) e aminoácidos (AA), em sementes submetidas a diferentes temperaturas durante o período de embebição estão representadas nas Figuras 2 a 5.

Assim como o estabelecimento de uma determinada espécie está ligado à capacidade de suas sementes germinarem rápida e uniformemente, a fim de vencer a concorrência com outras espécies, ou pela capacidade de se manterem viáveis por períodos mais longos, até que as condições ambientais sejam propícias ao desenvolvimento das plântulas, a espécie pode lançar mão de outros meios adaptativos, como a mobilização de determinadas reservas que serão úteis para a formação de estruturas físicas, como a parede celular, ou para respiração, sintetizando intermediários metabólicos com finalidades diversas.

A mobilização dos compostos de reservas analisados nas sementes de *E. velutina* foi diretamente influenciado pelas diferentes temperaturas no processo germinativo. Essas relações evidenciam a mobilização dos compostos de reserva dos cotilédones (fonte) e sua translocação para outros órgãos (dreno) nas temperaturas de 15, 25 e 35°C (Figuras 2 a 5).

Ocorreu um decréscimo nos teores AST entre 4 e 10 dias de embebição, período em que se observou diminuição do processo de mobilização de reservas (Figura 2) e acúmulo no teor de AR, nas temperaturas de 15 e 35°C (Figura 3). Nessas temperaturas o processo de mobilização de AST e AR não foram impedidos, pois além de apresentarem a mesma tendência de mobilização, os valores obtidos foram semelhantes aos de 25°C. Nota-se que as sementes submetidas a 15 e 35°C apresentaram uma modificação no padrão de mobilização a partir do 4º dia de embebição o qual, pode ser relacionado à alteração no processo germinativo influenciado pelas temperaturas.

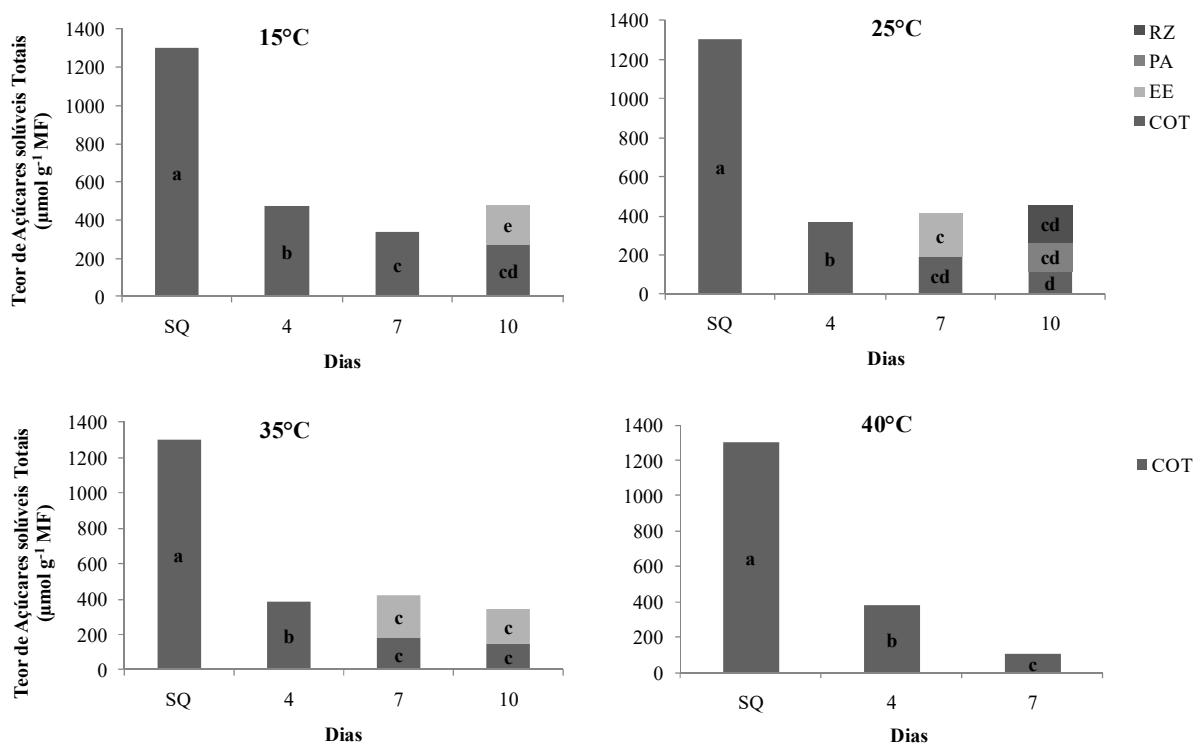


Figura 2. Teores de Açúcares Solúveis Totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a diferentes temperaturas durante a germinação.

Sementes de mulungu submetidas a 40°C têm seu processo germinativo inibido uma vez que esta temperatura bloqueia a mobilização das reservas e conseqüentemente todo o processo de germinação, além de promover a degradação de AST e AR na espécie, podendo ser considerada uma temperatura crítica de germinação (Figuras 2 e 3).

A temperatura de 25°C foi aquela que proporcionou a melhor relação entre a redução dos AST e AR com a mobilização das reservas de carbono para o crescimento do eixo embrionário (Figuras 2 e 3, respectivamente).

Resultados constatados por Buckeridge et al. (1992), em sementes de *Copaifera langsdorfii* Desf, indicam que ocorre redução no conteúdo de açúcares solúveis durante e após a germinação, ressaltando a importância da mobilização dessas reservas da semente durante o desenvolvimento inicial das plântulas. Esse processo ocorre porque a germinação

da semente é iniciada graças às reservas próprias do embrião e depois mantida com o consumo dos componentes dos tecidos de reserva, pela atividade enzimática e pelo fluxo dos componentes solúveis às regiões de crescimento onde há rápido consumo (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

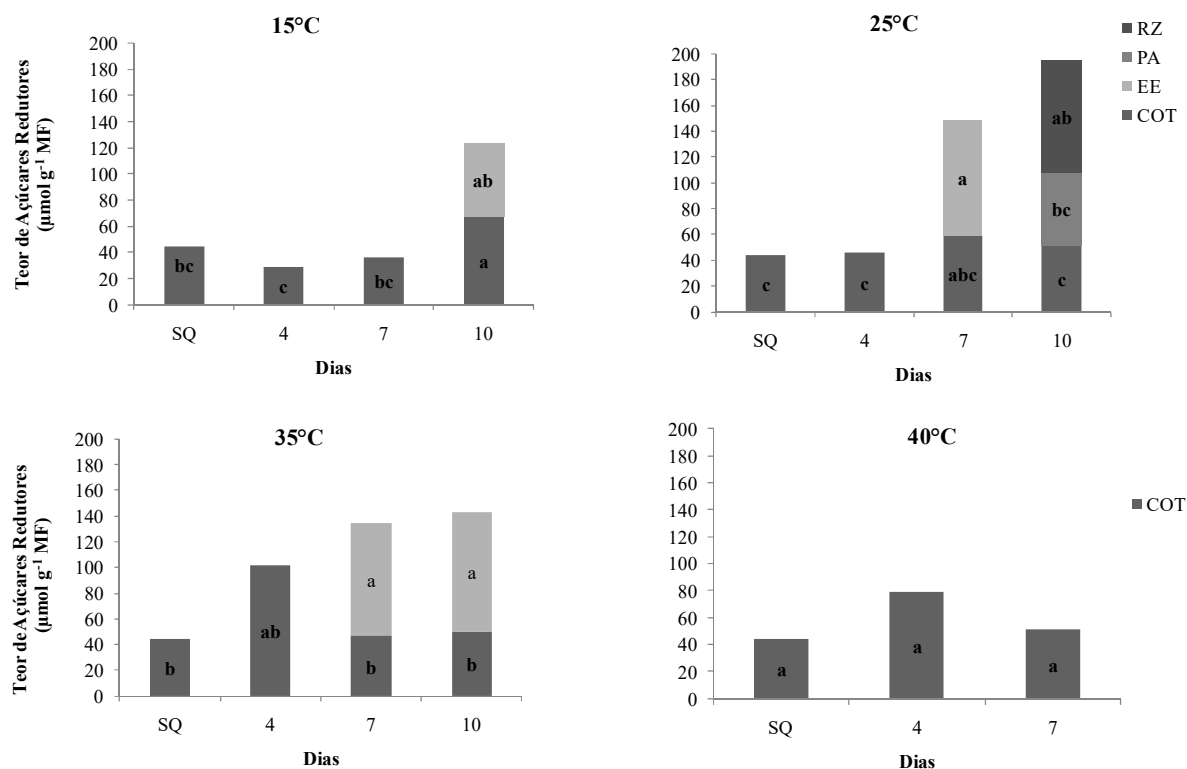


Figura 3. Teores de Açúcares Redutores Totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a diferentes temperaturas durante a germinação.

Autores como Borges et al. (2002) e Buckridge & Dietrich (1996) verificaram o consumo de sacarose e rafinose durante a germinação das espécies *Platymiscium pubescens* e *Sesbania marginata*, respectivamente, como as duas primeiras reservas de açúcares solúveis a serem utilizadas, sendo esses oligossacarídeos compostos de glicose, frutose e galactose. Assim também Nkang (2002) observou decréscimo no teor dos carboidratos solúveis nos cotilédones de sementes de *Guilfoylia monostylis* (Benth.)

F.Muell. no período inicial da germinação. Contudo, no eixo embrionário de sementes de *Euphorbia heterophylla* L., o conteúdo permaneceu inalterado até 36 horas de embebição (SUDA & GIORGINI, 2000), enquanto em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth, os teores diminuíram continuamente durante a germinação (CORTE et al., 2006).

Os oligossacarídeos da família da rafinose são citados por Guimarães et al. (2001) como a fonte de energia utilizada durante a germinação, o que explicaria os aumentos verificados nos AR submetidos as temperaturas de 25 e 35°C (Figura 3). A queda significativa nos teores de AST explica os resultados de AR obtidos nas sementes de mulungu.

Sérios distúrbios podem ocorrer nas células em virtude da perda dos açúcares redutores, porque alguns desses açúcares são importantes intermediários na rota metabólica da fotossíntese e da respiração celular, enquanto outros são componentes estruturais de ácidos nucléicos, além de constituírem blocos básicos da construção de muitos outros carboidratos, incluindo amido e celulose (SALISBURY & ROSS, 1992).

Os resultados referentes à quantificação de proteínas solúveis e aminoácidos totais estão apresentados nas Figuras 4 e 5. Os teores de PT e AA em relação às sementes quiescentes variaram de acordo com a temperatura e o período de embebição. Pode-se verificar que as sementes apresentaram melhor comportamento quando submetidas a 25°C em que se observou a mobilização das reservas para o crescimento da plântula com decréscimo de PT e aumento de AA livres (Figuras 4 e 5). Observou-se que a 25°C, após embebição de 7 dias, o conteúdo de PT nos cotilédones foi semelhante ao de 4 dias, contudo, houve detecção de PT no eixo embrionário somente após esse período. Assim, essa temperatura proporcionou condição adequada ao metabolismo germinativo das sementes, pela maior mobilização de moléculas iniciais para a síntese de proteínas funcionais e estruturais no eixo embrionário de 7 dias, coincidindo com a maior e mais rápida emissão de radícula pelas sementes de mulungu (Figura 4).

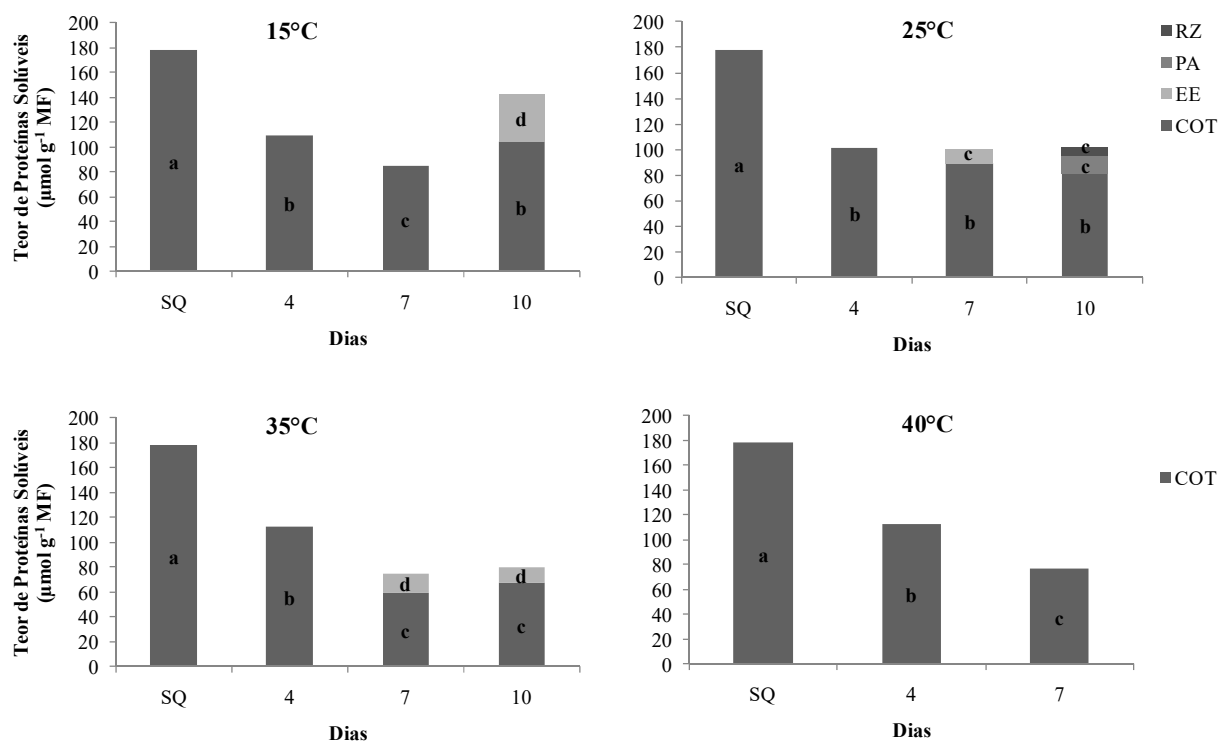


Figura 4. Teores de Proteínas Solúveis ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a diferentes temperaturas durante a germinação.

Resultados diferentes foram observados para sementes submetidas a 15 e 35°C cujos níveis de PT e AA indicam diretamente à alteração do processo germinativo. Na temperatura de 15°C houve atraso na mobilização de proteínas e aminoácidos, retardando a protrusão radicular e inibindo o crescimento. Por outro lado, não houve atraso da protrusão da radícula a 35°C, no entanto, esta temperatura induziu a desnaturação e degradação das PT e menor mobilização dos AA, promovendo uma inibição do crescimento da plântula (Figuras 4 e 5, respectivamente).

Constatou-se que a temperatura que promoveu estresse acentuado à espécie foi 40°C devido à inibição do processo germinativo acompanhado pela degradação, sem mobilização, das PT e AA ao longo dos períodos de embebição (Figuras 4 e 5, respectivamente).

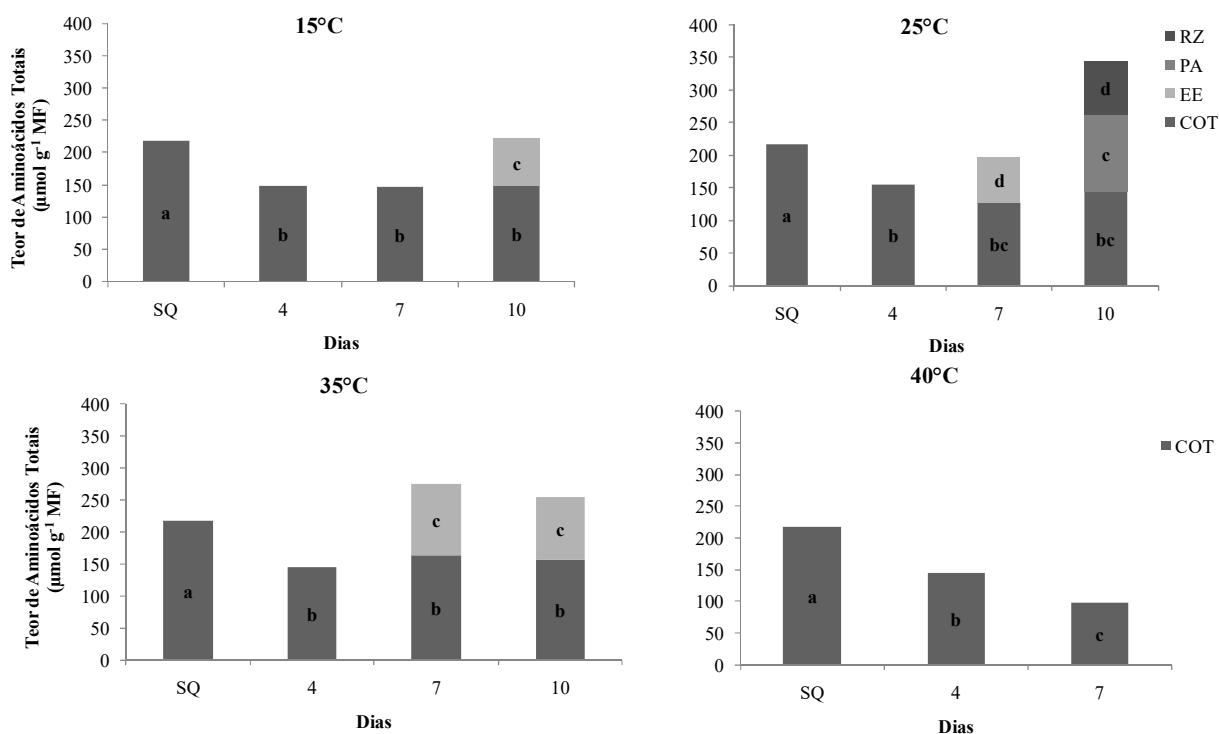


Figura 5. Teores de Aminoácidos Totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a diferentes temperaturas durante a germinação.

Segundo Marcos Filho (2005), durante o processo de deterioração de sementes ocorre decréscimo do teor e da síntese de proteínas, acréscimo do teor de aminoácidos, decréscimo do conteúdo de proteínas solúveis e desnaturação provocada por temperaturas altas. A temperatura atua sobre a semente de diferentes maneiras. Age mantendo uma situação favorável para as reações metabólicas durante a germinação, sendo a velocidade dessas reações diretamente proporcional a temperatura, existindo uma temperatura ótima para cada espécie. No entanto, se a temperatura atingir níveis altos, por volta dos 40°C (COPELAND & MCDONALD, 2001) a germinação raramente ocorre, devido ao efeito prejudicial que a alta temperatura possui sobre as vias metabólicas, principalmente alterando a estrutura tridimensional de proteínas.

Por outro lado, a baixa temperatura também prejudica a germinação das sementes, por conta da inativação de enzimas, mudança de fase da membrana, e redução da taxa

metabólica, até o ponto onde as vias essenciais para a germinação da semente não possam mais operar (HENDRICKS & TAYLORSON, 1976; MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989), no entanto, nem sempre temperaturas altas e baixas prejudicam a germinação.

Com base nos resultados obtidos e na importância de estudos dessa natureza, principalmente pelo fato da espécie estar inserida em ambiente propenso a condições de seca e altas temperaturas na maior parte do ano, recomenda-se a realização de novos estudos, utilizando outros tipos de estresse.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- A temperatura ótima de germinação das sementes de *Erythrina velutina* é de 25°C;
- O tempo médio, índice de velocidade de germinação e o coeficiente de uniformidade são fatores mais sensíveis às variações da temperatura que o percentual de germinação para a espécie em estudo;
- A temperatura estressante em que o processo germinativo é inibido é de 40°C;
- O processo de mobilização e degradação de reservas das sementes foi totalmente influenciado pelas temperaturas baixas e elevadas aplicadas;
- Na temperatura de 40°C a degradação das macromoléculas não foi utilizada para crescimento do eixo embrionário, refletindo na menor taxa de germinação de sementes de mulungu.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO NETO, J.C.; AGUIAR, I.B.; FERREIRA, V.M. Efeito da temperatura e da luz na germinação de sementes de *Acacia polyphylla* DC. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.2, p.249-256, jun. 2003.
- BANSAL, R.P.; BHATI, P.R.; SEM, D.N. Differential specificity in water inhibition of Indian arid zone. **Biologia Plantarum**, v.22, n.5, p.327-31, 1980.
- BASKIN, C.C.; BASKIN J.M. **Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 1998. 666p.
- BENECH-ARNOLD, R.L.; SÁNCHEZ R.A. Modeling weed seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Eds.) **Seed development and germination**. Dekker, New York, 1995. p.545-566.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York and London: Plenum Press, 1994. 445p.
- BORGES, E.E.L. et al. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (tamboril da mata). **Revista Árvore**, v.26, n.5, p.603-613, set./out. 2002.
- BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑARODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coord.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, p.83-136, 1993.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa da Agropecuária. Brasília: 2009, 395 p.
- BUCKERIDGE, M.S. et al. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. **Physiologia Plantarum**, v.86, p.145-151, 1992.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. Mobilization of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth (Leguminosae- Faboideae). **Plant Science**, v.117, p.33-43, 1996.

CABRAL, E.L.; BARBOSA, D.C.A.; SIMABUKURO, E.A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth. & hook. f. ex. s. Moore. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n. 4, p.609-617, 2003.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3ª ed. Fundação Cargill, Campinas. 1988.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CARVALHO, P.G.B. de; et al. Temperature dependent germination and endo-bmannanase activity in sesame seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.139-148, 2001.

COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. **Principles of Seed Science and Technology**, Kluwer Academic Publishers, Norwell, 2001, 467p.

CORTE, B.V. et al. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, v.30, n.6, p.941-949, nov./dez. 2006.

FERRAZ-GRANDE, F.G.A.; TAKAKI, M. Temperature dependent seed germination of *Dalbergia nigra* Allem (Leguminosae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, p.401-404, 2001.

GHERSA, C.M. et al. Seed dispersal, distribution and recruitment of seedlings of *Sorghum halepense* (L.) Pers. **Weed Research**, v.33, n.1, p.79–88, 1993.

GOMES, V.; FERNANDES, G.W. Germinação de sementes de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.16, p.421-427, 2002.

GUIMARÃES, V.M. et al. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v.58, p.67-73, 2001.

HENDRICKS, S.B.; TAYLORSON, R.B. Variation in germination and aminoacid leakage of seeds with temperature related to membrane phase change. **Plant Physiology**, v.58, n.1, p.7-11, 1976.

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

LEAL FILHO, N.; BORGES, E.E.L. Influência da temperatura e da luz na germinação de sementes de canudo de pito (*Mabea fistulifera* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.14, p.57-60, 1992.

LIMA, C.R. et al. Temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* TUL. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.2, p.216-222, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

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

MAYER, A.C.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. London: PergamonPress, 1989. 270p.

MEDEIROS-SILVA, L.M. de; RODRIGUES, T.J.D. de; AGUIAR, I.B. de. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Árvore**, v.26, p.691-697, 2002.

MEDINA, E. Nutrient balance and physiological processes at the leaf level. In: *Physiological Ecology of Plants of the Wet Tropics*. (MEDINA, E.; MOONEY, H. A.; VFIZQUEZ-YÃNES eds.) **Tasks in Vegetation Science**. p.139-154, 1984.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MORRIS, D.L. Quantitative determination of carbohydrates with Drywood's anthrone reagent. **Science**, v.107, p.254-255, 1948.

NASSIF, S.M.L.; VIEIRA, I.G.; FERNANDES, G.D. **Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação de sementes.** Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.html>>. Acesso em: 03 out. 2011.

NKANG, A. Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). **Plant Physiology**, v.159, n.5, p.473-483, 2002.

PEREZ, S.C.J.G.A.; MORAES, J.A.P.V. Influências da temperatura, da interação da temperatura-giberelina e do estresse térmico na germinação de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.2, p.41-53, 1990.

PEREZ, S.C.J.G.A.; MORAES, J.A.P.V. Influência do estresse hídrico e do pH no processo germinativo da algarobeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, n.7, p.981-988, 1991.

PRITCHARD, S.L.; CHARLTON, W.L.; BAKER, A.; GRAHAM, I.A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.31, n.5, p.639-647, 2002.

RANDE, A.M.; FELIPPE, G.M. Efeito da temperatura, luz e reguladores de crescimento na germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. **Ciência e Cultura**, v.33, p.404-411, 1981.

ROSEN, H. A modified ninhydrin calorimetric analysis for amino acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.67, p.10-15, 1957.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. California: Wadsworth, Inc. 1992. 682p.

SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. **Análise da Germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004, 248p.

SILVA, F. DE A.S.E.; AZEVEDO, C.A.V. DE. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, p.393-396, 2006.

- SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v.28, p.1057-1060, 1989.
- SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Germination of *Jacaranda mimosifolia* (D. Don - Bignoniaceae) seeds: effects of light, temperature and water stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.785-792, 2004.
- SOUZA FILHO, A.P.S. Influência da temperatura, luz e estresses osmótico e salino na germinação de sementes de *Leucaena leucocephala*. **Pasturas Tropicales**, v.22, n.2, p.47-53, 2000.
- SUDA, C.N.K.; GIORGINI, J.F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, n.3, p.226-245, 2000.
- THOMPSON, K.; GRIME, J.P.; MASON, G. Seed germination in response to diurnal fluctuation of temperature. **Nature**, v.267, p.147-149, 1977.
- VALADARES, J.; DE PAULA, R.C. Temperaturas para Germinação de Sementes de *Poecilanthe parviflora* Bentham (FABACEA- FABOIDEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.2, p.164-170, 2008.
- VAN RENSBURG, L.; KRÜGER, G.H.J.; KRÜGER, H. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum*. **Journal of Plant Physiology**, v.141, p.188-194, 1993.
- VARELA, V.P.; COSTA, S.S.; RAMOS, M.B.P. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de itaubarana (*Acosmium nitens* (Vog.) Yakovlev) – Leguminosae, Caesalpinoideae. **Acta Amazônica**, v.35, n.1, p.35-39, 2005.
- VÁSQUES-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rain forest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.24, p.69-87, 1993.
- YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v.57, p.508-514, 1954.

CAPÍTULO II

EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO NA MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Erythrina velutina* Willd. (LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE)

RESUMO - Efeito do estresse hídrico na mobilização de reservas e germinação de sementes de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) – Alguns factores ambientais podem influenciar a germinação de sementes, entre eles a disponibilidade de água é a mais importante. Este estudo investigou a germinação e mobilização de reservas de sementes de *E. velutina*, submetidas a diferentes potenciais osmóticos. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Semiárido- LASESA, Petrolina – PE. As sementes escarificadas foram embebidas em soluções teste de PEG preparadas em potenciais osmóticos 0,0; -0,2; -0,4; -0,6 e -0,8 MPa dispostas em rolos de papel e mantidas em germinador ajustado para 25°C, fotoperíodo de 12h durante 10 dias. Foram avaliadas a porcentagem, tempo médio, velocidade média, índice de velocidade de germinação e coeficiente de uniformidade de germinação. As principais macromoléculas (açúcares solúveis totais, açúcares redutores, proteínas solúveis e aminoácidos totais) foram quantificados nos cotilédones, eixo embrionário, parte aérea e da raiz de sementes embebidas e nos cotilédones de sementes quiescentes (controle). Houve influência do potencial osmótico na germinação de sementes de mulungu. A germinação (%) permaneceram em níveis elevados até -0,6 MPa, acima deste potencial a germinação foi bloqueada. A velocidade de germinação foi menor em potenciais osmóticos mais negativos, sendo necessário um tempo mais longo para protrusão da radícula nas sementes. A mobilização de reservas de carbono e nitrogênio em sementes de mulungu também foi influenciada pelo estresse hídrico. Houve sensibilidade entre -0,2 e -0,6 MPa, no entanto, a degradação e mobilização de macromoléculas foi mais lenta quando o potencial osmótico foi diminuído.

Palavras-chave: PEG 6000, germinação, mobilização de reservas, mulungu, caatinga

ABSTRACT - Effect of water stress on mobilization and germination of *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) seeds – Some environmental factors can influence the seed germination, among them the availability of water is the most important. This study investigated the germination of *E. Velutina* seeds submitted to different osmotic potential and reserve mobilization during water stress. The tests were conducted at Laboratory of Seed Analysis of Embrapa Semiárid - LASESA, Petrolina – PE. The seeds scarified were soaked in PEG solutions prepared on osmotic potentials 0,0, -0,2, -0,4, -0,6 and -0,8 MPa and arranged in paper roll and kept in chamber adjusted for 25°C, photoperiod of 12h, during 10 days. Were assessed the percentage, average time, average speed, index of speed of germination and coefficient of uniformity of germination. The main macromolecules (total soluble sugars, reducing sugars, soluble protein and total amino acids) were quantified in cotyledons, embryo, shoot and root of seeds soaked and cotyledons of quiescent seeds (control). There was influence of osmotic potential on Mulungu seed germination. The germination (%) remained at high levels until -0,6 MPa, above this potential the germination was blocked. The speed of germination was lower in osmotic potential more negative, and the seeds required a longest time to radicle protrusion. The mobilization of stored carbon and nitrogen in mulungu seeds was also influenced by water stress. They were more sensitivity between -0.2 and -0.6 MPa, however the degradation of macromolecules and mobilization was slower when osmotic potential was decreased.

Key words: PEG 6000, germination, mobilization of reserves, mulungu, caatinga

INTRODUÇÃO

A seca é um fenômeno freqüente e característico do Brasil, com intensidade e efeitos variáveis no espaço e no tempo. A situação geográfica do território brasileiro é favorável à ocorrência de episódios de seca e sendo esta desencadeada por persistente ausência de pluviometria significativa, a variabilidade espacial da precipitação torna muito mais freqüentes as ocorrências de fenômenos regionais de seca.

Como parte do Semiárido nordestino, a Caatinga é um dos maiores biomas brasileiros, ocupando uma área com cerca de 734.478 Km². O clima nessa região, chamada “Polígono das Secas”, é semiárido, quente com baixa pluviosidade, em torno de 250 a 800 mm anuais. A quantidade de chuvas pode variar, alcançando em anos de muitas chuvas até 1.000 mm ano⁻¹ e em anos de seca, apenas 200 mm ano⁻¹, em certas regiões (MAIA, 2004). Apresenta médias anuais elevadas de temperatura (28°C) e evaporação (2.000 mm) (ARAÚJO & FERRAZ 2003). Além dessas condições climáticas rigorosas, a região está submetida a ventos fortes e secos, que contribuem para a aridez da paisagem nos meses de seca (SAMPAIO & RODAL, 2000).

Com uma grande diversidade biológica e alto nível de endemismo, o semiárido nordestino abriga uma ampla gama de espécies adaptadas a este tipo de clima. Muitas plantas, sobretudo as perenes, se ajustam a periodicidade do regime climático tornando-se decíduas no período seco, sendo esta uma estratégia positiva adotada para economia de água. Outras plantas adotam escapar do rigor do período seco, tendo todo o seu ciclo de vida concentrado no período chuvoso, o que ocorre principalmente com as ervas terófitas (ARAÚJO et al., 2002; ARAÚJO & FERRAZ, 2003). É significativo o nível de conhecimento relativo às características de adaptação vegetativa das espécies vegetais as condições ambientais da caatinga, mas pouco se sabe sobre os mecanismos de adaptação das sementes dessas espécies a tais condições.

De acordo com Nonogaki et al. (2010), a germinação é um processo complexo em que a semente deve recuperar-se rapidamente da secagem sofrida no final do processo de maturação, retomando uma intensidade sustentada do metabolismo, que proporcione eventos celulares essenciais para permitir a emergência do embrião, e se preparar para o crescimento subsequente das mudas. O início desse processo se dá pela absorção de água

pela semente seca até que todas as matrizes e os conteúdos celulares estejam completamente hidratados.

Fatores que interferem na germinação de sementes de espécies arbóreas tropicais podem ser controlados geneticamente ou pelo ambiente. Entre os fatores controlados pelo ambiente, o mais crítico é a ausência de condições ótimas para a germinação e o estabelecimento de plântulas (BARBEDO & MARCOS FILHO, 1998).

Khajeh-Hosseini et al. (2003) afirmam que, dos diversos fatores ambientais capazes de influenciar o processo germinativo, a disponibilidade de água é um dos mais importantes. Isto se torna mais evidente, considerando as plantas cultivadas em regiões de escassez de chuvas. Assim, a disponibilidade hídrica é vista como um fator limitante à iniciação da germinação de sementes e estabelecimento de plântulas no campo. Isso porque afeta diretamente as relações hídricas em sementes e subsequente desenvolvimento de plântulas, implicando direta ou indiretamente em todas as demais etapas do metabolismo, incluindo reativação do ciclo celular e crescimento (ROCHA, 1996; DE CASTRO et al., 2000).

Segundo Larcher (2000), um dos métodos mais difundidos para determinação da tolerância das plantas aos estresses abióticos é a observação da capacidade germinativa das sementes nestas condições. A fim de serem simuladas condições padronizadas de estresse hídrico em condições de laboratório, estudos de germinação têm sido realizados com a utilização de soluções aquosas de polietilenoglicol (PEG), por serem compostos químicos inertes e não tóxicos (MURILLO-AMADOR et al., 2002; FANTI & PEREZ, 2004).

Considerando que a qualidade do processo germinativo é influenciada pela condição hídrica do meio e que existem poucas informações, na literatura disponível, sobre o emprego do polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) e seus efeitos na germinação de sementes de mulungu (*E. velutina*), espécie que se propaga principalmente por sementes e encontra-se submetida a essa condição ambiental, objetivou-se com esse trabalho estudar a qualidade fisiológica das sementes, submetidas a diferentes níveis de potenciais osmóticos induzidos por PEG-6000 na fase de germinação.

METODOLOGIA

Obtenção de sementes

Foram utilizadas sementes de *E. velutina* provenientes de matrizes do Município de Juitá (Lagoa Grande -PE), cujas coordenadas são W 37° 18' 03" S 90° 52' 92" coletadas em outubro de 2009. As sementes foram beneficiadas manualmente, acondicionada em saco plástico transparente (0,15 mm de espessura) e mantidas em temperatura ambiente (30°C±5°C, 56±6% UR) no Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Semiárido – LASESA, Petrolina –PE, local onde foram conduzidos os ensaios.

Teste de germinação

Previamente aos ensaios fisiológicos procedeu-se a escarificação mecânica do tegumento externo das sementes com o auxílio de uma mini-retífica (Western R-40). Em seguida as sementes escarificadas foram submetidas à assepsia utilizando-se solução de hipoclorito de sódio comercial (2%) por 2 minutos sendo posteriormente lavadas em água destilada. As sementes foram acondicionadas, após a assepsia, em substrato tipo rolos de papel germitest, umedecidos com soluções teste de PEG 6000 em diferentes potenciais osmóticos 0,0; -0,2; -0,4; -0,6 e -0,8 MPa, preparadas de acordo com Villela et al. (1991), em volume correspondente a 2,5 vezes o peso do substrato. Os rolos contendo as sementes foram incubados em germinadores a 25°C, fotoperíodo de 12h por um período de 15 dias consecutivos.

Foram consideradas germinadas as sementes que protruíram radícula com pelo menos 2 mm de comprimento sendo estas contadas diariamente. As variáveis avaliadas foram: porcentagem de germinação, tempo médio, velocidade média, velocidade de germinação e coeficiente de uniformidade de germinação (SANTANA & RANAL, 2004).

Teste de Germinação de Recuperação

As sementes que não germinaram ao final do período analisado foram lavadas em água destilada e acondicionadas em rolos de papel germitest, umedecidos com água destilada em volume correspondente a 2,5 vezes o peso do substrato, adaptadas de Brasil (2009), sendo estes incubados em germinadores a 25°C, fotoperíodo de 12h. Foram consideradas germinadas as sementes que protruíram radícula com pelo menos 2 mm de

comprimento sendo estas contadas diariamente. As variáveis avaliadas foram: porcentagem de germinação relativa e tempo médio de germinação (SANTANA & RANAL, 2004).

Extração e análise de Macromoléculas

Sementes de mulungu escarificadas foram submetidas a diferentes potenciais osmóticos 0,0; -0,2 e -0,6 MPa em rolos de papel germitest, sendo mantidas em germinador com fotoperíodo de 12h durante 2, 4, 7 e 10 dias. Ao final desses períodos de embebição os cotilédones, embrião, parte aérea, raiz, bem como os cotilédones das sementes quiescentes foram coletados e congelados em *freezer* -20°C até o momento da extração. Simultaneamente a esse procedimento foi avaliado a germinação das sementes a cada período de coleta realizada.

A extração das macromoléculas foi realizada após homogeneização de 0,5 g das amostras coletadas em 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5 e centrifugadas a 10.000 xg durante 20 min a 4°C. A partir do extrato obtido foram determinados os teores de compostos solúveis espectrofotometricamente. Os açúcares solúveis totais (AST) foram determinados através das reações com antrona (MORRIS, 1948; YEMM & WILLIS, 1954); açúcares redutores (AR) foram quantificados utilizando-se o ácido 3,5, dinitrosalicílico (DNS) para oxidação desses compostos (MILLER, 1959); as proteínas solúveis (PT) foram quantificadas determinadas obedecendo à metodologia descrita por Bradford (1976) e os aminoácidos totais (AA) foram quantificados segundo metodologia proposta por Rosen (1957).

Delineamento e Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado composto por cinco tratamentos de potenciais osmóticos (0,0; -0,2; -0,4; -0,6 e -0,8 MPa) e quatro repetições de 25 sementes. Os dados de porcentagem, tempo médio, velocidade média, índice de velocidade, coeficiente de uniformidade da germinação e das macromoléculas foram analisados mediante análise de variância utilizando o programa Assistat (SILVA, 2006). As diferenças entre as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para efeito da análise de variância, os dados de porcentagem de germinação foram transformados pela função $(x + 0,5)^{0,5}$ foi estabelecido também o erro padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da análise de variância, todas as variáveis analisadas no processo germinativo foram influenciadas pelos diferentes potenciais osmóticos aplicados às sementes de *E. velutina*.

Tabela 1. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (G), tempo médio de germinação (Tm), velocidade média de germinação (Vm), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade na germinação (CUG) de sementes de *Erythrina velutina* Willd. submetidas a estresse hídrico durante a germinação.

Fonte de variação	G	TM	VM	IVG	CUG
F de Tratamentos	285,50*	283,80*	85,43*	67,06*	11,65*
C.V. (%)	5,73	7,52	13,35	15,65	42,39

ns= não significativo, *= significativo a 5%.

A porcentagem de germinação permaneceu em níveis elevados até o potencial de -0,6 MPa, acima desse valor o processo germinativo foi inibido em função da restrição hídrica promovida (Figura 1).

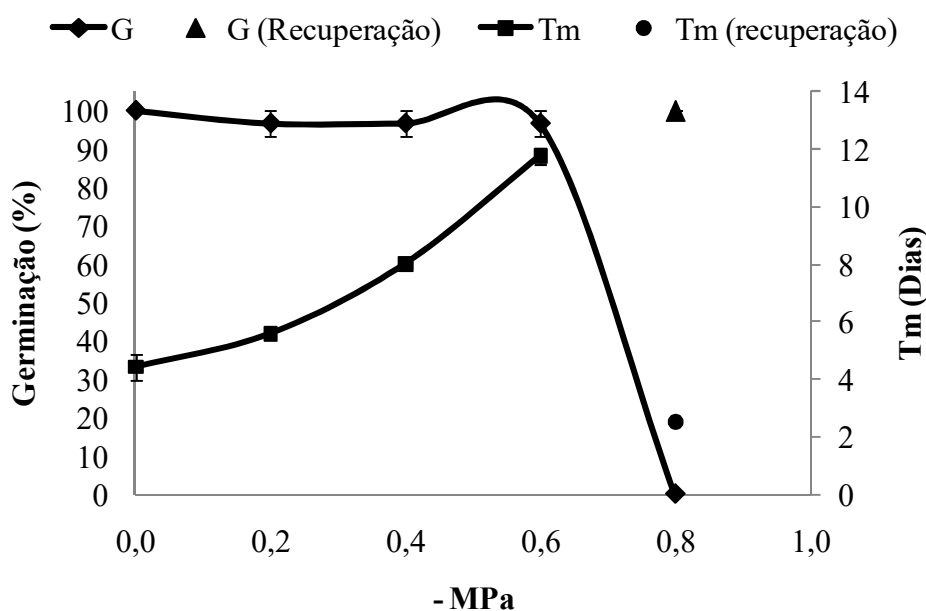


Figura 1. Porcentagem e tempo médio de germinação em sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a estresse hídrico e posterior recuperação. Média de quatro repetições \pm EPM.

Quando restabelecidas as condições adequadas para germinação às sementes submetidas ao potencial de -0,8 MPa germinaram 100% (Figura 1). Com este resultado fica evidente que, neste potencial as sementes não perderam a viabilidade e nem entraram em dormência. Esse tipo de resposta passa a ser bastante interessante em espécies que quando submetidas a estresses hídricos mais severos e que logo após as condições se restabelecerem, mostram a capacidade de germinarem numa velocidade ainda maior, quando comparada com as sementes controle (sem restrição hídrica), possibilitando a sobrevivência das sementes e da espécie.

De acordo com Bewley & Black (1994), o estresse hídrico em condições naturais, pode atuar de forma positiva no estabelecimento das espécies, pois provoca um atraso considerável no tempo de germinação das sementes. Dessa forma, a germinação é distribuída no tempo e no espaço, aumentando a probabilidade das plântulas encontrarem condições ambientais adequadas ao estabelecimento e desenvolvimento.

A influência da restrição hídrica imposta pelos potenciais osmóticos de -0,2 à -0,6 MPa, ficou evidente nas demais variáveis analisadas. Observou-se maior velocidade de germinação para o controle (0,0) (Tabela 2) e a medida que reduziu-se o potencial osmótico da solução, foi necessário maior tempo para a semente intumescer e germinar, resultando em menor velocidade média de germinação. A melhor taxa de uniformidade na germinação das sementes foi obtida no potencial de -0,2 MPa (Tabela 2).

Tabela 2. Germinação (G, %), tempo médio (Tm, dias), velocidade média (Vm, dias⁻¹), velocidade de germinação (IVG, protrusão de radícula.dia⁻¹) e coeficiente de uniformidade na germinação (CUG) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a estresse hídrico durante a germinação.

Tratamentos (MPa)	G	Tm	Vm	IVG	CUG
0,0	100 a	4,43 c	0,23 a	2,49 a	0,78 bc
-0,2	96 a	5,59 c	0,18 b	1,77 b	1,63 a
-0,4	96 a	8,02 b	0,12 c	1,27 bc	0,35 bc
-0,6	96 a	11,77 a	0,08 c	0,83 c	0,95 ab

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Rosa et al. (2005) apresentam claramente a dificuldade imposta pelos potenciais mais elevados na germinação de timbó (*Ateleia glazioviana* Baill), quando a partir de -0,4

MPa observou-se um decréscimo acentuado na germinação acumulada no decorrer do tempo, sendo agravada ainda mais ao utilizar os potenciais de -0,6 e -0,8 MPa. Já para canafistula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert), o limite de tolerância ao estresse hídrico foi de -1,4 MPa (PEREZ et al., 2001).

Jeller & Perez (2001), trabalhando com sementes de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn., submetidas ao estresse hídrico, observaram um decréscimo no potencial de germinação. Os valores de germinação diferiram estatisticamente do controle (91,5%) a -0,6 MPa (27%), indicando sensibilidade das sementes ao estresse. O menor percentual de germinação foi observada em -0,7 MPa (16,2%), e ausência de germinação em -0,8 MPa.

Fanti & Perez (2003) observaram um decréscimo significativo na germinação de sementes de paineira (*Chorisia speciosa* A.St.-Hil.) com a redução dos níveis de potencial osmótico, atribuída à menor difusão da água através do tegumento. A germinação de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) responde negativamente ao aumento do estresse osmótico, entretanto, a germinação ocorreu em todos os potenciais testados, inclusive em condições de estresse de -1,2 MPa (SOUZA FILHO, 2006).

O IVG de sementes de *E. velutina* contrapôs ao aumento do estresse osmótico. O percentual de germinação apresentou reduções na ordem de 3,5%, enquanto o IVG foi de 50%, nos potenciais mais baixos (Tabela 2). Essas informações apontam para o IVG como um fator mais sensível aos efeitos do estresse osmótico que o percentual de germinação (MARCOS FILHO, 2005).

De acordo com Taiz & Zeiger (2004), a primeira etapa da germinação se processa com a absorção de água pela semente, mediante embebição. A água é responsável pela reidratação, através da absorção, estando envolvida, direta ou indiretamente em todas as demais etapas do metabolismo subsequente. Sua participação é decisiva nas reações enzimáticas, na solubilização e no transporte de metabólicos e como reagente na digestão hidrolítica de proteínas, carboidratos e lipídios dos tecidos de reserva da semente (WOODSTOCK, 1998; MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989; DELL'AQUILA, 1992; CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

Os resultados obtidos para a mobilização de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), proteínas totais (PT) e aminoácidos (AA), em sementes de *E.*

velutina submetidas a estresse hídrico durante o período de embebição estão representadas nas Figuras 2 a 5.

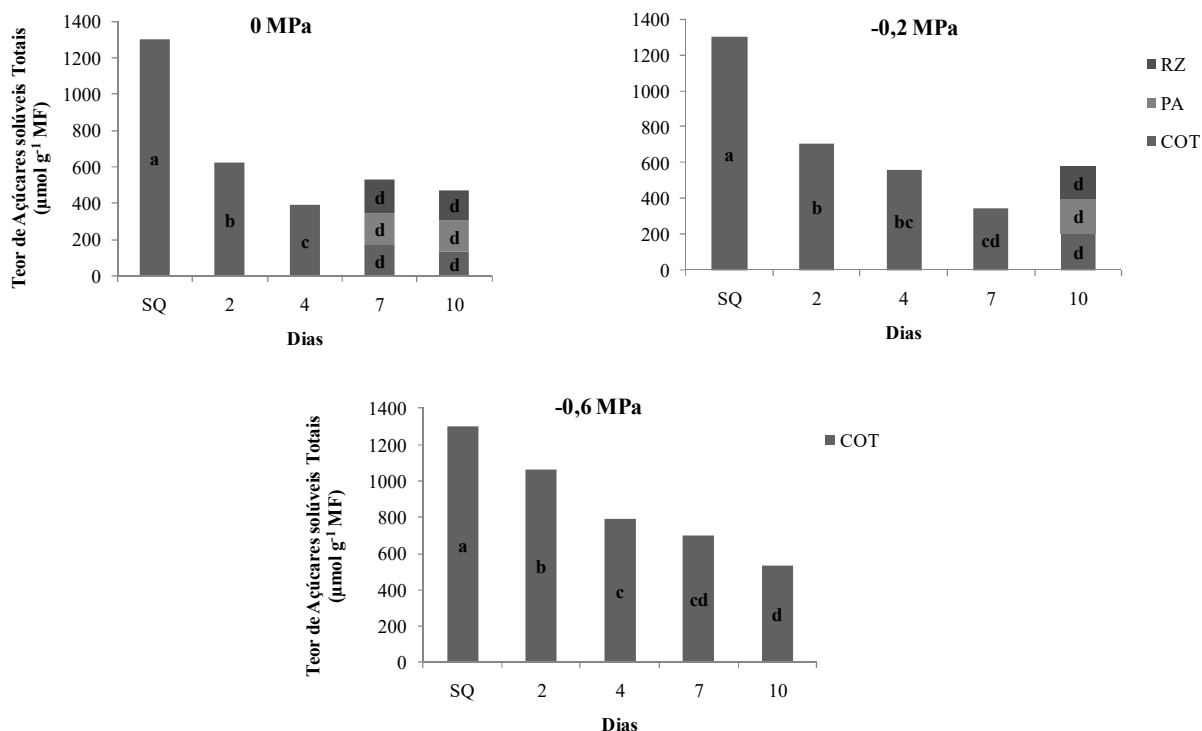


Figura 2. Teores de Açúcares Solúveis Totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a estresse hídrico durante a germinação.

A mobilização de reservas de carbono e nitrogênio analisadas foi influenciada pela restrição hídrica nas sementes de *E. velutina*. Ocorreu um decréscimo de AST nos cotilédones de todos os tratamentos em relação às sementes quiescentes. A sensibilidade a restrição hídrica foi observada em -0,2 MPa, no entanto, em -0,6 MPa a degradação de AST foi ainda mais lenta em relação aos demais tratamentos (Figura 2).

A redução do potencial osmótico promoveu uma restrição hídrica que retardou o processo germinativo das sementes em -0,6 MPa, onde foi observado um aumento nos níveis de AR com 2 dias, com posterior redução, podendo ser relacionado à menor degradação de AST nesta condição (Figura 3).

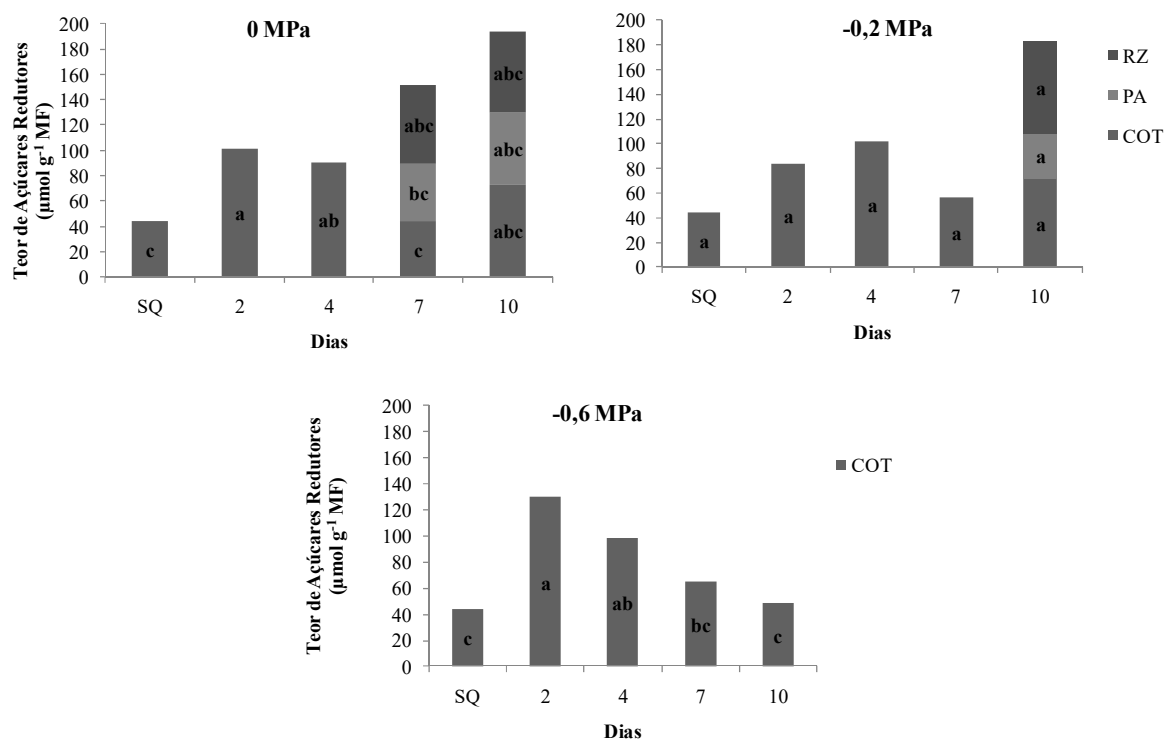


Figura 3. Teores de Açúcares Redutores Totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a estresse hídrico durante a germinação.

A diminuição nos açúcares livres observada durante o período pré-protrusão radicular pode ter relação com a ativação do metabolismo inicial da semente, fornecendo energia para a germinação antes que os processos iniciais de mobilização de reservas possam ocorrer (PRITCHARD et al., 2002).

Segundo Pontes et al. (2002), a utilização de amido ou de açúcares solúveis é variável, dependendo da espécie, podendo ocorrer durante a germinação ou no estágio de plântula. Durante a mobilização de reservas de sementes de garapa (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr.) esses autores não encontraram diferença significativa nos teores de açúcares solúveis durante o período de embebição.

Os teores médios de PT e AA nas sementes de mulungu foram influenciados com o potencial osmótico e o tempo de embebição (Figuras 4 e 5, respectivamente). Nos potenciais de 0 e -0,2 MPa os teores de proteínas sofreram uma redução nos períodos

iniciais de embebição analisados (2 e 4 dias) em relação à sementes quiescentes nos cotilédones. Os valores obtidos de PT permaneceram iguais durante o período pré-germinativo e após protrusão da radícula para os mesmos potenciais (0 e -0,2 MPa), embora apresentem uma tendência de decréscimo (Figura 4).

Os teores de AA nos cotilédones, parte aérea e raízes estudadas, nos tratamentos controle e -0,2 MPa, variaram segundo as taxas de mobilização das proteínas (Figura 5).

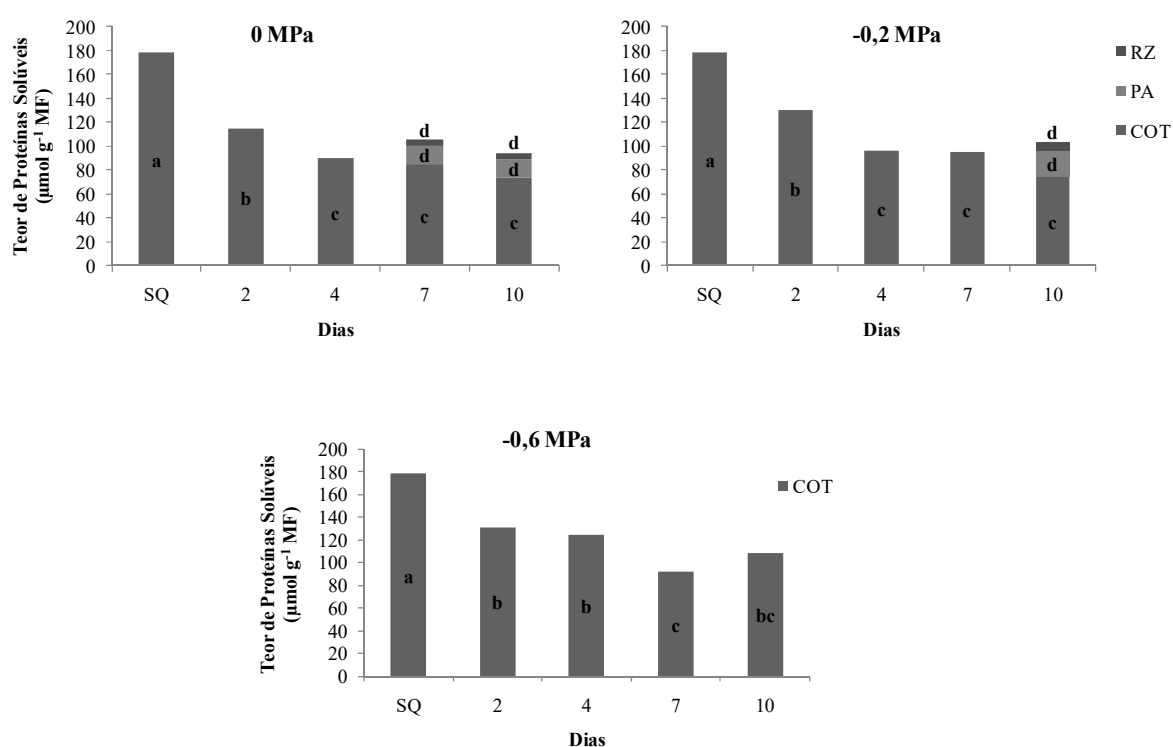


Figura 4. Teores de Proteínas Solúveis ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a estresse hídrico durante a germinação.

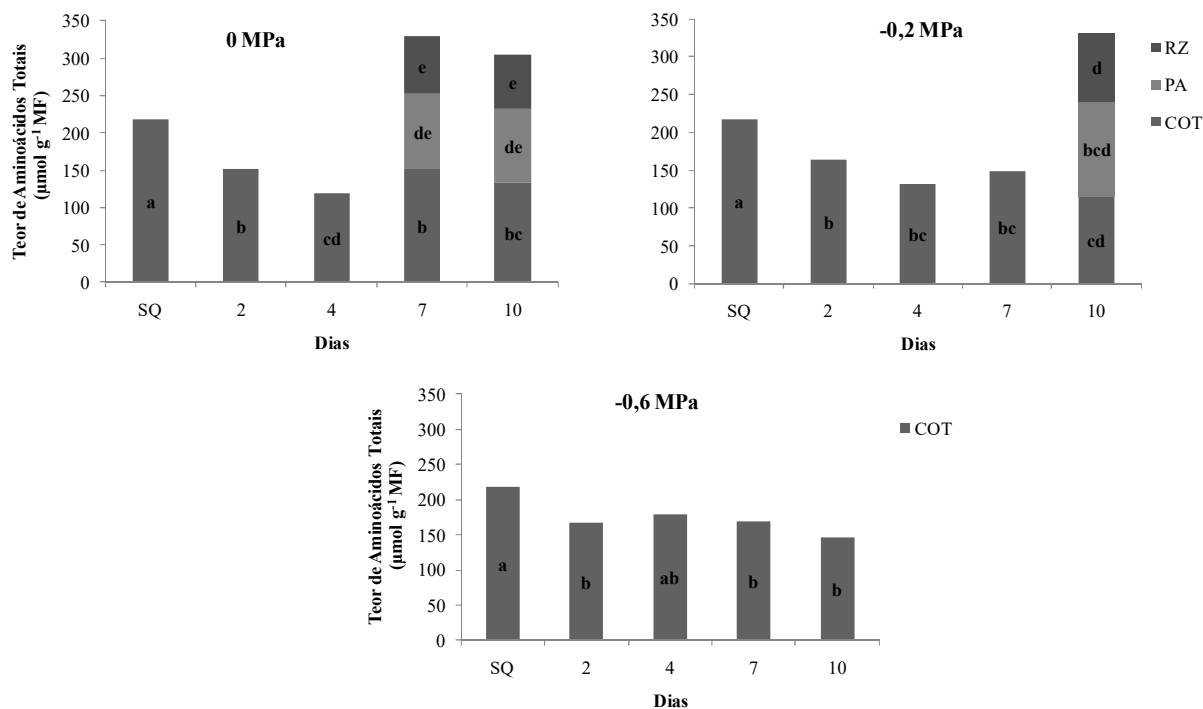


Figura 5. Teores de Aminoácidos Totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a estresse hídrico durante a germinação.

De acordo com Bewley & Black (1994), as proteínas são mobilizadas durante a germinação e subsequente crescimento das plântulas. Esses resultados também concordam com os obtidos por Müntz et al. (2001) de que a mobilização das proteínas armazenadas nos cotilédones só é detectável após a protrusão da radícula. Em sementes de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth), segundo Corte et al. (2006), o conteúdo de proteínas decresceu somente após a protrusão da radícula e crescimento das plântulas. Já em sementes de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) assim como em sementes de mulungu, deste estudo as proteínas foram continuamente degradadas após o início da embebição (SUDA & GIORGINI, 2000).

A mobilização de PT e AA foram reduzidas nas sementes submetidas -0,6 MPa até o período de embebição analisado de 10 dias (Figuras 4 e 5, respectivamente). Esses resultados podem ser parcialmente explicados pela provável inibição da atividade de proteases nos cotilédones e da translocação de seus produtos (aminoácidos) para o eixo

embrionário das sementes de *E. velutina*, devido à maior restrição hídrica proporcionada pelo potencial osmótico da solução de PEG.

O déficit hídrico ocasiona um prolongamento da fase estacionária do processo de embebição por causa da redução da atividade enzimática e, conseqüentemente, um menor desenvolvimento meristemático e atraso na protrusão da radícula (FALLERI, 1994), como ocorreram nas sementes de *E. velutina* submetidas a -0,2 MPa e principalmente verificado em -0,6 MPa. A solução osmótica influencia o vigor, sendo este mais sensível que a germinação à deficiência hídrica.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- A germinação das sementes de *E. velutina* é afetada pela restrição hídrica;
- O limite máximo de tolerância da espécie a restrição hídrica é de -0,6 MPa;
- O processo de mobilização e degradação de reservas das sementes foi totalmente influenciado pela restrição hídrica;
- As sementes de *E. velutina* utilizadas neste estudo apresentaram comportamento diferenciado em relação ao desempenho da viabilidade e do vigor em diferentes níveis de estresse hídrico simulado por polietilenoglicol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, E.L.; FERRAZ, E.M.N. Processos ecológicos mantedores da diversidade vegetal na caatinga: estado atual do conhecimento. In: CLAUDINO, S.V. (Org), **Ecosistemas brasileiros: manejos e conservação**. Expressão Gráfica, Fortaleza, pp.115-128, 2003.

ARAÚJO, E.L.; SILVA, S.I.; FERRAZ, E.M.N. Herbáceas da caatinga de Pernambuco. In: SILVA, J.M.; TABARELLI, M. (Orgs), **Diagnósticos da biodiversidade do estado de Pernambuco**. SECTMA, Recife, pp.183-206, 2002.

BARBEDO, C.J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, v.12, n.2, p.113-204, 1998.

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

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa da Agropecuária. Brasília: 2009, 395 p.

CARVALHO, N.M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.

CORTE, B.V. et al. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, v.30, n.6, p.941-949, nov./dez. 2006.

DE CASTRO, R.D. et al. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, v.122, p.327–335, 2000.

DELL'AQUILA, A. Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under osmotic stress of polyethylene glycol. **Annals of Botany**, v.69, n.2, p. 167-171, 1992.

- FALLERI, E. Effect of water stress on germination in six provenances of *Pinus pinaster* Ait. **Seed Science and Technology**, v.22, n.3, p.591-599, 1994.
- FANTI, S.C.; PEREZ, S.C.J.G. de A. Efeito do estresse hídrico e envelhecimento precoce na viabilidade de sementes osmocondicionadas de paineira (*Chorisia speciosa*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.4, p. 537-543. 2003.
- FANTI, S.C.; PEREZ, S.C.J.G. de A. Processo germinativo de sementes de paineira sob estresses hídrico e salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.9, p. 903-909, 2004.
- JELLER, H.; PEREZ, S.C.J.G. de A. Efeitos dos estresses hídrico e salino e da ação de giberelina em sementes de *Senna spectabilis*. **Ciência Florestal**, v.11, n.1, p. 93-104, 2001.
- KHAJEH-HOSSEINI, M.; POWELL, A.A.; BINGHAM, I.J. The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soybean seeds. **Seed Science and Technology**, v.31, p. 715-725. 2003.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA. 2000. 531p.
- MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. 1º ed. São Paulo. Editora D & Z, 2004.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.
- MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 4 ed. Great Britain: Pergamon Press, 1989, 270p.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MORRIS, D.L. Quantitative determination of carbohydrates with Drywood's anthrone reagent. **Science**, v.107, p.254-255, 1948.
- MÜNTZ, K. et al. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.362, p.1741-1752, 2001.

MURILLO-AMADOR, B. et al. Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. **Journal Agronomy and Crop Science**, v.188, p. 235-247. 2002.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D. Germination-still a mystery. **Plant Science**. (Article in Press), 2010.

PEREZ, S.C.J.G. de A.; FANTI, S.C.; CASALI, C.A. Influência da luz na germinação de sementes de canafistula submetidas ao estresse hídrico. **Bragantia**, v.3, n.60, p. 155-166, 2001.

PONTES, C.A.; BORGES, E.E.L.; SOARES, C.P.B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v.26, n.5, p.593-601, 2002.

PRITCHARD, S.L.; CHARLTON, W.L.; BAKER, A.; GRAHAM, I.A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v.31, n.5, p. 639-647, 2002.

ROSA, L.S. da; FELIPPI, M.; NOGUEIRA, A.C.; GROSSI, F. Avaliação da germinação sob diferentes potenciais osmóticos e caracterização morfológica da semente e plântula de *Ateleia glazioviana* Baill (timbó). **Cerne**, v.11, n.3, p. 306-314, jul./set., 2005.

ROCHA, G.R. **Efeito da temperatura e do potencial hídrico na germinação de sementes de doze cultivares de Feijão- Mungo- Verde [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]**. Jaboticabal-SP. Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP- para graduação em Agronomia, 1996.

ROSEN, H. A modified ninhydrin calorimetric analysis for amino acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.67, p.10–15, 1957.

SAMPAIO, E.V.S.B.; RODAL, M.J. Fitofisionomias da caatinga. Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga. In: **Biodiversidade da caatinga**, <http://www.biodiversitas.org/caatinga>, Petrolina, 2000.

SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. **Análise da Germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004, 248p.

SILVA, F. DE A.S.E.; AZEVEDO, C.A.V. DE. **A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software.** In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, p.393-396, 2006.

SOUZA FILHO, A.P. da S. Influência da temperatura, luz e estresses osmótico e salino na germinação de sementes de *Leucaena leucocephala*. **Pasturas Tropicales**, v.22, n.2, 2006.

SUDA, C.N.K.; GIORGINI, J.F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, n.3, p.226-245, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004, 719p.

VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6000 e ta temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, n. 11/12, p.1957-1968, nov./dez. 1991.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v.57, p.508-514, 1954.

CAPÍTULO III

EFEITO DO ESTRESSE SALINO NA MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Erythrina velutina* Willd. (LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE)

RESUMO - Efeito do estresse salino na mobilização de reservas e germinação de sementes de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) - Este estudo foi realizado para avaliar o efeito do estresse salino sobre a germinação e mobilização de reservas em sementes de *E. velutina*. Os testes conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Semiárido - LASESA, Petrolina - PE. Sementes mulungu previamente escarificadas foram embebidas em soluções de NaCl preparadas com diferentes condutividade elétrica (CE) 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 dS.m⁻¹, dispostas em rolo de papel, sendo mantidas em câmara ajustada para 25 ° C, fotoperíodo de 12 h, durante 10 dias. Foram avaliados a porcentagem, tempo médio, velocidade média, índice de velocidade de germinação e coeficiente de uniformidade de germinação. As principais macromoléculas (açúcares solúveis totais, açúcares redutores, proteínas solúveis e de aminoácidos totais) foram quantificados nos cotilédones, o eixo embrionário, a parte aérea e a raiz de sementes embebidas e os cotilédones de sementes quiescentes (controle). O aumento da salinidade no meio de incubação não causou alterações significativas na velocidade de germinação e IVG de sementes de mulungu. CE a partir de 12 dS.m⁻¹ exerceu um efeito negativo sobre o crescimento inicial, e retardou a mobilização de compostos nas sementes de *E. velutina*. Os níveis de AST foram reduzidos quando comparados com sementes quiescentes em todos os tratamentos e períodos de embebição, sendo seguido por um aumento na AR. Os níveis de PT e AA foram influenciados pelo aumento na concentração de sal no substrato de germinação. A salinidade contribuiu para diminuir o vigor das sementes de *E. velutina*, tornando-se necessário mais estudos sobre o comportamento da espécie durante o crescimento inicial das plântulas.

Palavras-chave: Salinidade, germinação, mobilização de reservas, mulungu

ABSTRACT - Effect of salt stress in reserves mobilization and seeds germination of *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) – This study was conducted to assess the effect of salt stress on mobilization and germination of *E. velutina* seeds. The tests were conducted at Laboratory of Seed Analysis of Embrapa Semiárid - LASESA, Petrolina – PE. Mulungu seeds prior scarified were soaked in NaCl solutions prepared with the electrical conductivity (EC) 0, 2, 4, 6, 8; 10, 12, 14, 16 and 18 dS.m⁻¹ and arranged in paper roll and kept in chamber adjusted for 25°C, photoperiod of 12h, during 10 days. Were assessed the percentage, average time, average speed, index of speed of germination and coefficient of uniformity of germination. The main macromolecules (total soluble sugars, reducing sugars, soluble protein and total amino acids) were quantified in cotyledons, embryo, shoot and root of seeds soaked and cotyledons of quiescent seeds (control). Increased salinity in the incubation medium did not cause significant changes in germination, speed and IVG of Mulungu seeds. EC from 12 dS.m⁻¹ exerted a negative effect on initial growth and slowing the mobilization of compounds in seeds. AST levels were reduced when compared to quiescent seeds in all treatments and periods of soaking and followed by an increase in AR. PT and AA levels were influenced by an increase in salt concentration in the substrate of germination. However the salinity contributed to decrease the vigor of *E. velutina* seeds, making it necessary more studies about the behavior of specie during the initial growth of seedlings.

Key words: Salinity, germination, mobilization of reserves, mulungu

INTRODUÇÃO

A salinização dos solos é um sério problema mundial, pois tem limitado substancialmente a produção agrícola. Estima-se que 20% das terras cultivadas no mundo e aproximadamente metade das terras irrigadas estejam afetadas por sais (SAIRAM & TYAGI, 2004). Esse problema é mais agudo nas regiões semiáridas onde a baixa pluviosidade e a elevada demanda evaporativa contribuem decisivamente para o agravamento da salinização dos solos (VIÉGAS et al., 2001). As altas concentrações de sais no solo, além de reduzir o potencial hídrico, podem provocar efeitos tóxicos nas plantas, causando distúrbios funcionais e injúrias no metabolismo.

A vegetação nativa da região semiárida, devido à sua multiplicidade de uso, apresenta grande valor sócio-econômico para o homem, no tocante a alimentação humana e animal, medicina alternativa, produção de madeira visando o fornecimento de lenha, carvão e produtos industriais (fibras, óleos, resinas, ceras, tanino, madeira para diversas finalidades), além da preservação do solo, dos recursos hídricos e da fauna (LIMA, 1989).

As condições prevalecentes na região semiárida do Nordeste brasileiro, principalmente devido à existência de solos salinos, demonstram a necessidade de serem desenvolvidos trabalhos objetivando o aproveitamento de seus recursos naturais. O cultivo de espécies arbóreas é uma alternativa promissora para a reintegração de solos salinizados por meio da exploração agrícola (SANTOS et al., 1997). Os efeitos benéficos da implantação dessas espécies nesses solos explicam-se pelo fato do seu sistema radicular atingir camadas mais profundas do solo, aumentando a sua permeabilidade. Em geral, as espécies arbóreas possibilitam melhorias nas propriedades físico-químicas dos solos (SHUKLA & MISRA, 1993).

Dentre as espécies de importância econômica, ornamental, medicinal e que se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção a *Erythrina velutina* é uma espécie florestal, nativa do Nordeste brasileiro, com presença na caatinga e pertencente à família Leguminosae, sendo popularmente conhecida por mulungu, cortiçeira, canivete e suinã. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis, sendo esta sua principal via de propagação. É, portanto, uma planta que cresce em meio às condições de seca, salinidade e a altas temperaturas na maior parte do ano (LORENZI & MATOS, 2002; CARVALHO, 2008).

Segundo Larcher (2000), um grau moderado de resistência ao sal em plantas é útil na tentativa de utilização de solos afetados por sais em regiões secas. O estresse salino é um dos agentes abióticos estressores mais relevantes e um dos mais estudados pela comunidade científica, o que se comprova pela grande produção literária em torno dessa temática. Entretanto, não há conhecimento disponível para o manejo e análise das sementes da maioria dessas espécies, de modo a fornecer dados que possam caracterizar seus atributos físicos e fisiológicos. Há também, necessidade de se obter informações básicas sobre a germinação, cultivo e potencialidade de espécies nativas, visando sua utilização para os mais diversos fins (AGUIAR et al., 1993; ZANON et al., 1997; ARAÚJO NETO et al., 2003).

Para que as sementes germinem é necessário que existam condições favoráveis de luz, temperatura e disponibilidade de água (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). O processo germinativo se inicia com a absorção de água por embebição, porém, há necessidade de que a semente alcance um nível de hidratação que permita a reativação dos seus processos metabólicos para o estabelecimento das plântulas. Os solos salinos e sódicos nem sempre disponibilizam essa quantidade de água que a sementes necessitam. Segundo Braga et al. (2009), o período germinativo é importante para a sobrevivência das espécies florestais, principalmente nesses locais onde a disponibilidade de água é limitada.

Em sementes o excesso de sal causa restrição da captação de água devido à diminuição do potencial osmótico do substrato (CHAVES, et al., 2009), retardando a embebição das sementes ou o alongamento da raiz, além de provocar toxicidade nos tecidos devido ao acúmulo em excesso dos íons Na^+ e Cl^- (ESTEVES & SUZUKI, 2008; GÓIS et al., 2008). A toxicidade iônica pode ainda ocasionar o atraso da emergência das plântulas e da mobilização de reservas ou até diminuir a viabilidade das sementes, por afetar processos fisiológicos e metabólicos dos tecidos embrionários (ESTEVES & SUZUKI, 2008; KUMAR et al., 2008; MUNNS & TESTER, 2008; VOIGT et al., 2009).

O grau de tolerância ao estresse salino depende da capacidade das plantas minimizarem os efeitos da salinidade, através de mecanismos específicos de adaptação (LARCHER, 2000). De acordo com Lima & Torres, (2009) um dos métodos mais difundidos para determinação da sensibilidade das plantas a salinidade é a observação da porcentagem de germinação em substratos salinos, desta forma, objetivou-se com este

trabalho verificar a mobilização de reservas e a germinação de sementes de *E. velutina* submetidas a diferentes concentrações de solução de NaCl durante a germinação.

METODOLOGIA

Obtenção de sementes

Foram utilizadas sementes de *E. velutina* provenientes de matrizes do Município de Juaí (Lagoa Grande -PE), cujas coordenadas são W 37° 18' 03" S 90° 52' 92" coletadas em outubro de 2009. As sementes foram beneficiadas manualmente, acondicionada em saco plástico transparente (0,15 mm de espessura) e mantidas em temperatura ambiente (30°C±5°C, 56±6% UR) no Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Semiárido – LASESA, Petrolina –PE, local onde foram conduzidos os ensaios.

Teste de germinação

Previamente aos ensaios fisiológicos procedeu-se a escarificação mecânica do tegumento externo das sementes com o auxílio de uma mini-retífica (Western R-40). Em seguida as sementes escarificadas foram submetidas à assepsia utilizando-se solução de hipoclorito de sódio comercial (2%) por 2 minutos, sendo posteriormente lavadas em água destilada. As sementes foram acondicionadas, após a assepsia, em substrato tipo rolos de papel germitest, umedecidos com soluções de NaCl, em volume correspondente a 2,5 vezes o peso do substrato, adaptada de Brasil (2009), em diferentes concentrações de condutividade elétrica (CE) aferidas em 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 dS.m⁻¹. Para obtenção das soluções de NaCl, seguiu-se a tabela proposta por Richards (1980), onde quantidades de sal foram diluídas em água destilada e, posteriormente, tiveram sua condutividade elétrica medida em condutivímetro “Digimed” modelo CD-21.

Os rolos contendo as sementes foram incubados em germinadores a 25°C, fotoperíodo de 12h por um período de 10 dias consecutivos. Foram consideradas germinadas as sementes que protruíram radícula com pelo menos 2 mm de comprimento sendo estas contadas diariamente. As variáveis avaliadas foram: porcentagem de germinação, tempo médio, velocidade média, velocidade de germinação e coeficiente de uniformidade de germinação (SANTANA & RANAL, 2004).

Extração e análise de Macromoléculas

Sementes de mulungu escarificadas foram submetidas a soluções de NaCl em diferentes concentrações, de condutividade elétrica (CE) aferidas em 0, 4, 8, 12 dS.m⁻¹ em rolos de papel germitest, sendo mantidas em germinador com fotoperíodo de 12h durante 2, 4, 7 e 10 dias. Ao final desses períodos de embebição os cotilédones, embrião, parte aérea, raiz, bem como os cotilédones das sementes quiescentes foram coletados e congelados em *freezer* -20°C até o momento da extração. Simultaneamente a esse procedimento foi avaliado a germinação das sementes a cada período de coleta realizada.

A extração das macromoléculas foi realizada após homogeneização de 0,5 g das amostras coletadas em 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5 e centrifugadas a 10.000 xg durante 20 min a 4°C. A partir do extrato obtido foram determinados os teores de compostos solúveis espectrofotometricamente. Os açúcares solúveis totais (AST) foram determinados através das reações com antrona (MORRIS, 1948; YEMM & WILLIS, 1954); açúcares redutores (AR) foram quantificados utilizando-se o ácido 3,5, dinitrosalicílico (DNS) para oxidação desses compostos (MILLER, 1959); as proteínas solúveis (PT) foram quantificadas determinadas obedecendo à metodologia descrita por Bradford (1976) e os aminoácidos totais (AA) foram quantificados segundo metodologia proposta por Rosen (1957).

Delineamento e Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado composto por dez tratamentos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 dS.m⁻¹) para os dados de germinação e quatro tratamentos (0, 4, 8, 12 dS.m⁻¹) para os dados de macromoléculas com quatro repetições de 25 sementes. Para os dados de porcentagem, tempo médio, velocidade média, índice de velocidade e coeficiente de uniformidade da germinação após análise de variância, foi realizada análise de regressão dos dados utilizando o programa Assistat (SILVA, 2006). Para o ajuste das equações de regressão, foi selecionado o modelo significativo, que apresentou maior coeficiente de determinação. Os dados de macromoléculas foram analisados mediante análise de variância utilizando o mesmo programa e as diferenças entre médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o resultado da análise de variância apresentados na Tabela 1, a redução no potencial osmótico, induzida pelo tratamento com NaCl, não provocou alterações significativas nos parâmetros germinativos das sementes de *E. velutina*.

Tabela 1. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (G), tempo médio de germinação (Tm), velocidade média de germinação (Vm), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade na germinação (CUG) de sementes de *Erythrina velutina* Willd. submetidas diferentes concentrações de solução de NaCl durante a germinação.

Fonte de variação	G	TM	VM	IVG	CUG
F de Tratamentos	0,935 ^{ns}	2,996 ^{ns}	2,356 ^{ns}	1,904 ^{ns}	0,865 ^{ns}
C.V. (%)	2,02	4,63	1,59	5,83	14,23

ns= não significativo, *= significativo a 5% de probabilidade.

A porcentagem de germinação não diminuiu com o aumento da concentração de sal no substrato. Na ausência de sal (controle) a porcentagem de germinação das sementes atingiu 100%, necessitando de 4,67 dias para que o processo ocorresse (Figura 1). Sementes tratadas com 18 dS.m⁻¹ de NaCl apresentaram 97,8% de germinação, com 5,96 dias para que o processo ocorresse, o que não diferiu ao controle.

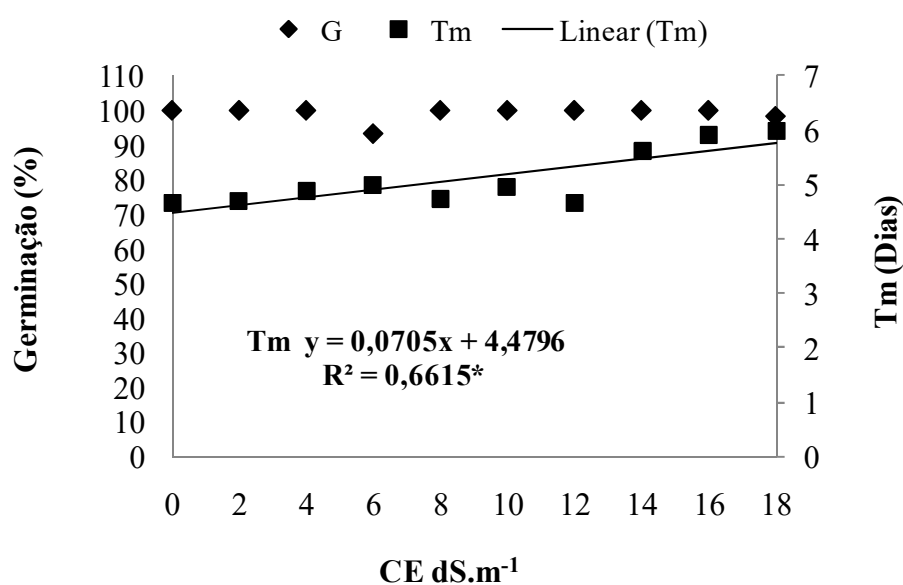


Figura 1. Porcentagem de germinação e tempo médio (Tm) de sementes de *Erythrina velutina* Willd. submetidas a diferentes concentrações de solução de NaCl durante a germinação.

De forma diferente ao que ocorreu em sementes de *E. velutina*, em sementes de paineira (*Chorisia speciosa* A.St.-Hil.) (FANTI & PEREZ, 2004) não foi verificado um limite elevado de tolerância ao estresse salino, podendo ser classificada como glicófito, com moderada tolerância ao NaCl. Entre as espécies que apresentaram limite de tolerância ao estresse salino semelhante ao verificado em sementes de paineira pode-se citar *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (CAVALCANTE & PEREZ, 1995), *Bauhinia forficata* L. (FANTI & PEREZ, 1996), *Copaifera langsdorffii* Desf. (JELLER & PEREZ, 1997), *Adenantha pavonina* L. (FANTI & PEREZ, 1998), *Jatropha curcas* L. (ANDRÉO-SOUZA et al., 2010) e *Carthamus tinctorius* L. (DANTAS et al., 2011).

A redução na porcentagem de germinação e o atraso no início do processo germinativo com o aumento do estresse salino ocorridos nessas espécies podem estar relacionados com a seca fisiológica produzida, pois quando existe aumento da concentração de sais no meio germinativo, há uma diminuição do potencial osmótico e, conseqüentemente, uma redução do potencial hídrico. Esta redução pode afetar a cinética de absorção de água pelas sementes (efeito osmótico), como também elevar a níveis tóxicos a concentração de íons no embrião (efeito tóxico) (CRAMER et al., 1986; TOBE et al., 2000).

O IVG não foi significativo na indicação dos efeitos negativos dos níveis de salinidade aplicados as sementes de *E. velutina* (Tabela 1). Resultados contrários foram encontrados para sementes de algarobeira (*Prosopis juliflora* (Sw) DC) (PEREZ & TAMBELINI, 1997), de *Stylosanthes capitata* Vogel (OLIVEIRA et al., 2008) e de barriguda (*Chorisia glaziovii* (O.) Kuntze) (GUEDES, et al., 2011) onde o efeito da salinidade foi mais acentuado no IVG do que na porcentagem de germinação. Da mesma forma a velocidade média, índice de velocidade de germinação e coeficiente de uniformidade na germinação das sementes de *E. velutina*, não sofreram alterações significativas pelo acréscimo dos níveis de salinidade das soluções de NaCl.

Sementes de plantas de áreas com baixo índice de pluviosidade, como as do semiárido, como estratégia de sobrevivência, germinam mais rápido do que as de outros habitats, já que estão programadas fisiologicamente para germinarem no curto espaço de tempo das estações chuvosas e em que os níveis de salinidade do solo são geralmente

reduzidos e há disponibilidade de água suficiente para favorecer a germinação (GORAI & NEFFATI, 2007; 2009).

Conforme Góis et al. (2008) a redução do poder germinativo, em comparação com o controle, serve como um indicador do índice de tolerância da espécie à salinidade. Nesse método, a habilidade para germinar indica, também, a tolerância das plantas aos sais em estádios subseqüentes do desenvolvimento (TAIZ & ZEIGER, 2006). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho a germinação das sementes de *E. velutina* não foi afetada negativamente, podendo a espécie ser considerada tolerante à salinidade, no entanto, não significa que o estabelecimento das plântulas nessas condições obtenham sucesso.

Em condições de déficit hídrico, em que os potenciais de água externos são muito baixos, a absorção de água pela semente é restrita, tornando inviável a seqüência de eventos metabólicos que culminam para a emergência das plântulas (CUSTÓDIO et al., 2009). De acordo com Munns & Tester (2008), o crescimento radicular pode ser restringido tanto pelo déficit hídrico induzido pela osmolaridade elevada da solução, quanto pela toxicidade iônica envolvendo danos metabólicos e fisiológicos, podendo retardar estabelecimento da plântula.

Os resultados obtidos para a mobilização de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), proteínas totais (PT) e aminoácidos (AA), em sementes submetidas a diferentes concentrações de solução de NaCl durante o período de embebição estão representadas nas Figuras 2 a 5.

Os níveis de AST reduziram quando comparados ao das sementes quiescentes em todos os tratamentos e períodos de embebição, acompanhado de aumento dos AR (Figura 2 e 3, respectivamente). A partir de 4 dS.m⁻¹ ocorreu uma menor mobilização de AST nas plântulas aos 10 dias de incubação, esse acúmulo pode indicar uma tentativa de proteção e tolerância promovido pela salinidade (Figura 2). Em 12 dS.m⁻¹ a redução na mobilização de AST ocorreu a partir de 4 dias, acompanhado de um retardo no desenvolvimento da plântula.

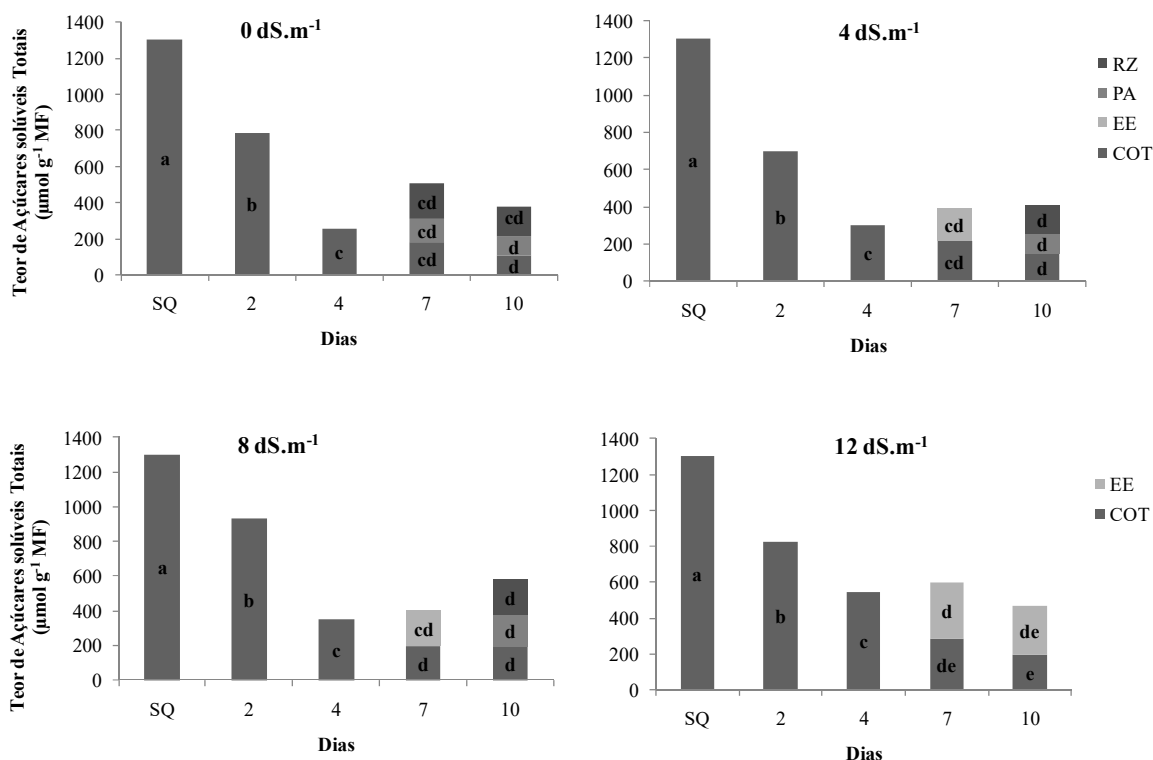


Figura 2. Teores de Açúcares Solúveis Totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a diferentes concentrações de solução de NaCl durante a germinação.

O acúmulo de açúcares solúveis é uma característica comum nas células de plantas submetidas ao estresse salino. Açúcares têm um papel no ajustamento osmótico, mas também tem efeitos indiretos de proteção, como na estabilização de proteínas (CARPENTER et al., 1990, BIANCHI et al., 1991). No entanto, a toxicidade iônica pode ocasionar o atraso da emergência das plântulas e da mobilização das reservas ou até diminuir a viabilidade das sementes (ESTEVES & SUZUKI, 2008; KUMAR et al., 2008; MUNNS & TESTER, 2008; VOIGT et al., 2009). Essa mudança é causada pela modificação na modulação da expressão e atividade de enzimas reguladoras na via metabólica (RAMANJULU & BARTELS, 2002).

As maiores variações no teor de AR ocorreram ao longo dos dias 4, 7 e especialmente aos 10 dias (Figura 3), ocorreu um acúmulo de AR com o aumento da CE e

do tempo de exposição das sementes de *E. velutina*, verificando-se uma modificação no padrão do processo de mobilização desses açúcares e retardando o crescimento inicial das plântulas, denotando a sensibilidade da emergência da plântula ao estresse.

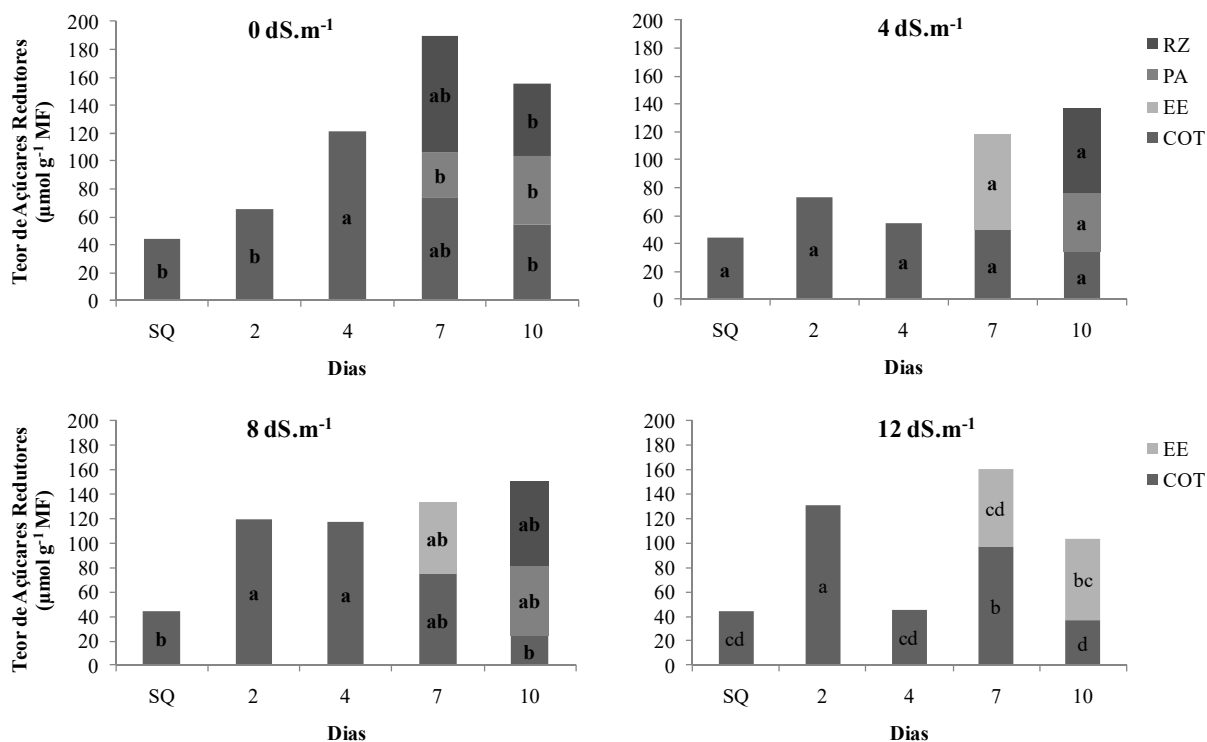


Figura 3. Teores de Açúcares Redutores Totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a diferentes concentrações de solução de NaCl durante a germinação.

A resistência à salinidade é descrita como a habilidade de evitar, por meio de uma regulação salina, que excessivas quantidades de sal provenientes do substrato alcancem o protoplasma e também, de tolerar os efeitos tóxicos e osmóticos associados ao aumento da concentração de sais (LARCHER, 2000). O aumento da concentração de compostos como prolina, polióis e açúcares, serve para manter o potencial osmótico da célula compatível com a manutenção da estabilidade de algumas macromoléculas, proporcionando redução na perda de atividade enzimática ou da integridade da membrana, que ocorrem quando existe estresse hídrico ou salino (FREIRE, 2000).

Os níveis de PT (Figura 4) e AA (Figura 5) presentes nas sementes sofreram influência do aumento da concentração de sal no substrato de germinação. O teor de PT dos cotilédones se mantiveram constante a partir de 4 dias para sementes submetidas a 4 e 8 dS.m⁻¹, no entanto, ocorreu uma redução desse teor a partir de 10 dias nos cotilédones das sementes expostas a 8 dS.m⁻¹. Em sementes submetidas à 12 dS.m⁻¹ os teores de PT reduziram significativamente ao longo do período de embebição (Figura 4).

Em relação ao controle houve menor mobilização de AA dos cotilédones para o eixo embrionário, os teores de AA nos cotilédones mantiveram-se constantes a partir de 4 dS.m⁻¹ (Figura 5).

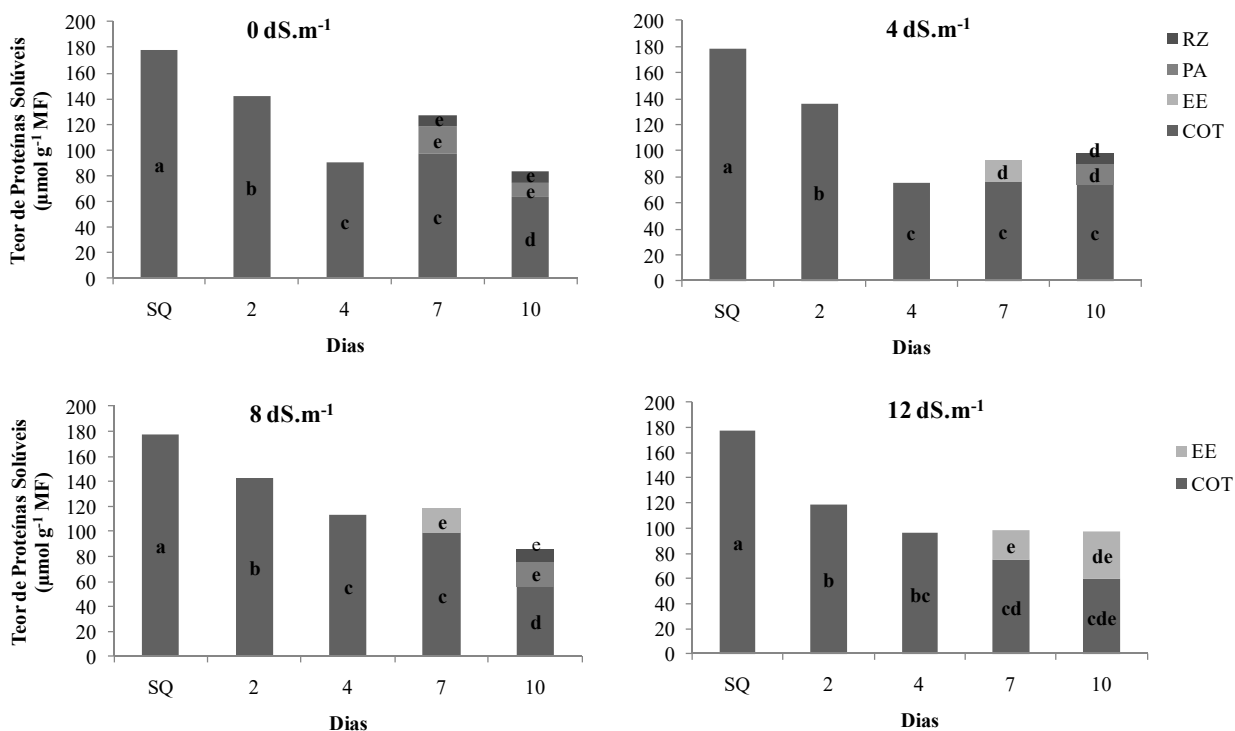


Figura 4. Teores de Proteínas Solúveis (µmol g⁻¹ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a diferentes concentrações de solução de NaCl durante a germinação.

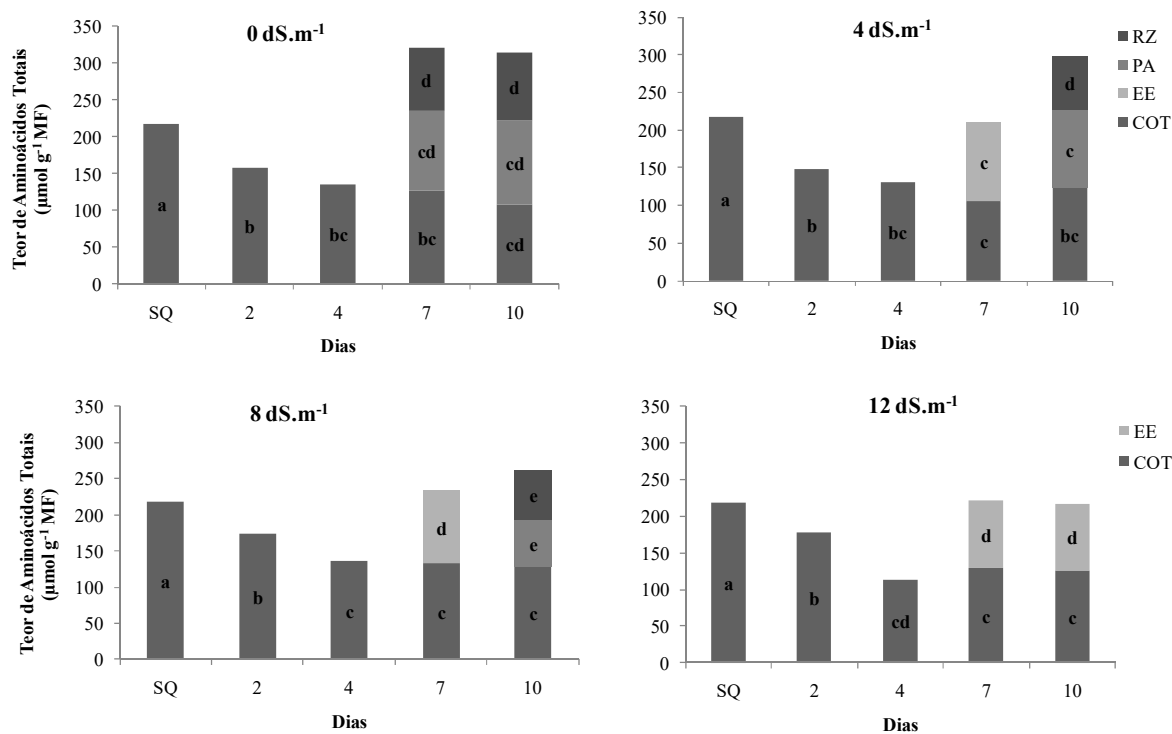


Figura 5. Teores de Aminoácidos Totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em sementes quiescentes (SQ) e em cotilédones (COT), eixo embrionário (EE), parte aérea (PA) e raiz (RZ) de sementes de *E. velutina* Willd. submetidas a diferentes concentrações de solução de NaCl durante a germinação.

A quantidade de sais solúveis a partir de 4 dS.m⁻¹, exerceu efeito no crescimento inicial retardando a expansão do eixo e a mobilização dos compostos nas sementes de mulungu a partir de 4 dias de exposição à solução salina. A inibição do crescimento ocasionada pela salinidade, segundo Tobe et al. (2000), se deve tanto ao efeito osmótico, ou seja, à seca fisiológica produzida, como ao efeito tóxico, resultante da concentração de íons no protoplasma, de acordo com Essa (2008) a toxicidade iônica pode causar redução no crescimento das plantas sob estresse salino por desencadear danos às membranas e redução da atividade de enzimas hidrolíticas.

A inibição da mobilização das reservas, segundo Prisco et al. (1981), pode ser atribuída aos efeitos dos sais na síntese "de novo" e atividade das enzimas responsáveis pela hidrólise e translocação dos produtos hidrolisados dos tecidos de reserva para o eixo embrionário, afetando deste modo o processo germinativo.

A habilidade do protoplasma de tolerar altas concentrações de sal depende da compartimentalização seletiva dos íons que entram na célula. A maior parte dos íons provenientes dos sais acumulam-se nos vacúolos, processo que reduz a concentração de sais a que o citoplasma está submetido, com proteção do sistema de enzimas dos efeitos do estresse salino (LARCHER, 2000). O equilíbrio osmótico entre o citoplasma e os diferentes compartimentos celulares, como o vacúolo, é mantido por meio da síntese de compostos orgânicos com atividade osmótica. Os carboidratos solúveis e os aminoácidos contribuem para a proteção das biomembranas e das proteínas em relação aos efeitos deletérios da alta concentração iônica (FRANCO et al., 1999; LARCHER, 2000).

A germinação das sementes de mulungu não foi afetada negativamente pelas concentrações de NaCl testadas, podendo a espécie ser considerada tolerante à salinidade. Entretanto, isso não significa que tenha potencial para vegetar em condições salinas com concentrações similares ao do intervalo utilizado neste trabalho.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- A germinação das sementes de *E. velutina* não foi afetada negativamente até a CE de 18 dS.m⁻¹, podendo a espécie ser considerada tolerante à salinidade com base em dados de germinação;
- Os resultados da mobilização de reservas evidenciam sua utilização para a germinação, no entanto, nas demais etapas do desenvolvimento ficaram verificadas a diminuição no vigor das sementes com relação ao crescimento inicial;
- Faz-se necessário um estudo do particionamento de assimilados em sementes de *E. velutina* submetidas a salinidade durante o crescimento inicial de plântulas em um maior período de tempo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, I.B.; PINÃ-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes Florestais Tropicais**, ABRATES, Brasília, 350p. 1993.

ANDREO-SOUZA, Y. et al. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de Pinhão-manso. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.2, p.083-092, 2010.

ARAÚJO-NETO, J.C.; AGUIAR, I.B.; FERREIRA, V.M. Efeito da temperatura e da luz na germinação de sementes de *Acacia polyphylla* DC. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.2, p.249-256. 2003.

BIANCHI, G. et al. Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **The Plant Journal**, v.1, p.355-359, 1991.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

BRAGA, L.F.; SOUZA, M.P.; ALMEIDA, T.A. Germinação de sementes de *Enterolobium schomburgkii* (Benth.) submetidas a estresse salino e aplicação de poliamina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.1, p.63-70, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa da Agropecuária. Brasília: 2009, 395 p.

CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H.; ARAKAWA, T. Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.3627-3636, 1990.

CARVALHO, P.E.R. Mulungu (*Erythrina velutina*). **Circular Técnica 160**, 1º Ed. Embrapa Florestas, Colombo, PR, Dez. 8p. 2008.

CARVALHO, N.M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.

CAVALCANTE, A.M.B.; PEREZ, S.C.J.G.A. Efeitos dos estresses hídrico e salino sobre a germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.281-289, 1995.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v.103, n.4, p.551-560, 2009.

CRAMER, G.R.; LÄUCHLI, A.; EPSTEIN, E. Effects of NaCl and CaCl₂ on ion activities in complex nutrient solutions and root growth of cotton. **Plant Physiology**, v.81, p.792-797, 1986.

CUSTÓDIO, C.C. et al. Water submersion of bean seeds in the vigour evaluation. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.4, n.3, p.261-266, 2009.

DANTAS, C.V.S. et al. Influência da salinidade e déficit hídrico na germinação de sementes de *Carthamus tinctorius* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.3, p.574-582, 2011.

ESSA, T.A. Effect of salinity stress on growth and nutrient composition of three soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars. **Journal of Agronomy Crop Science**, v.188, p.86-93, 2008.

ESTEVES, B.S.; SUZUKI, M.S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Australis**, v.12, n.4, p.662-679, 2008.

FANTI, S.C.; PEREZ, S.C.J.G.A. Efeitos do estresse hídrico e salino na germinação de *Bauhinia forficata* Link. **Revista Ceres**, v.43, p.654-662, 1996.

FANTI, S.C.; PEREZ, S.C.J.G.A. Efeitos do estresse hídrico, salino e térmico no processo germinativo de sementes de *Adenanthera pavonina* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, p.167-177, 1998.

FANTI, S.C.; PEREZ, S.C.J.G. de A. Processo germinativo de sementes de paineira sob estresses hídrico e salino. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.9, p. 903-909, 2004.

FRANCO, O.L. et al. Effects of CaCl_2 on the growth and osmoregulator accumulation in NaCl stressed cowpea seedlings. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.145-151, 1999.

FREIRE, A.L. de O. **Fixação do nitrogênio, crescimento e nutrição mineral de leucena sob condições de salinidade**. 92p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2000.

GÓIS, V.A.; TORRES, S.B.; PEREIRA, R.A. Germinação de sementes de maxixe submetidas a estresse salino. **Revista Caatinga**, v.21, n.4, p.64-67, 2008.

GORAI, M.; NEFFATI, M. Germination responses of *Reaumuria vermiculata* to salinity and temperature. **Annals of Applied Biology**, v.151, p. 53-59, 2007.

GORAI, M.; NEFFATI, M. Influence of water stress on seed germination characteristics in invasive *Diplotaxis harra* (forssk.) boiss (Brassicaceae) in arid zone of tunisia. **Journal of Phytology**, v.1, n.4, p. 249–254, 2009.

GUEDES, R.S. et al. Estresse salino e temperaturas na germinação e vigor de sementes de *Chorisia glaziovii* O. Kuntze. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.2, p.279-288, 2011.

JELLER, H.; PEREZ, S.C.J.G.A. Efeito da salinidade e sementeira em diferentes profundidades na viabilidade e no vigor de *Copaifera langsdorffii*. **Revista Brasileira de Sementes**, v.19, p.219-225, 1997.

KUMAR, N. et al. Effects of NaCl on growth, ion accumulation, protein, proline contents and antioxidant enzymes activity in callus cultures of *Jatropha curcas*. **Biologia**, v.63, n.3, p.378-382, 2008.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531p.

LIMA, D. ANDRADE. **Plantas da Caatinga**, Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro. 275 p. 1989.

LIMA, B.G.; TORRES, S.B. Estresses hídrico e salino na germinação de sementes de *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Revista Caatinga**, v.22, n.4, p.93-99, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MORRIS, D.L. Quantitative determination of carbohydrates with Drywood's anthrone reagent. **Science**, v.107, p.254-255, 1948.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanism of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.651-681, 2008.

OLIVEIRA, F.A. et al. Efeito da água salina na germinação de *Stylosantes capitata* Vogel. **Revista Verde**, v.3, n.1, p.77-82, 2008.

PEREZ, S.C.J.G.A.; TAMBELINI, M. Efeito dos estresses salino e hídrico e do envelhecimento precoce na germinação de algarobeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.11, p.1289-1295, 1995.

PRISCO, J.T.; ENEAS FILHO, J.; GOMES FILHO, E. Effect of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v.4, p.63-71, 1981.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought and desiccation induced modulation of gene expression in plants. **Plant, Cell & Environment**, v.25, p.141-151, 2002.

RICHARDS, L.A. **Suelos Salinos y Sódicos**. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México. 1980. 171p.

ROSEN, H. A modified ninhydrin calorimetric analysis for amino acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.67, p.10-15, 1957.

SAIRAM, R.K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v.86, n.03, p.407-421, 2004.

SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. **Análise da Germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004, 248p.

SANTOS R.V.; HERNANDEZ F.F.F. Recuperação de solos afetados por sais. In: GHEYI, H.R; QUEIROZ J.E; MEDEIROS, J.F. (ed.), **Manejo e Controle da Salinidade na Agricultura Irrigada**. Campina Grande: UFPB-SBEA, 383p. 1997.

SHUKLA, A.K.; MISRA, P.N. Improvement of sodic soil under tree cover. **The Indian Forester**, v.119, n.1, p.43-52. 1993.

SILVA, F. DE A.S.E.; AZEVEDO, C.A.V. DE. A New Version of The Assisat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, p.393-396, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719p.

TOBE, K.; LI, X.; OMASA, K. Seed germination and radicle growth of a halophyte, *Kalidium caspicum* (Chenopodiaceae). **Annals of Botany**, v.85, p.391-396, 2000.

VIÉGAS, R.A. et al. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.05, n.02, p.216-222, 2001.

VOIGT, E.L. et al. Source-sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.80-89, 2009.

YEMM, E.W; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v.57, p.508-514, 1954.

ZANON, A.; CARPANEZZI, A.A.; FOWLER, J.A.P. Germinação em laboratório e armazenamento de sementes de Tarumã-Branco (*Citharexylum myrianthum* CHAM.) **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.35, p.75-82, 1997.

CAPÍTULO IV

EFEITO DO ESTRESSE SALINO NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS *Erythrina velutina* Willd. (LEGUMINOSAE - PAPILIONOIDEAE)

RESUMO - Efeito do estresse salino no crescimento de plântulas *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) - A germinação e o crescimento de plântulas são os estágios de desenvolvimento mais sensíveis à salinidade, em regiões do semiárido, o desenvolvimento inicial de algumas espécies acontece sob condições hídricas restritivas e elevado acúmulo de íons. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do estresse salino sobre o crescimento plântulas de *Erythrina velutina*. As sementes de mulungu foram colocadas para germinar em solução de NaCl preparada em diferentes condutividade elétrica (CE): 0, 4, 6, 8 e 12 dS.m⁻¹ e mantidas em câmara de germinação (tipo BOD) ajustada a temperatura constante de 25°C, 12h de luz, por 16 dias. Além do número de sementes germinadas (%), foram analisadas: comprimento, a massa fresca e seca da parte aérea e da raiz primária das plântulas. A massa seca da parte aérea e raiz foi posteriormente utilizada para extração e quantificação dos açúcares solúveis totais (AST); açúcares redutores (AR); sacarose (SAC); proteínas solúveis (PT) e aminoácidos totais (AA). A germinação das sementes de *E. velutina* não foi afetada pelo tratamento de simulação de estresse salino, no entanto os dados obtidos no teste de vigor de plântulas foi afetado negativamente após 16 dias de estresse. Soluções de maior CE foram capazes de reduzir a produção de massa seca proporcionando diminuição da razão parte aérea/raiz de *E. velutina*. A restrição hídrica promovida pelo sal provocou uma desaceleração dos processos fisiológicos e bioquímicos durante a germinação. Em 6dS.m⁻¹ ocorreu uma mudança no padrão de mobilização das reservas, indicando uma tentativa de ajuste osmótico. Esta espécie provavelmente não suporta crescer em solos com potencial osmótico superior a 6 dS.m⁻¹ CE. A limitada disponibilidade de água e alta concentração de íons tóxicos afetaram negativamente o crescimento inicial de mulungu que mostraram-se menores e baixa produção de massa seca.

Palavras-chave: Salinidade, vigor, macromoléculas, caatinga.

ABSTRACT - Effect of salt stress on growth *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) seedlings - Seed germination and initial growth of seedlings are more sensitive to salinity and regions such as semiarid the initial development of some species occurs under restrictive water conditions and high accumulation of ions. The objective of this study was to evaluate the effect of salinity on growth of *Erythrina velutina* seedlings. Mulungu seeds were germinated in NaCl solution prepared in different electrical conductivity (EC): 0, 4, 6, 8 and 12dS.m⁻¹ and kept in a germination chamber (BOD) adjusted to a constant temperature of 25°C, 12 hours light, for 16 days. Besides the number of germinated seeds (%), were analyzed: total length, fresh and dry weight of shoot and primary root. The dry weight of shoot and root was subsequently used for extraction and quantification of soluble sugars (AST), sugars (RS), sucrose (SAC), soluble proteins (TP) and total amino acids (AA). The germination of mulungu was not affected by simulation of salt stress, differently from results of vigor. Solutions of higher EC were able to reduce the production of dry mass providing lower shoot/root of *E. velutina* seedlings. The water restriction promoted by salt caused a slowing of physiological and biochemical processes during germination. In 6dS.m⁻¹ was a change in the pattern of reserve mobilization, indicating an attempt to osmotic adjustment. This specie probably does not support grow on osmotic potential exceeding 6 dS.m⁻¹. The limited availability of water and high concentration of toxic ions negatively affected the initial growth of mulungu that proved to be smaller and lower dry matter production.

Key words: Salinity, vigor, macromolecules, caatinga

INTRODUÇÃO

O termo salino aplica-se a solos cuja condutância é maior que 4 mmhos cm^{-2} a 25°C (Allison et al., 1985). A salinização dos solos é um sério problema no mundo inteiro e tem crescido substancialmente, causando perdas na produtividade das culturas. Esse problema vem afetando os recursos hídricos das regiões semiáridas, onde a baixa pluviosidade e a elevada demanda evaporativa contribuem decisivamente para o agravamento da salinização dos solos (VIÉGAS et al., 2001).

A ocorrência de solos salinos e sódicos é comum nas regiões áridas e semiáridas, pela baixa precipitação pluvial e alta taxa de evaporação. Por isso, os sais não são lixiviados, acumulando-se em quantidades prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Essas condições prevalentes na região semiárida do Nordeste brasileiro demonstram a necessidade de serem desenvolvidos trabalhos objetivando o aproveitamento de seus recursos naturais, notadamente aqueles relacionados com o nível de tolerância da espécie a essas condições adversas, como no caso da salinidade dos solos.

A caatinga é a vegetação predominante na área do semiárido e apesar de suas condições severas, este bioma apresenta uma surpreendente diversidade de ambientes, proporcionados por um mosaico de tipos de vegetação, em geral caducifólia, xerófila e, por vezes, espinhosa, variando com o mosaico de solos e a disponibilidade de água (VELLOSO et al., 2002).

As espécies nativas deste bioma são adaptadas às severas condições climáticas predominantes na região, podendo constituir uma importante alternativa para o aproveitamento e recuperação das áreas salinizadas ou em processos de salinização, condições em que a exploração de muitas espécies agrícolas é inviável economicamente (SILVA et al., 2009).

O mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) é uma leguminosa nativa do bioma caatinga, de propagação principalmente por sementes e que apresenta relevante importância econômica e medicinal (LORENZI & MATOS, 2002; CARVALHO, 2008). Infelizmente, essa espécie ainda é pouco estudada nos diversos aspectos agronômicos, especialmente em condições de estresse salino.

A germinação e o crescimento inicial de plântulas são os estágios de desenvolvimento mais sensíveis à salinidade e independem da tolerância da planta mãe ao sal (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989). Para que o estabelecimento de espécies tenha sucesso na região do Semiárido Brasileiro, é necessário que as sementes germinem e as plantas cresçam rapidamente enquanto a água estiver disponível e sobrevivam a longos períodos de seca.

As plantas ampliaram seus mecanismos bioquímicos e moleculares para tolerar o estresse salino através de produtos e processos alternativos. Os mecanismos de tolerância aos sais podem ser simples ou extremamente complexos. Os meios mais simples envolvem alteração de algumas vias bioquímicas e os mais complexos envolvem maior proteção do sistema respiratório e fotossintético, uso eficiente da água, manutenção da parede celular e cromossomos (MUNNS, 1993; MUNNS, 2002; WINICOV, 1998; BOTELLA et al., 1994).

A inibição do crescimento das plantas sob salinidade ocorre por duas razões. A primeira é devido ao efeito osmótico ou déficit hídrico provocado pela salinidade, que reduz a absorção de água. A segunda é devido ao efeito específico dos íons ou excesso de íons, que entram no fluxo de transpiração e eventualmente causam injúrias nas folhas, reduzindo assim o crescimento (MUNNS, 2005).

Os níveis de tolerância às concentrações de sais letais são diferenciados nas plantas, utilizando-se de uma variedade de mecanismos entre as distintas espécies. A tolerância à salinidade é a capacidade das plantas de desenvolverem e completarem seu ciclo de vida sobre um substrato que contém elevada concentração de sais solúveis (FLOWERS et al., 1977; GREENWAY & MUNNS, 1980).

Segundo Deuner et al. (2011) enquanto plantas halófitas são capazes de crescer em solos com concentrações de sais de até 20%, as glicófitas, que envolvem a maioria das plantas cultivadas, têm seu crescimento inibido em concentrações da ordem de 0,3% a 0,5%. Ainda de acordo com esse autor, a tolerância de plantas à salinidade é variável em função do ciclo fenológico ou do seu estágio de desenvolvimento.

Ribeiro-Reis (2012¹), estudando a influência da salinidade na germinação de sementes de *E. velutina* verificaram que a germinação das sementes não foi afetada negativamente (Figura 1, Capítulo III). No entanto, esses resultados não confirmaram se a espécie tem potencial para vegetar em condições salinas com concentrações similares ao do intervalo utilizado no estudo, fazendo-se necessário um estudo mais aprofundado sobre o estabelecimento das plântulas de *E. velutina* em condições de estresse. Uma vez que o mulungu é uma espécie nativa e de importância para o bioma caatinga e encontra-se submetida a essas condições durante o seu desenvolvimento, objetivou-se com esse trabalho verificar o efeito do estresse salino no crescimento inicial de plântulas dessa espécie.

METODOLOGIA

Obtenção de sementes

Foram utilizadas sementes de *E. velutina* provenientes de matrizes do Município de Juitá (Lagoa Grande -PE), cujas coordenadas são W 37° 18' 03" S 90° 52' 92" coletadas em outubro de 2009. As sementes foram beneficiadas manualmente, acondicionada em saco plástico transparente (0,15 mm de espessura) e mantidas em temperatura ambiente (30°C±5°C, 56±6% UR) no Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Semiárido – LASESA, Petrolina –PE, local onde foram conduzidos os ensaios.

Teste de vigor – Crescimento de Plântulas

Previamente aos ensaios para obtenção de plântulas procedeu-se a escarificação mecânica do tegumento externo das sementes com o auxílio de uma mini-retífica (Western R-40). Em seguida as sementes escarificadas foram submetidas à assepsia utilizando solução de hipoclorito de sódio comercial (2%) durante 2 minutos sendo posteriormente lavadas em água destilada. A avaliação do crescimento de plântulas foi feita de acordo com Nakagawa (1999). Quatro subamostras de 10 sementes foram distribuídas sobre uma linha traçada no terço superior, no sentido longitudinal do papel germitest, umedecidos com

¹ RIBEIRO-REIS, R.C. Efeito do estresse salino na mobilização de reservas e germinação de sementes de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae – Papilionoideae), 2012. Dados não publicados.

solução de NaCl, correspondente a 2,5 vezes o peso do substrato, em diferentes concentrações, de condutividade elétrica (CE) aferidas em 0, 4, 6, 8 e 12 dS.m⁻¹. Para obtenção das soluções de NaCl, seguiu-se a tabela proposta por Richards (1980), em que quantidades de sal foram diluídas em água destilada e, posteriormente, tiveram sua condutividade elétrica medida em condutivímetro “Digimed” modelo CD-21.

As sementes foram posicionadas com a extremidade da radícula para a parte inferior do papel. Foram confeccionados rolos semelhantes ao teste de germinação (BRASIL, 2009) e as quatro repetições (quatro rolos) foram agrupadas, vedados em saco plástico e colocados verticalmente, de maneira que o geotropismo se manifestasse naturalmente e facilitasse as avaliações das plântulas, no interior do germinador do tipo BOD ajustado a temperatura constante de 25°C, fotoperíodo de 12h por 16 dias.

Após este período avaliou-se a quantidade de sementes germinadas através do número de plântulas e após remoção dos cotilédones mediu-se o comprimento da parte aérea e da raiz principal. A partir dessas avaliações obteve-se um valor representado pela divisão do somatório dos comprimentos verificados, independentemente da classificação das plântulas, pelo número total de indivíduos de cada repetição. A massa fresca da parte aérea e da raiz foi determinada a partir do peso destas partes das plântulas de cada repetição, resultantes da avaliação do teste de comprimento da plântula sob diferentes soluções salinas. Após a pesagem inicial foram acondicionadas em sacos de papel (Kraft) e colocadas para secar em estufa com circulação de ar a 70°C, durante 48 horas. Após esse período, as amostras foram retiradas da estufa, colocadas em dessecador, e em seguida foram pesadas para determinação da massa seca total das plântulas da repetição.

Extração e análise de Macromoléculas

Para esse procedimento foram utilizados a massa seca da parte aérea e raiz das plântulas submetidas às diferentes soluções de NaCl do teste de vigor. A extração das macromoléculas foi feita através da homogeneização de 0,2 g das amostras coletadas em 6 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5 e centrifugadas a 10.000 *xg* durante 20 min a 4°C. A partir do extrato obtido foram determinados os teores de compostos solúveis espectrofotometricamente. Os açúcares solúveis totais (AST) foram determinados através das reações com antrona (MORRIS, 1948; YEMM & WILLIS, 1954); açúcares redutores (AR) foram quantificados utilizando-se o ácido 3,5, dinitrosalicílico (DNS) para oxidação

desses compostos (MILLER, 1959); a sacarose (SAC) foi quantificada através da reação com antrona fria, após adição de KOH quente (PASSOS, 1996); as proteínas solúveis (PT) foram quantificadas seguindo à metodologia descrita por Bradford (1976) e os aminoácidos totais (AA) foram quantificados segundo metodologia proposta por Rosen (1957).

Delineamento e Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado consistindo de cinco tratamentos (0, 4, 6, 8 e 12 dS.m⁻¹) e quatro repetições. Após análise de variância, foi realizada análise de regressão dos dados utilizando o programa Assistat (SILVA, 2006). Para o ajuste das equações de regressão, foi selecionado o modelo significativo que apresentou maior coeficiente de determinação. Foi estabelecido também o erro padrão da média para os dados cujas equações não se ajustaram (na).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação das sementes de *E. velutina* não foi afetada pelo tratamento de simulação de estresse salino, e em todas as concentrações testadas de NaCl a germinação foi de 100% (dados não apresentados). Por outro lado os dados obtidos no teste de vigor de plântulas indicam que todas as variáveis avaliadas em plântulas de 16 dias sofreram influência dos tratamentos salinos aplicados (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância do crescimento da parte aérea (CPA), crescimento da raiz (CR), massa fresca parte aérea (MFPA), massa fresca raiz (MFR), massa seca parte aérea (MSPA) e massa seca raiz (MSR) de plântulas de *Erythrina velutina* submetidas diferentes concentrações de solução de NaCl.

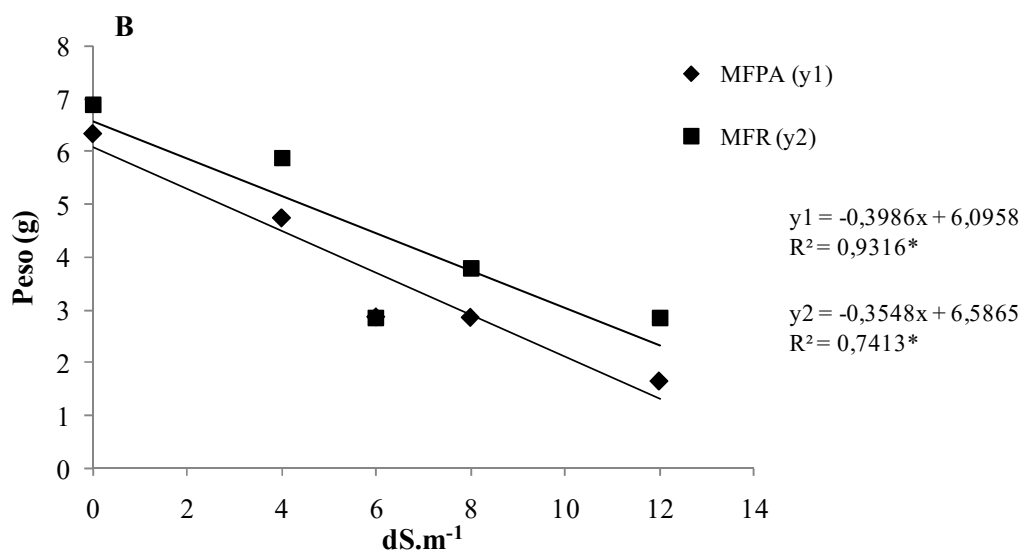
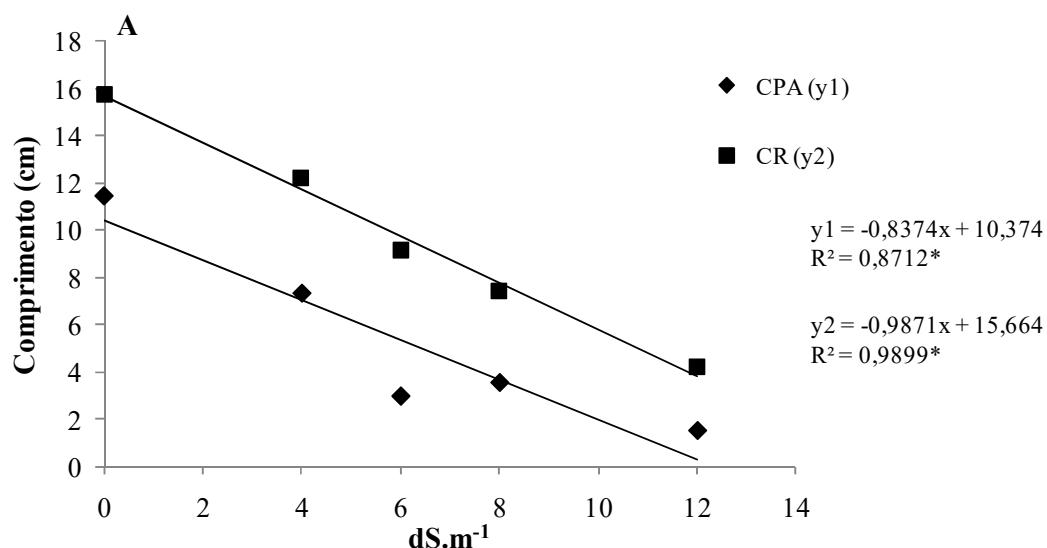
	Medidas de Vigor					
	CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR
F deTrat (dS.m ⁻¹)	308,74*	30,07*	14,39*	11,22*	10,07*	10,70*
C.V. (%)	7,39	14,38	22,76	21,37	16,33	15,02

ns= não significativo; *= significativo a 5% de probabilidade.

O desenvolvimento inicial das plântulas de mulungu (Figura 1), mostrou-se muito mais sensível ao o efeito do estresse salino quando comparado com a germinação. O maior vigor de plântulas de mulungu foram observados na ausência do sal (CE de 0 dS.m⁻¹). À

medida que a CE aumentava no meio, houve diminuição linear do desenvolvimento das plântulas (Figura 1).

O aumento da CE prejudicou o CPA com mais intensidade do que o CR das plântulas (Figura 1A). Observou-se ainda que dentro da tendência de redução linear dos resultados para CPA e MFPA na CE de 6 dS.m⁻¹, a redução foi mais acentuada, chegando praticamente aos mesmos níveis de 8 dS.m⁻¹ (Figuras 1A e 1B). Para MFR e MSR, observou-se que as maiores médias estão entre 0 e 4 dS.m⁻¹, sendo observada uma redução significativa à medida que a salinidade aumentou (Figuras 1B e 1C).



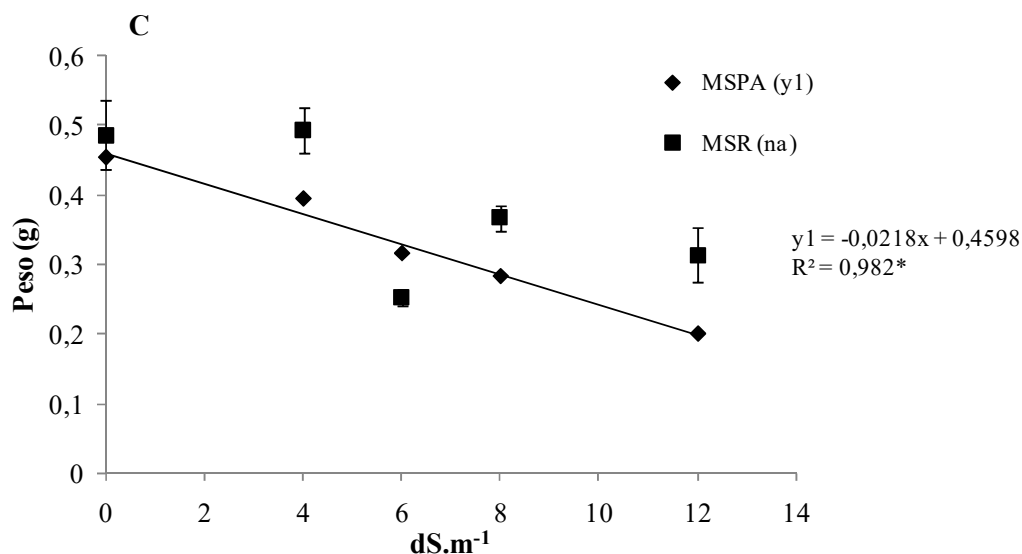


Figura 1. Medidas de A- crescimento da parte aérea (CPA) e crescimento da raiz (CR); B- massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa da fresca raiz (MFR); C- massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de plântulas de *E. velutina* submetidas diferentes concentrações de solução de NaCl.

A adição de cloreto de sódio ao meio germinativo, e conseqüente aumento da CE, reduziu a razão parte aérea/raiz das plântulas de *E. velutina*, indicando que o efeito da salinidade foi mais evidente na parte aérea do que nas raízes (Figura 2). Na CE de 6 dS.m⁻¹ verificou-se uma redução no crescimento e investimento no acúmulo de reservas das plântulas.

Izzo et al. (1991) ao estudar o estresse salino em plântulas de milho cita que é esperado que ocorra diminuição na razão parte aérea/raiz de plântulas submetidas a estas condições. Dados da literatura sugerem, ainda que, as raízes parecem suportar melhor a salinidade que a parte aérea, fenômeno este que pode estar associado a um ajustamento osmótico mais rápido e à perda de turgor mais lenta das raízes, quando comparadas com a parte aérea. Conseqüentemente, o crescimento radicular pode ser menos sensível que o crescimento da parte aérea à redução no potencial osmótico (SHALHEVET et al., 1995), isto também se reflete na massa fresca e seca das plântulas, como foi observado em *E. velutina* (Figura 2).

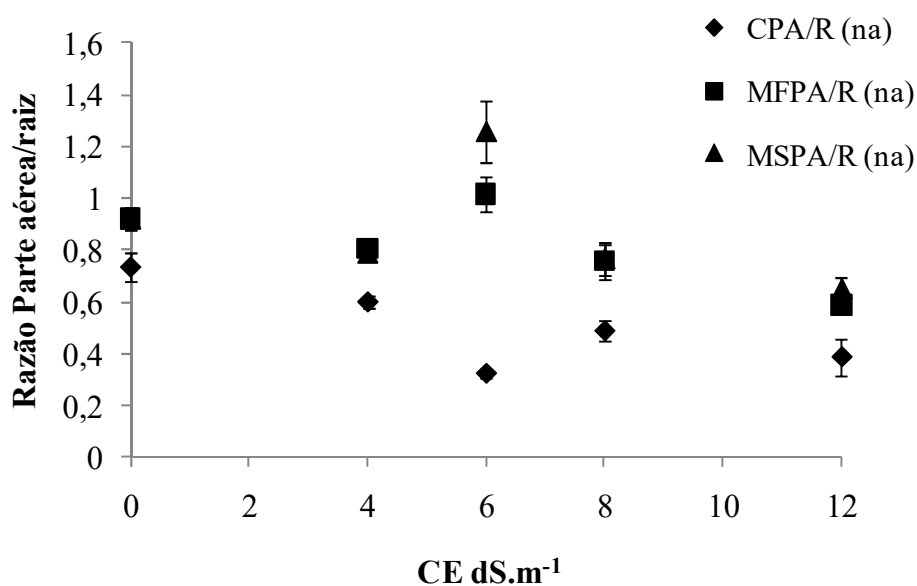


Figura 2. Razão Parte aérea/Raiz das medidas de vigor (CPA) crescimento da parte aérea/ (R) crescimento da raiz; (MFPA) massa fresca da parte aérea/ (R) massa da fresca raiz; (MSPA) massa seca da parte aérea/ (R) massa seca da raiz de plântulas de *E. velutina* submetidas diferentes concentrações de solução de NaCl.

Deuner et al. (2011), estudando o efeito da salinidade no crescimento inicial de plântulas de quatro genótipos de feijão-miúdo (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), verificou que com o aumento das concentrações salinas houve queda constante na produção de massa seca tanto na parte aérea quanto nas raízes, fato este não observado no crescimento das plântulas de *E. velutina* neste estudo. Estes mesmos autores observaram que em concentrações menores e não tóxicas ocorreu menor redução no comprimento da parte aérea e produção de massa, no entanto, concentrações mais elevadas do estresse salino reduziu o crescimento das plântulas. Este fator é atribuído à diminuição na absorção de água, seguido por hidrólise limitada de reservas alimentares dos tecidos de armazenamento para o desenvolvimento do eixo embrionário das sementes (KHAN & PANDA, 2008).

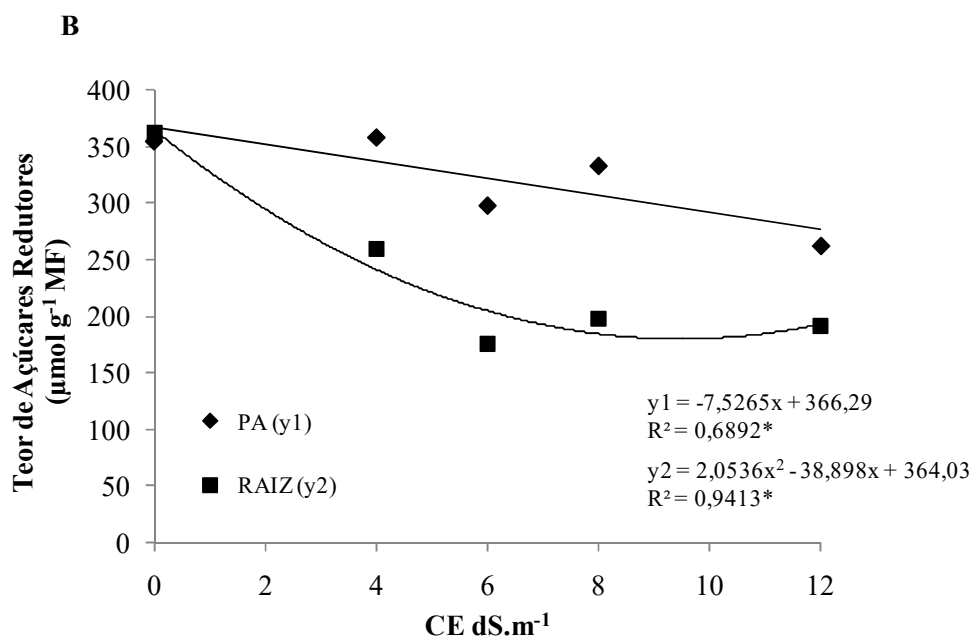
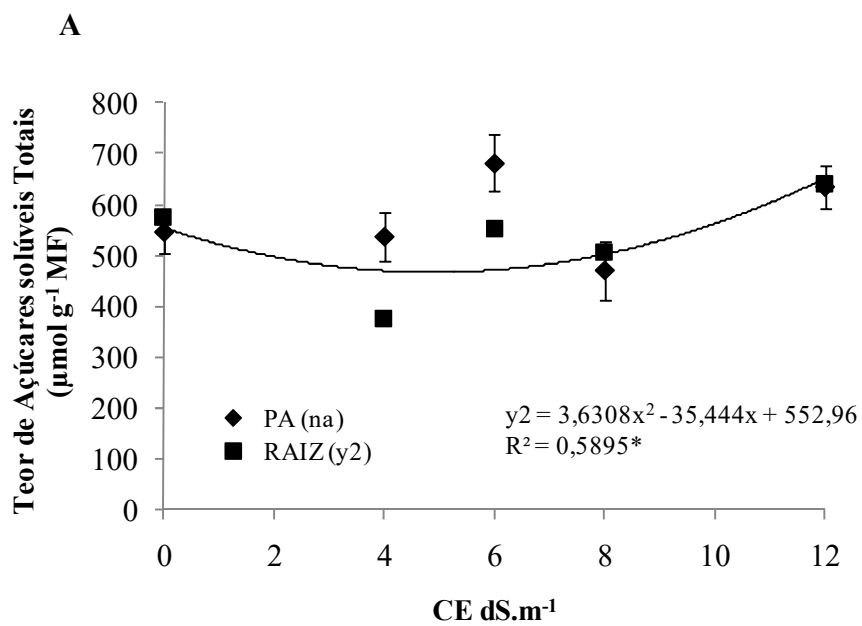
A menor redução do crescimento e acúmulo de massa sob condições amenas de salinidade, encontrado nas plântulas de feijão-miúdo assim como nas plântulas de mulungu pode ser devido ao fato da ocorrência de um condicionamento osmótico, onde ocorrem incrementos no teor de proteínas solúveis e enzimas específicas, o que proporciona maior concentração de solutos (DEUNER et al., 2011).

De acordo com Mistura et al. (2011) o aumento na condutividade elétrica também ocasionou um decréscimo gradual significativo no comprimento e conseqüentemente, redução no acúmulo de matéria seca das plântulas de cunhã (*Clitorea ternatea* L.). A redução da matéria seca de plântulas em função da restrição hídrica se dá devido à menor velocidade dos processos fisiológicos e bioquímicos ou pela dificuldade de hidrólise e mobilização das reservas da semente (BEWLEY & BLACK, 1994), com isso, as plântulas resultantes apresentam inibição do desenvolvimento.

De acordo com as especificações da AOSA (1983), amostras de sementes que originam plântulas com maior comprimento da parte aérea e peso de matéria seca, em um mesmo período de tempo, são consideradas mais vigorosas. Nesse sentido foi possível observar que as plântulas de *E. velutina* mais vigorosas foram aquelas que receberam água com baixas ou nenhuma concentração salina.

As altas concentrações de sais no solo, além de reduzir o potencial hídrico do solo, podem provocar efeitos tóxicos nas plantas, causando distúrbios funcionais e injúrias no metabolismo. A redução no potencial hídrico dos tecidos causada pelo excesso de sais provoca restrição no crescimento uma vez que as taxas de alongação e de divisão celular dependem diretamente do processo de extensão da parede celular (ASHRAF & HARRIS, 2004).

O resultados obtidos para a mobilização de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), sacarose (SAC), proteínas totais (PT) e aminoácidos (AA), em sementes submetidas a diferentes concentrações de solução de NaCl durante o período de crescimento inicial estão representadas nas Figuras 3 e 4.



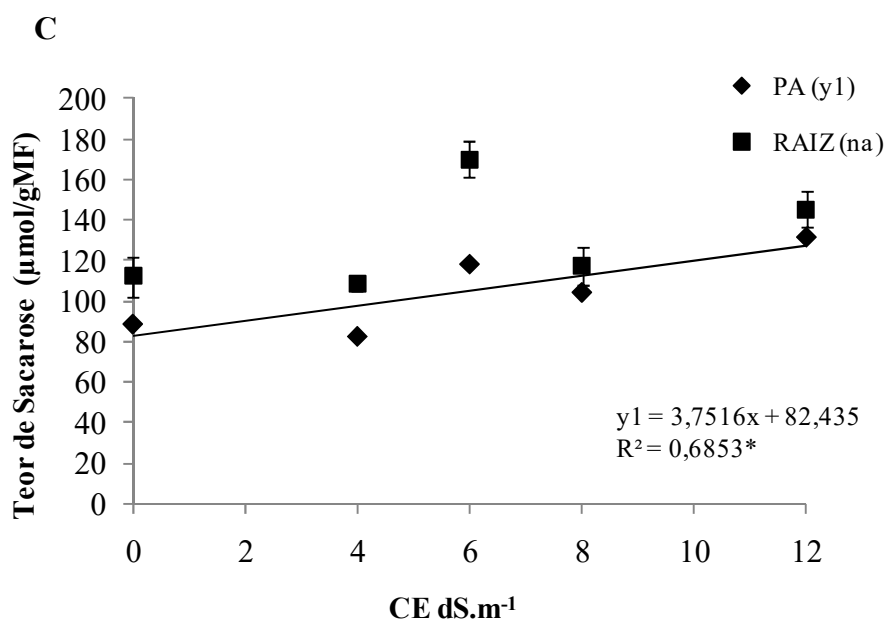


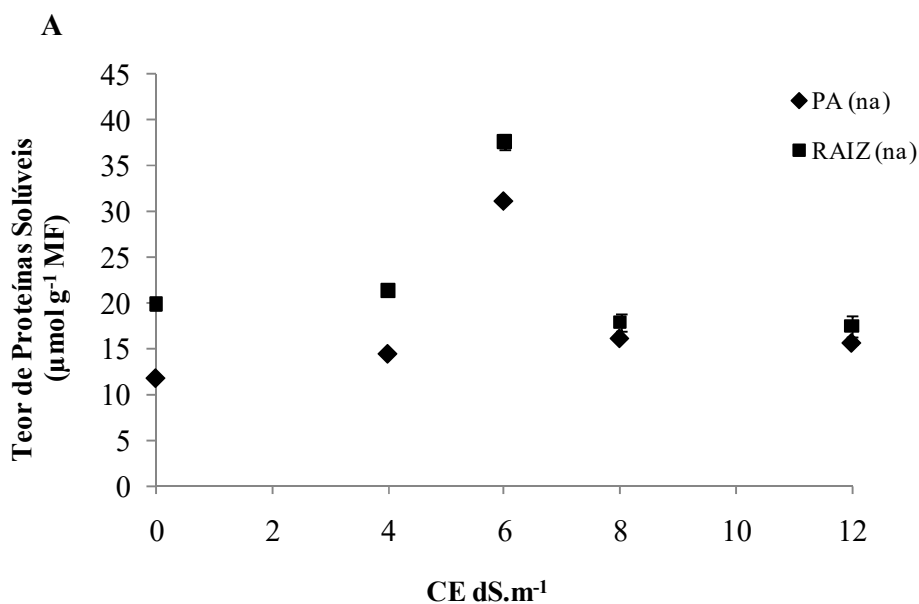
Figura 3. Teores de Açúcares Solúveis Totais (A), Açúcares redutores (B) e Sacarose (C) ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$) na parte aérea (PA) e raiz (RAIZ) de plântulas de *E. velutina* submetidas a diferentes concentrações de solução de NaCl.

A salinidade promoveu uma redução dos teores de AST e AR (Figuras 3A e 3B), acompanhado de aumento de SAC (Figura 3C) nas raízes das plântulas submetidas a 4 e 8 dS.m⁻¹ (Figura 3). Ocorreu uma redução linear dos AR na parte aérea, no entanto, na raiz a redução foi mais acentuada até 4 dS.m⁻¹. A partir desta CE os teores de AR tornaram-se praticamente constantes. Sérios distúrbios podem ocorrer nas células em virtude da perda dos açúcares redutores, porque alguns desses açúcares são importantes intermediários na rota metabólica da fotossíntese e da respiração celular, enquanto outros são componentes estruturais de ácidos nucleicos, além de constituírem blocos básicos da construção de muitos outros carboidratos, incluindo amido e celulose (SALISBURY & ROSS, 1992).

Os teores de AR verificados na concentração de 6 e 12 dS.m⁻¹ podem ser explicados quando se analisa o padrão de AST e SAC, onde verifica-se um aumento de AST e SAC nas plântulas de mulungu (Figura 3). O acúmulo de AST e SAC nas plântulas promovido por essas CE podem indicar uma tentativa de proteção e tolerância das plântulas a restrição hídrica e maior acúmulo de íons (Na^+ e Cl^-), o que pode explicar também as menores medidas de crescimento encontradas nessas CEs.

Naturalmente, o citoplasma acumula compostos de baixo peso molecular, os osmólitos, para adequar o balanço iônico nos vacúolos, que pouco intervêm nas reações bioquímicas habituais das plantas (HASEGAWA et al., 2000; ZHIFANG & LOESCHER, 2003). No entanto, sob estresse, estas substâncias resguardam estruturas e sustentam o balanço osmótico na planta (HASEGAWA et al., 2000). Compostos nitrogenados, açúcares e polióis são alguns exemplos de osmólitos (SINGH et al., 2000; KHAN et al., 2000; WANG & NIL, 2000; KEREPESEI & GALIBA, 2000). As plantas recuperadas do estresse e as sementes de muitas plantas superiores são bons exemplos para a ligação do acúmulo de hidratos de carbono (sacarose em particular) com a aquisição da tolerância ao estresse (HOEKSTRA et al., 2001; PHILLIPS et al., 2002).

A salinidade promoveu um aumento de PT nas plântulas até 6 dS.m^{-1} acompanhado de redução dos AA (Figuras 4A e 4B), no entanto, nessa CE o crescimento da plântula já encontrava-se reduzido. O acúmulo de compostos nitrogenados em plantas é comumente relacionada à tolerância a salinidade (MANSOUR, 2000).



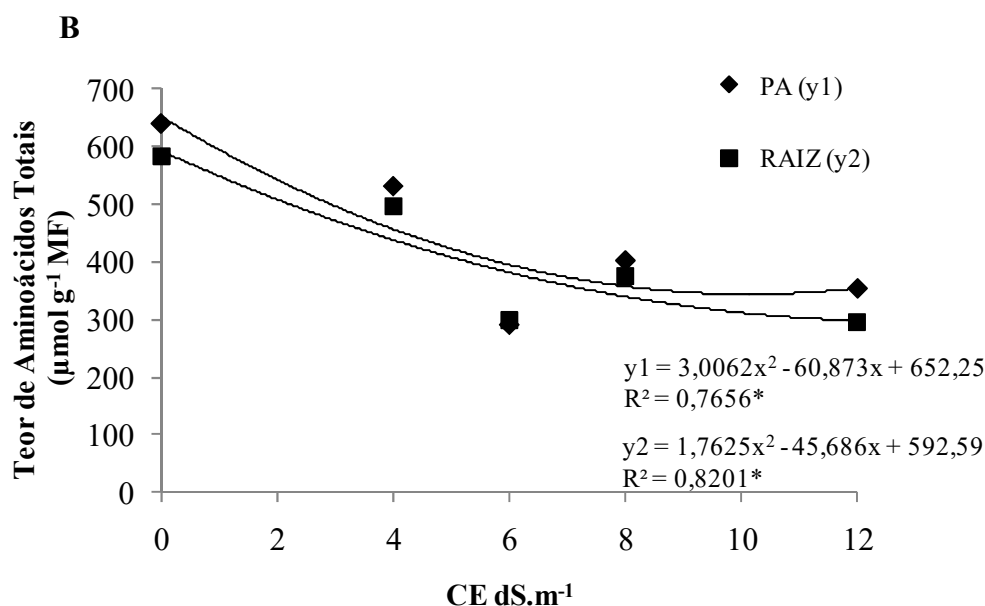


Figura 4. Teores de Proteínas Solúveis (A) e Aminoácidos Totais (B) ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) na parte aérea (PA) e raiz (RAIZ) de plântulas de *E. velutina* submetidas a diferentes concentrações de solução de NaCl.

Existem alguns estudos sobre o acúmulo de aminoácidos livres e outros compostos nitrogenados sob estresse salino. A maioria das plantas, frequentemente, acumula na forma de aminoácidos, amidas, proteínas e poliaminas, sendo este conteúdo variável entre as espécies (GADALLAH, 1999; MANSOUR, 2000; MELONI, et al., 2001). Estes compostos atuam no ajuste osmótico, proteção de macromoléculas celulares, estocagem de nutrientes, manutenção do pH celular, desintoxicação de células e minimização dos efeitos das espécies reativas de oxigênio (ASHRAF & HARRIS, 2004).

A partir de 6 dS.m⁻¹ verificou-se um decréscimo dos teores de PT (Figura 4A) e um aumento nos teores de AA em 8 dS.m⁻¹ com posterior redução em 12 dS.m⁻¹ (Figura 4B). Durante o efeito da salinidade, determinados processos são danificados, tais como: síntese de proteínas, metabolismo de lipídios e fotossíntese. Uma das respostas iniciais é a redução da expansão da superfície foliar, acompanhado de uma intensificação do estresse (WANG & NIL, 2000).

A redução no comprimento de plântulas se deve a mudanças na turgescência celular em função da diminuição da síntese de proteínas em condições de déficit hídrico (DELL'AQUILLA, 1992). O primeiro efeito mensurável do estresse hídrico é uma diminuição no crescimento causada pela redução da expansão celular que necessita de potencial de turgor adequado (TAIZ & ZEIGER, 2006). O aumento da salinidade provavelmente inibiu a atividade proteásica durante o estabelecimento da plântula em 8 e 12 dS.m⁻¹, afetando provavelmente a mobilização protéica nos cotilédones e o desenvolvimento da plântula de *E. velutina*.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- Pelo teste de vigor de plântulas todas as variáveis avaliadas aos 16 dias foram influenciadas pelo aumento da salinidade do meio;
- O aumento da salinidade no meio reduziu a razão parte aérea/raiz das plântulas de *E. velutina*, indicando que o efeito da salinidade foi mais evidente na parte aérea do que nas raízes;
- A restrição hídrica promovida pelo sal provocou uma desaceleração dos processos fisiológicos e bioquímicos durante a germinação, afetando negativamente o crescimento de plântulas de *E. velutina*;
- Plântulas de *E. velutina* provavelmente não suportam crescer em solos com potencial acima de 6 dS.m⁻¹ CE, tornando uma limitação para essa espécie florestal em ambientes que apresentam estas condições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALISSON, S.E. et al. **Suelos Salinos y Sodicicos**. L.A. Richards, Editor, 1985. 172p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA. **Seed vigor testing handbook**. AOSA, 1983. 93p.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v.166, n.01, p.3-16, 2004.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York and London: Plenum Press, 1994. 445p.
- BOTELLA, M.A. et al. Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase messenger-RNA. **Plant Molecular Biology**, v.25, p.105-114, 1994.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa da Agropecuária. Brasília: 2009, 395 p.
- CARVALHO, P.E.R. Mulungu (*Erythrina velutina*). **Circular Técnica 160**, 1º Ed. Embrapa Florestas, Colombo, PR, Dez. 2008, 8 p.
- DELL'AQUILA, A. Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under osmotic stress of polyethylene glycol. **Annals of Botany**, v.69, n.2, p.167-171, 1992.
- DEUNER, C. et al. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.711-720, 2011.
- ESTEVES, B.S.; SUZUKI, M.S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Australis**, v.12, n.4, p.662-679, 2008.
- FLOWERS, T.J.; TROKE, P.F.; YEO, A.R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v.28, p.89-121, 1977.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v.31, p.149-190, 1980.

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

IZZO, R. NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, F. Growth and mineral absorption in maize seedlings as affected by increasing NaCl concentrations. **Journal of Plant Nutrition**, v.4, p.687-699, 1991.

KHAN, M.H.; PANDA, S.K. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two Rice cultivars under NaCl-salinity stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.30, n.1, p.81-89, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The Germination of Seeds**. 4 ed. Great Britain: Pergamom Press, 1989, 270p.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MISTURA, C. et al. de. Germinação e desenvolvimento de plântulas de cunhã em função da salinidade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, n.2, p.306-317, 2011.

MORRIS, D.L. Quantitative determination of carbohydrates with Drywood's anthrone reagent. **Science**, v.107, p.254-255, 1948.

MUNNS, R. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. **Plant, Cell and Environment**, v.16, p.15-24, 1993.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.239-250, 2002.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v.167, n.03, p.645-663, 2005.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

PASSOS, L.P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL, 1996, 223p.

PHILLIPS, J.R.; OLIVER, M.J.; BARTELS, D. Molecular genetics of desiccation and tolerant systems. In: CAB INTERNATIONAL. Desiccation and survival in plants: drying without dying. Washington, p.319-341, 2002.

RICHARDS, L.A. **Suelos Salinos y Sódicos**. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México. 1980. 171p.

ROSEN, H.A modified ninhydrin calorimetric analysis for amino acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.67, p.10–15, 1957.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. California: Wadsworth, Inc. 1992. 682p.

SHALHEVET, J.; HUCK, M.G.; SCHROEDER, B.P. Root and shoot growth responses to salinity in maize and soybean. **Agronomy Journal**, v.87, p.512-516, 1995.

SILVA, M.B.R.; VIÉGAS, R.A.; DANTAS-NETO, J.; FARIAS, S.A.R. Estresse salino em plantas da espécie florestal sabiá. **Caminhos da Geografia**, v.10, n. 30, p.120-127, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719p.

VELLOSO, A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; PAREYN, F.G.C. (Eds.). **Ecorregiões: propostas para o bioma caatinga**. Associação Plantas do Nordeste. Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil, Recife, 72 p. 2002.

VIÉGAS, R.A. et al. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.05, n.02, p.216-222, 2001.

WINICOV, I. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. **Annals of Botany**, v.82, p.703-710, 1998.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v.57, p.508-514, 1954.

CAPÍTULO V

**ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E ACÚMULO DE PROLINA EM
SEMENTES DE *Erythrina velutina* Willd. (LEGUMINOSAE – PAPILIONOIDEAE)
SUBMETIDAS A ESTRESSES ABIÓTICOS DURANTE A GERMINAÇÃO**

RESUMO - Atividade de enzimas antioxidantes e acúmulo de prolina em sementes de *Erythrina velutina* willd. (Leguminosae – Papilionoideae) submetidas a estresses abióticos durante a germinação – Estresses abióticos induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas e sementes e sistemas antioxidantes eficientes podem atenuar diversos efeitos nocivos causado pelo estresse oxidativo como a síntese específica de determinadas enzimas, bem como ativar mecanismos com atividade osmoprotetora, como o aminoácido prolina, que desempenha um papel importante no ajustamento osmótico e remoção de radicais livres. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes estresses abióticos na atividade das enzimas antioxidantes e no acúmulo da prolina em sementes de *Erythrina velutina* durante a germinação. Sementes de mulungu foram escarificadas e colocadas para germinarem nas temperaturas constantes de 15, 25 e 35°C e umedecidas com água destilada e 12h de luz. Outras sementes foram expostas a soluções teste de NaCl (condutividade elétrica 0, 4 e 8 dS.m⁻¹) e soluções de polietilenoglicol (potencias osmóticos 0,0; -0,2 e -0,6 MPa) e mantidas em câmaras de germinação ajustadas a 25°C, fotoperíodo 12h durante 7 dias. Ao final de cada período de embebição os cotilédones e eixo embrionário foram coletados separadamente e utilizados para quantificar o teor de prolina e atividades das enzimas CAT, APX, GOPX e GST. As atividades das enzimas antioxidantes e da prolina foram detectadas nos cotilédones e eixo embrionário de sementes de mulungu. A atividade antioxidante foi variável dependendo do tipo e nível de estresse aplicado. Os resultados encontrados permitem inferir que sob o aspecto do processo de desintoxicação, o mecanismo encontrado nas sementes de mulungu é mais eficiente quando submetidas a diferentes temperaturas, seguido pelo estresse salino e estresse hídrico.

Palavras-chave: Estresse abiótico, sementes, germinação, enzimas antioxidantes, mulungu

ABSTRACT - Activity of antioxidant enzymes and proline accumulation in *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) seeds submitted to abiotic stresses during germination - Abiotic stresses induce the production of reactive oxygen species (ROS) in plant tissues and efficient antioxidant systems can attenuate many adverse effects caused by oxidative stress as the synthesis of specific enzymes, as well as enabling mechanisms osmoprotector with activity as the amino acid proline, which plays an important role in the osmotic adjustment and removal of free radical. The aim of this study was to evaluate the effect of different abiotic stress on antioxidant enzyme activities and accumulation of proline in *Erythrina velutina* seeds during germination. Mulungu seeds were scarified and put to germinate at constant temperatures of 15, 25 and 35°C and moistened with distilled water and 12 h of light. Other seeds were exposed to solutions of NaCl (EC 0, 4 and 8 dS.m⁻¹) and polyethylene glycol (osmotic potential 0, 0.2 and 0.6 - MPa) and maintained in a chamber set at 25°C, photoperiod 12 h, during 7 days. At the end of each period of imbibition embryonic axis and cotyledons were collected separately and used to quantify proline and activities of CAT, APX, and GST GOPX. Antioxidant enzymes and proline content were detected in both segments of mulungu seeds. The antioxidant activity varied depending upon the type and degree of applied stress. It was possible to infer that the aspect of the detoxification process, the mechanism found in the mulungu seeds is more efficient when subjected to different temperatures followed by salt and water stress.

Key words: abiotic stress, seeds, germination, antioxidant enzymes, mulungu

INTRODUÇÃO

Algumas espécies vegetais nativas da caatinga têm grande importância biológica devido ao potencial de uso popular, avaliados através de levantamentos etnobotânicos, à confirmação científica da produção de compostos naturais considerados ‘úteis’ por suas aplicações em indústrias de medicamentos e também à pressão antrópica que sofrem pelo extrativismo das mesmas, levando à inclusão de algumas na lista das espécies ameaçadas de extinção.

Erythrina velutina, uma espécie florestal nativa da caatinga, da região nordeste brasileira, tem mostrado um comportamento interessante quanto a tolerância ou mecanismos de adaptações a estresses abióticos, especialmente térmico, salino e hídrico (RIBEIRO-REIS, 2012²). Outro fato que faz dessa espécie ser importante nesse tipo de estudo, está voltado para sua importância econômica, ornamental e medicinal além de fazer parte da lista de espécies ameaçadas de extinção. Essa espécie produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis, sendo esta sua principal via de propagação. É, portanto, uma planta que cresce em meio às condições de seca e altas temperaturas na maior parte do ano (LORENZI & MATOS, 2002; CARVALHO, 2008).

As sementes constituem a via de propagação mais empregada na implantação de plantios, sendo de fundamental interesse o estudo de vários fatores que interferem na propagação, principalmente a germinação e o vigor das sementes, que influenciam de forma direta na distribuição das espécies (NASSIF et al., 2009).

O sucesso do estabelecimento de plântulas é em sua maior parte dependente da qualidade da semente (viabilidade e vigor). A resistência elevada a estresses abióticos é uma característica original de sementes, mas que não é explorada como uma fonte potencial para conferir tolerância a plântulas ou plantas inteiras, assim como não é explorado como um marcador potencial para o estabelecimento e melhoria do plantio como um todo. Nesse sentido, sementes podem estar expostas a estresses severos também durante o desenvolvimento e maturação, incluindo seca e temperaturas elevadas (BOWLER & FLUHR, 2000; PASTORI & FOYER, 2002).

² RIBEIRO-REIS, R.C. Tolerância a estresses abióticos em sementes de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae – Papilionoideae) nativa da caatinga, 2012. Dados não publicados.

As plantas sob condições de estresse, podem manifestar reações oxidativas durante as quais espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas, tais como o radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) (SCANDALIOS, 1993; MITTLER, 2002; RIZZARDI et al., 2003). O estresse oxidativo implica em um conjunto de eventos prejudiciais à planta, onde as EROs desencadeiam reações à partir de radicais livres que, de maneira indiscriminada, atingem qualquer tipo de macromolécula alterando a funcionalidade da mesma (MARTINEZ-CAYUELA, 1998). O aumento na atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos pode ser uma resposta adaptativa das células ao aumento das EROs (MITTLER, 2002).

As sementes, de uma maneira geral, são bem providas de moléculas antioxidantes e sistemas removedores (HOEKSTRA et al., 1996). Segundo Nkang et al. (2000), é possível que a atividade e estrutura de certas enzimas ou proteínas estruturais, em sementes sensíveis à estresses, sejam permanentemente alteradas, resultando em perda de atividade biológica. Enzimas removedoras de radicais livres podem reduzir os produtos tóxicos resultantes do ataque de radicais livres, antes que os danos possam ocorrer (NKANG et al. 2000).

Halliwell & Guteridge (1989) definiram os compostos antioxidantes como substâncias que, em relativamente baixas concentrações, competem com outros substratos oxidáveis e, portanto, diminuem significativamente ou inibem a oxidação destes substratos. Nesta definição incluem-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX), guaiacol peroxidase (GOPX) e catalase (CAT); também se pode incluir aqueles não enzimáticos, como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e glutathione reduzida (GSH) (DRÖGE, 2002).

Outro composto também tem sido estudado como resposta de plantas a estresses abióticos, é o aminoácido prolina. Muitas plantas acumulam prolina em condições de déficit hídrico, salinidade, temperaturas extremas e alguns outros estresses ambientais, adicionalmente à ativação da atividade de enzimas antioxidantes (COSTA & MOREL, 1994; SCHAT et al., 1997; CHEN et al., 2001). Nessas situações a prolina atua como mediador do ajustamento osmótico, estabilizador de proteínas (VAN RENSBURG et al., 1993) e removedor de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SMIRNOFF & CUMBES, 1989), entre diversas outras funções.

Existem poucos relatos sobre mecanismos bioquímicos de resposta ao estresse e mais especificamente na atividade de enzimas antioxidantes em sementes. Por isso, diante da escassez de estudos acerca do processo em sementes e plântulas de espécies arbóreas nativas da caatinga, este trabalho objetivou verificar as atividades das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e o acúmulo de prolina durante a germinação de sementes de *Erythrina velutina* submetidas a estresses abióticos.

METODOLOGIA

Obtenção de sementes

Foram utilizadas sementes de *E. velutina* provenientes de matrizes do Município de Jutai (Lagoa Grande -PE), cujas coordenadas são W 37° 18' 03" S 90° 52' 92" coletadas em outubro de 2009. As sementes foram beneficiadas manualmente, acondicionada em saco plástico transparente (0,15 mm de espessura) e mantidas em temperatura ambiente (30°C±5°C, 56±6% UR) no Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Semiárido – LASESA, Petrolina –PE, local onde foram conduzidos os ensaios.

Previamente aos ensaios fisiológicos procedeu-se a escarificação mecânica do tegumento externo das sementes com o auxílio de uma mini-retífica (Western R-40). Em seguida as sementes escarificadas foram submetidas à assepsia utilizando solução de hipoclorito de sódio comercial (2%) durante 2 minutos, sendo posteriormente lavadas em água destilada.

As variáveis avaliadas foram: porcentagem de germinação, tempo médio, velocidade média e índice de velocidade de germinação (SANTANA & RANAL, 2004).

Estresse de temperatura

Sementes foram acondicionadas, após assepsia, em rolos de papel germitest, umedecidos com água destilada correspondente em volume a 2,5 vezes o peso do substrato. Os rolos contendo as sementes foram incubados em germinadores do tipo BOD ajustados a temperaturas constantes de 15, 25 e 35°C, fotoperíodo de 12h por um período de 7 dias consecutivos. A avaliação foi realizada diariamente sendo consideradas

germinadas as sementes que protruíram radícula com pelo menos 2 mm de comprimento sendo estas contadas e ao final do período de embebição coletadas.

Estresse hídrico

Sementes foram acondicionadas, após assepsia, em rolos de papel germitest, umedecidos com soluções teste de PEG 6000 em diferentes potenciais osmóticos (0,0; -0,2 e -0,6 MPa) preparadas de acordo com Villela et al. (1991), correspondente em volume a 2,5 vezes o peso do substrato. Os rolos contendo as sementes foram incubados em germinadores a 25°C, fotoperíodo de 12h por um período de 7 dias consecutivos. A avaliação foi realizada diariamente sendo consideradas germinadas as sementes que protruíram radícula com pelo menos 2 mm de comprimento sendo estas contadas e ao final do período de embebição coletadas.

Estresse salino

Sementes foram acondicionadas, após assepsia, em rolos de papel germitest, umedecidos com solução de NaCl, correspondente em volume a 2,5 vezes o peso do substrato, em diferentes concentrações, de condutividade elétrica (CE) aferidas em 0, 4 e 8, dS.m⁻¹. Para obtenção das soluções de NaCl, seguiu-se a tabela proposta por Richards (1980), onde quantidades de sal foram diluídas em água destilada e, posteriormente, tiveram sua condutividade elétrica medida em condutivímetro “Digimed” modelo CD-21. Os rolos contendo as sementes foram incubados em germinadores do tipo BOD ajustados a temperaturas constantes de 25°C, fotoperíodo de 12h por um período de 7 dias consecutivos. A avaliação foi realizada diariamente sendo consideradas germinadas as sementes que protruíram radícula com pelo menos 2 mm de comprimento sendo estas contadas e ao final do período de embebição coletadas.

Extração de Proteínas

Ao final dos períodos de embebição dos ensaios de estresses abióticos, os cotilédones e eixo embrionário foram coletados, para subsequente extração. A extração das macromoléculas foi feita através da maceração até homogeneização de 1 g de matéria fresca das amostras coletadas em 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5; contendo 1 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 3 mM de DTT (ditiotreitól) e 5% de PVPP (polivinilpolipirrolidona) (GOMES-JUNIOR et al., 2006) sendo,

posteriormente centrifugadas a 10.000xg durante 30 min a 4°C. O sobrenadante coletado foi dividido em alíquotas de 1,5 mL e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

Quantificação de Proteínas

A partir do extrato bruto obtido foram determinados os teores de proteínas solúveis totais espectrofotometricamente, seguindo à metodologia descrita por Bradford (1976).

Determinação de enzimas antioxidantes

Atividade da Catalase (CAT)

A atividade CAT foi determinada como descrito por Azevedo et al. (1998) em uma mistura de reação a 25°C contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 2,5 µL de H₂O₂ (30%, peróxido de hidrogênio) preparada imediatamente anterior ao uso. A reação foi iniciada com a adição de 15 µL do extrato bruto e a atividade foi determinada em espectrofotômetro seguindo-se a decomposição de H₂O₂ por 2 min através das alterações na absorbância a 240 nm. Os resultados foram expressos em µmol H₂O₂ min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

Atividade de Guaiacol Peroxidase (GOPX)

A atividade GOPX foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Matsuno & Uritani (1972) com pequenas modificações. O ensaio foi conduzido em uma mistura de reação contendo 1,25 mL de tampão fosfato-citrato (solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M); pH 5,0; 0,5% de guaiacol; 3% de H₂O₂ e 50 µL de extrato. Esta mistura foi incubada a 30°C por 15 min. Após incubação, a mistura foi colocada em banho de gelo adicionando-se 125 µL da solução de meta bissulfito de sódio a 2% (volume final 2,5 mL). Após agitação em vortex, a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos e a leitura de absorbância foi feita em 450 nm. A atividade enzimática foi expressa em unidades de absorbância min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

Atividade de Ascorbato Peroxidase (APX)

Atividade da APX foi determinada segundo o método de Nakano e Asada (1981), em que 40 µL do extrato enzimático foi acrescentado a uma mistura de reação 50 mM de fosfato de potássio (pH 7,0), 0,1mM de EDTA, 0,1 mM de H₂O₂ e 0,5 mM de ácido

ascórbico. A atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo da absorvância a 290 nm devido à diminuição da concentração do ascorbato (AsA) e expressa em $\eta\text{mol AsA}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$.

Atividade da Glutathione-S-Transferase (GST)

A atividade GST foi determinada através da utilização do Glutathione S-Transferase Assay Kit (CS0410 – Sigma). O ensaio foi conduzido a 25°C em uma mistura de reação contendo 980 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,5) e 10 μL de CDNB 100 mM (1-cloro-2,4-dinitrobenzene) e 10 μL de GSH 200mM (glutathione reduzida). O ensaio foi iniciado pela adição de 25 μL de amostra. Após 1 min, foi feito o monitoramento da absorvância a cada 30 s durante 5 minutos a 340 nm. A atividade foi expressa em $\mu\text{mol CDNB}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$.

Quantificação de Prolina

A determinação do teor de prolina foi feita baseada em metodologia descrita por Bates (1973), com algumas modificações. Para tanto 0,5g de matéria fresca as amostras coletadas foi macerado até serem homogeneizados em 10 mL de ácido sulfossalicílico 3% (p/v), sendo posteriormente centrifugadas 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante coletado foi dividido em alíquotas e estocado em freezer -20°C até o momento das análises.

A análise foi feita através da adição de 500 μL do extrato a 1,5 mL de solução de ninhidrina ácida e 1,5 mL de ácido acético glacial. As amostras foram incubadas a 100 °C por 1 h e em seguida colocadas em gelo para paralisar a reação. À solução foram adicionados 3 mL de tolueno, seguindo de agitação por 20 s para a completa extração da prolina. O sobrenadante (fase colorida) foi utilizado para a leitura em espectrofômetro a 520 nm e as absorvâncias comparadas à curva-padrão de prolina (0 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{gMF}^{-1}$.

Delineamento e Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado consistindo para cada estresse aplicado de 3 tratamentos e quatro repetições de 25 sementes. Os dados de porcentagem de germinação, tempo médio, velocidade média e velocidade de germinação foram analisados mediante análise de variância utilizando o programa Assistat (SILVA, 2006). As diferenças entre as médias obtidas foram comparadas pelo teste de

Tukey a 5% de probabilidade. Para efeito da análise de variância, os dados de porcentagem de germinação foram transformados pela função $(x + 0,5)^{0,5}$. Para os dados de enzimas foram estabelecidos o erro padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de germinação das sementes permaneceu em níveis elevados com o aumento da temperatura, diminuição do potencial osmótico e aumento da concentração de sal no meio germinativo (Tabela 1). A diferença foi somente significativa para sementes submetidas a 35°C onde ocorreu uma redução 18% na germinação, e no potencial de -0,6 MPa onde a porcentagem de germinação foi inibida dentro do período de embebição avaliado.

A influência dos estresses de temperatura e hídrico puderam ser verificados não só na germinação (%) como também no tempo médio, velocidade média e índice de velocidade de germinação. Na temperatura de 15°C ocorreu um aumento significativo no tempo médio necessário para que o processo germinativo nas sementes de *E. velutina* ocorresse, e uma diminuição significativa na velocidade média e índice de velocidade de germinação. A 35°C a diferença para essas variáveis foi verificada somente no índice de velocidade de germinação (Tabela 1).

Guedes et al., (2011) verificaram que em sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) a melhor temperatura para germinação da espécie foi a 30°C; segundo estes mesmos autores, esta temperatura proporcionou velocidade maior, demonstrando que o limite de temperatura, na qual a velocidade de germinação é prejudicada, está acima de 35°C assim como para *E. velutina*, sendo que, para esta espécie em estudo a melhor temperatura foi a 25°C (RIBEIRO-REIS, 2012³). De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000) a germinação será mais rápida e o processo mais eficiente quanto maior for a temperatura, até certo limite.

³ RIBEIRO-REIS, R.C. Influencia da temperatura na mobilização de reservas e germinação de sementes de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae – Papilionoideae), 2012. Dados não publicados.

Tabela 1. Germinação (G, %), tempo médio (Tm, dias), velocidade média (Vm, dias⁻¹) e índice de velocidade de germinação (IVG, protrusão de radícula.dia⁻¹) de sementes de *Erythrina velutina* submetidas a diferentes temperaturas, potenciais osmóticos e concentrações de solução de NaCl durante a germinação.

Tratamentos	G	Tm	Vm	IVG
Temperatura (°C)				
15	92 a	4,54 a	0,22 a	5,99 b
25	99 a	2,99 b	0,34 a	9,04 a
35	81 b	2,94 b	0,34 a	7,43 b
PEG 6000 (MPa)				
0,0	100 a	4,43 a	0,23 a	2,49 a
-0,2	97 a	5,59 a	0,18 b	1,76 b
-0,6	0 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c
NaCl (CE dS.m⁻¹)				
0	100 a	4,67 a	0,22 a	2,42 a
4	100 a	4,90 a	0,20 a	2,20 a
8	100 a	4,73 a	0,21 a	2,30 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna para cada tratamento não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Avaliando-se o efeito do potencial osmótico (restrição hídrica) para as sementes de *E. velutina* a solução de -0,2 MPa, promoveu um aumento no tempo médio de germinação de 4,43 (controle), para 5,59 embora não significativo. No entanto, para as demais variáveis, ocorreu uma redução significativa da velocidade média e índice de velocidade de germinação. Essas informações apontam para o IVG como um fator mais sensível aos efeitos do estresse osmótico que o percentual de germinação, corroborando com Marcos Filho (2005).

O aumento da concentração salina embora não tenha influenciado significativamente a porcentagem de germinação e demais variáveis avaliadas durante a germinação até o nível de 8 dS.m⁻¹, essa concentração de acordo com Ribeiro-Reis (2012⁴), ao analisar o desenvolvimento inicial das plântulas nas diferentes concentrações salinas, observaram, que há comportamento diferente ao germinativo, onde o aumento da salinidade, diminui o crescimento, denotando a sensibilidade das plântulas ao estresse.

⁴ RIBEIRO-REIS, R.C. Efeito do estresse salino no crescimento de plântulas de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae – Papilionoideae), 2012. Dados não publicados.

O resultados obtidos para a atividade das enzimas antioxidantes, catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GOPX) e glutathione-S-transferase (GST) em sementes de *E. velutina* submetidas a diferentes temperaturas, potenciais osmóticos e concentrações de solução de NaCl durante o período de embebição estão representadas nas Figuras 1 a 4.

A atividade da CAT apresentou variações de acordo com o estresse aplicado (Figura 1). Observou-se que na temperatura de 15°C não houve diferença na atividade desta enzima entre os cotilédones e eixo embrionário, sendo que com elevação da temperatura para 25°C houve um aumento da atividade principalmente no eixo, mantendo-se constante na temperatura de 35°C (Figura 1A). No entanto, nas sementes sob estresse hídrico a atividade da CAT foi diferente.

Corte et al., (2010) estudando o efeito do envelhecimento natural e acelerado em sementes de braúna preta (*Melanoxylon braúna* Schot.) observaram que a CAT apresentou decréscimos significativos tanto no eixo, quanto nos cotilédones no envelhecimento acelerado com 45°C. Portanto, é possível que o comportamento observado nas sementes de *E. velutina* nas diferentes temperaturas, esteja relacionado à eliminação de EROs, com o aumento de 25 para 35°C (Figura 1A), sendo que a partir dessa temperatura a atividade da CAT possa sofrer um efeito negativo.

Verificou-se um aumento da atividade da CAT com a diminuição do potencial osmótico do meio germinativo principalmente no eixo embrionário, diminuindo posteriormente com o aumento da restrição hídrica (-0,6 MPa). Esta redução mostrou-se mais acentuada no eixo, chegando a níveis equivalentes ao encontrado nos cotilédones (Figura 1B).

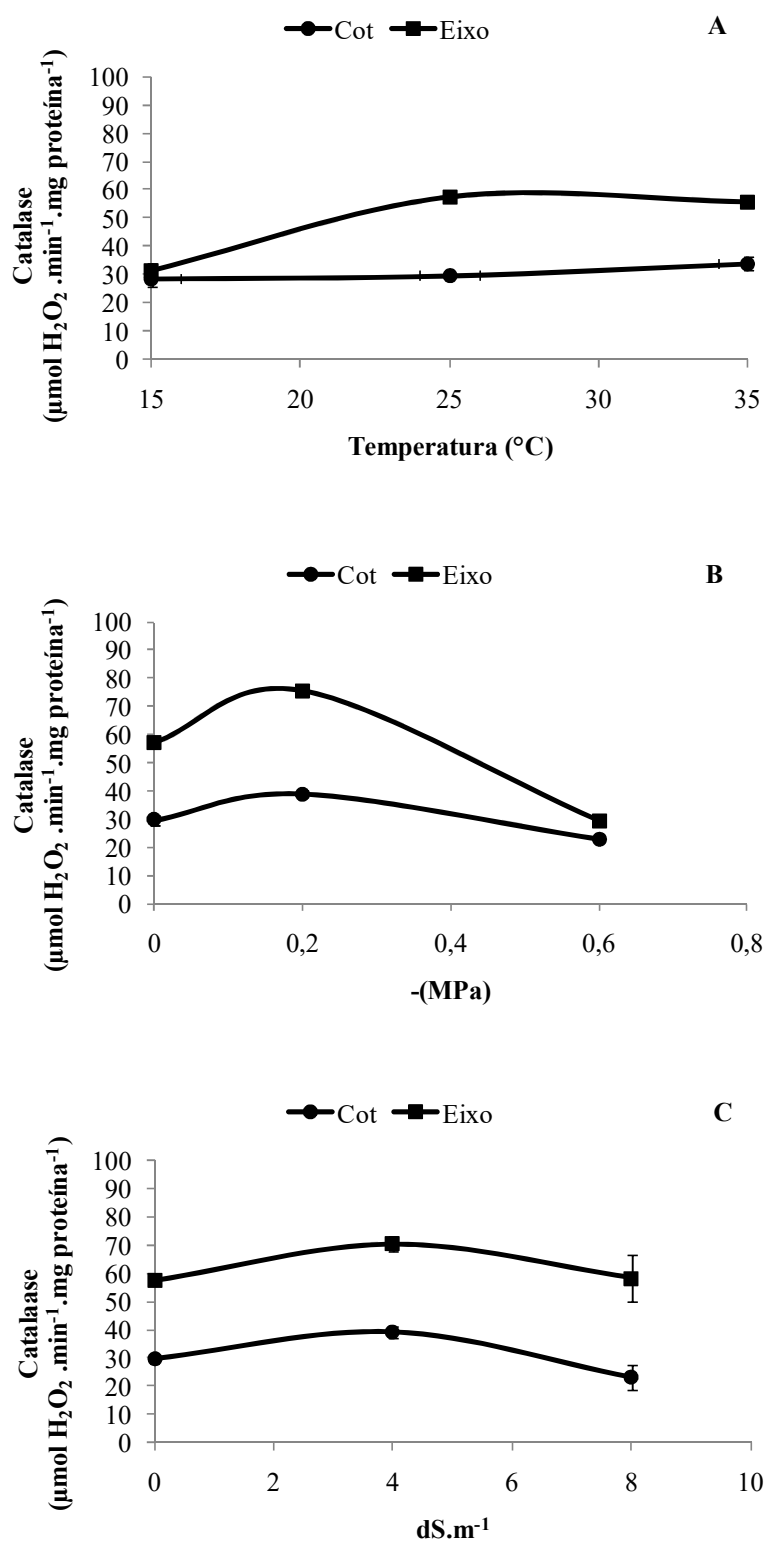


Figura 1. Atividade da Catalase (CAT) no cotilédone (COT) e eixo embrionário (EIXO) de sementes de *Erythrina velutina* submetidas a diferentes temperaturas (A); potenciais osmóticos (B) e concentrações de solução de NaCl (C), durante a germinação. Média de quatro repetições \pm EPM.

O mesmo comportamento foi verificado nas sementes submetidas às diferentes concentrações de solução de NaCl, onde a partir de 4 dS.m⁻¹, observou-se uma redução na atividade da CAT (Figura 1C). As variações encontradas nas respostas da atividade da CAT frente aos estresses aplicados demonstram que esta enzima é mais sensível a restrição hídrica e aumento da concentração de íons. De acordo com Hendry (1993), as sementes são mais sensíveis ao estresse hídrico, pois os radicais livres tendem a acumular mais, porque sistemas removedores não são efetivos em organismos desidratados.

A catalase é uma variedade de peroxidases que catalisa a quebra de peróxido de hidrogênio H₂O₂ (CHANG et al., 1984). Mudanças no balanço das enzimas desintoxicadoras de EROs induzem mecanismos compensatórios nos tecidos. Por exemplo, quando a catalase é reduzida, enzimas protetoras como APX e GPX são expressas em maiores quantidades em efeito compensatório (APEL & HIRT, 2004).

Uma evidência destas informações é representada pela atividade da APX no eixo embrionário em sementes de *E. velutina* (Figura 2). No entanto não foi verificada atividade da enzima nos cotilédones das sementes submetidas ao estresse por temperatura, hídrico e salino.

A atividade da APX no eixo embrionário aumentou em resposta a elevação da temperatura passando de 1000 para cerca de 10.000 ηmol, quando as sementes de *E. velutina* foram incubadas a 15 e 35°C, respectivamente (Figura 2A). Resultado contrário foi verificado nas sementes submetidas a estresse hídrico e salino, nos quais a atividade da APX foi inibida com a diminuição do potencial osmótico da solução de 0,0 para -0,6 MPa (Figura 2B) e reduzida com o aumento da concentração da solução de NaCl de 0 para 8 dS.m⁻¹ (Figura 2C).

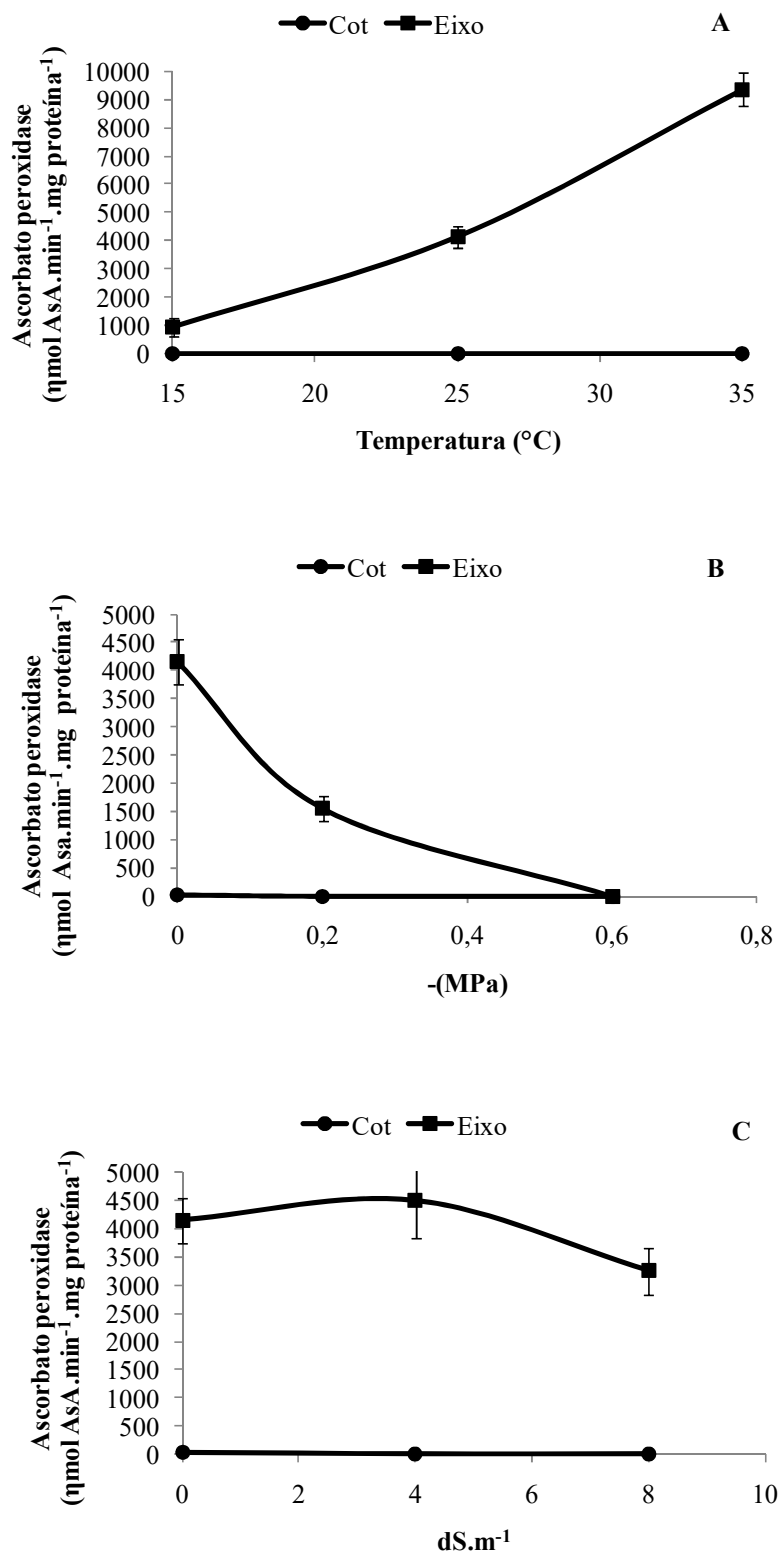


Figura 2. Atividade da Ascorbato peroxidase (APX) no cotilédone (COT) e eixo embrionário (EIXO) de sementes de *Erythrina velutina* submetidas a diferentes temperaturas (A); potenciais osmóticos (B) e concentrações de solução de NaCl (C), durante a germinação. Média de quatro repetições \pm EPM.

Deuner et al. (2011), estudando o efeito da salinidade no crescimento inicial de plântulas de quatro genótipos de feijão-miúdo (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), também verificaram comportamento distinto na atividade da APX e CAT e em geral a atividade da CAT foi inferior a da APX, sendo atribuído pela menor afinidade ao H₂O₂, tendo a APX sido mais eficaz na remoção de compostos oxidativos.

As mudanças na atividade enzimática estão baseadas na suscetibilidade específica destas enzimas ao agente causador do estresse ou, estas alterações, são resultado de um único evento, por exemplo, ativação de proteases, as quais afetariam a função de várias enzimas (VIEIRA et al., 2000).

Diversos estudos demonstraram ocorrer mudanças nas atividades das enzimas antioxidantes de plantas em resposta à seca, altas temperaturas e salinidade, sugerindo que o aumento dessas atividades possa estar intimamente relacionado à tolerância a esses estresses. A atividade de superóxido dismutase (SOD), APX e glutathiona redutase (GR), por exemplo, aumentou em genótipos tolerantes de trigo e manteve-se ou reduziu em genótipos sensíveis em resposta ao déficit hídrico (LASCANO et al., 2001).

Pôde-se verificar que ocorreu certa similaridade no comportamento das enzimas APX (Figura 2) e da GOPX (Figura 3) no eixo embrionário das sementes de *E. velutina* em resposta aos estresses. No entanto foi verificada pequena atividade desta enzima (GOPX) nos cotilédones das sementes submetidas aos diferentes tratamentos.

A atividade da GOPX no eixo aumentou em resposta ao aumento de temperatura de 15 a 35°C (Figura 3A). Resultado contrário foi verificado no eixo das sementes submetidas a estresse hídrico e salino onde se verificou que a atividade da GOPX foi praticamente inibida com a diminuição do potencial osmótico da solução de 0,0 para -0,6 MPa (Figura 3B) e reduzida com o aumento da concentração da solução de NaCl de 0 para 8 dS.m⁻¹ (Figura 3C). Esses resultados permitem inferir que sob o aspecto do processo de desintoxicação, o mecanismo é mais eficiente em sementes submetidas a diferentes temperaturas, seguido pelo estresse salino e por fim ao estresse hídrico.

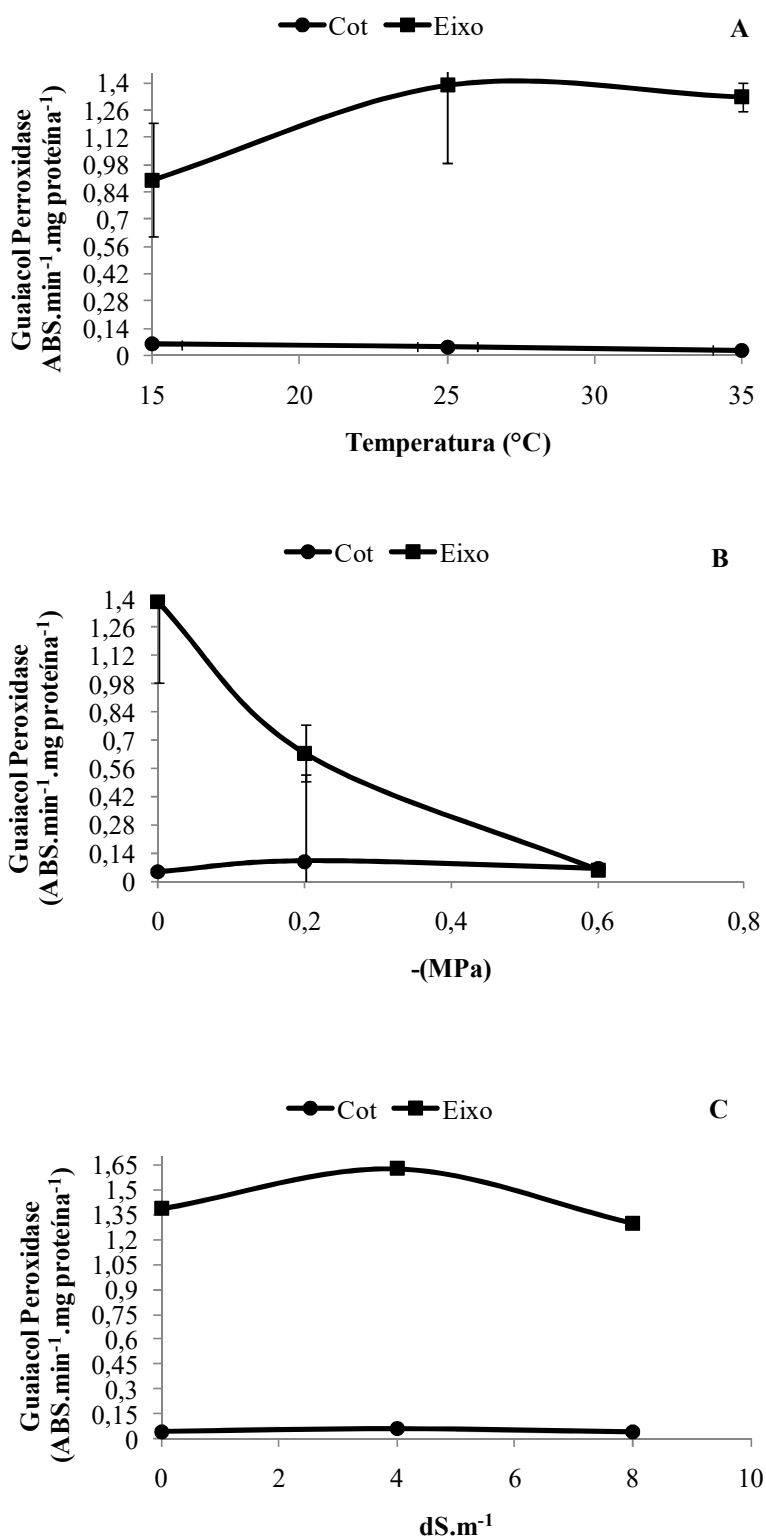


Figura 3. Atividade da Guaiacol peroxidase no cotilédono (COT) e eixo embrionário (EIXO) de sementes de *Erythrina velutina* submetidas a diferentes temperaturas (A); potenciais osmóticos (B) e concentrações de solução de NaCl (C), durante a germinação. Média de quatro repetições \pm EPM.

As plantas, quando sujeitas a estresses ambientais, tem o balanço entre a produção de EROs e atividade de antioxidantes aumentada, resultando em prejuízos oxidativos. Plantas com elevados níveis de antioxidantes, constitutivos e induzidos, tem mostrado maior resistência ao estresse oxidativo (WISE & NAYLOR, 1987; SPYCHALLA & DESBOROUGH, 1990).

Segundo Breusegem et al., (2001), o nível e o tipo das EROs são fatores determinantes para o tipo de resposta. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido ($O_2^{\cdot-}$) podem induzir genes diferentes, em conjunto ou separadamente, dando mais flexibilidade à sinalização de ERO. Bowler & Fluhr (2000), relatam que o acúmulo de H_2O_2 em tecidos específicos e em quantidades apropriadas beneficia as plantas mediando aclimação e tolerância cruzada a estresses bióticos e abióticos. Nesse contexto as peroxidases desempenham um papel crítico no metabolismo das sementes, por utilizar peróxidos como aceptor de hidrogênio, podendo contribuir para o aumento dos mecanismos de defesa e prevenção de perda na qualidade (USHIMARU et al., 2001).

Na Figura 4 são apresentados os dados relativos à atividade da enzima GST nas sementes de *E. velutina*. Observou-se de maneira geral, uma variabilidade da atividade da GST entre os tratamentos aplicados. A maior atividade da enzima foi verificada no eixo embrionário submetido ao tratamento de 35°C ($5,85 \mu\text{mol CNDB}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$, Figura 4A), por outro lado, o eixo embrionário submetido a -0,6 foi o que apresentou a menor atividade MPa ($1,80 \mu\text{mol CNDB}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$, Figura 4B). Sementes submetidas às diferentes concentrações de NaCl embora tenham obtido uma maior atividade de GST quando comparadas a sementes submetidas ao diferentes potenciais osmóticos, mostraram a mesma tendência (Figura 4C), inferindo sobre a sensibilidade na resposta enzimática sob condições abióticas.

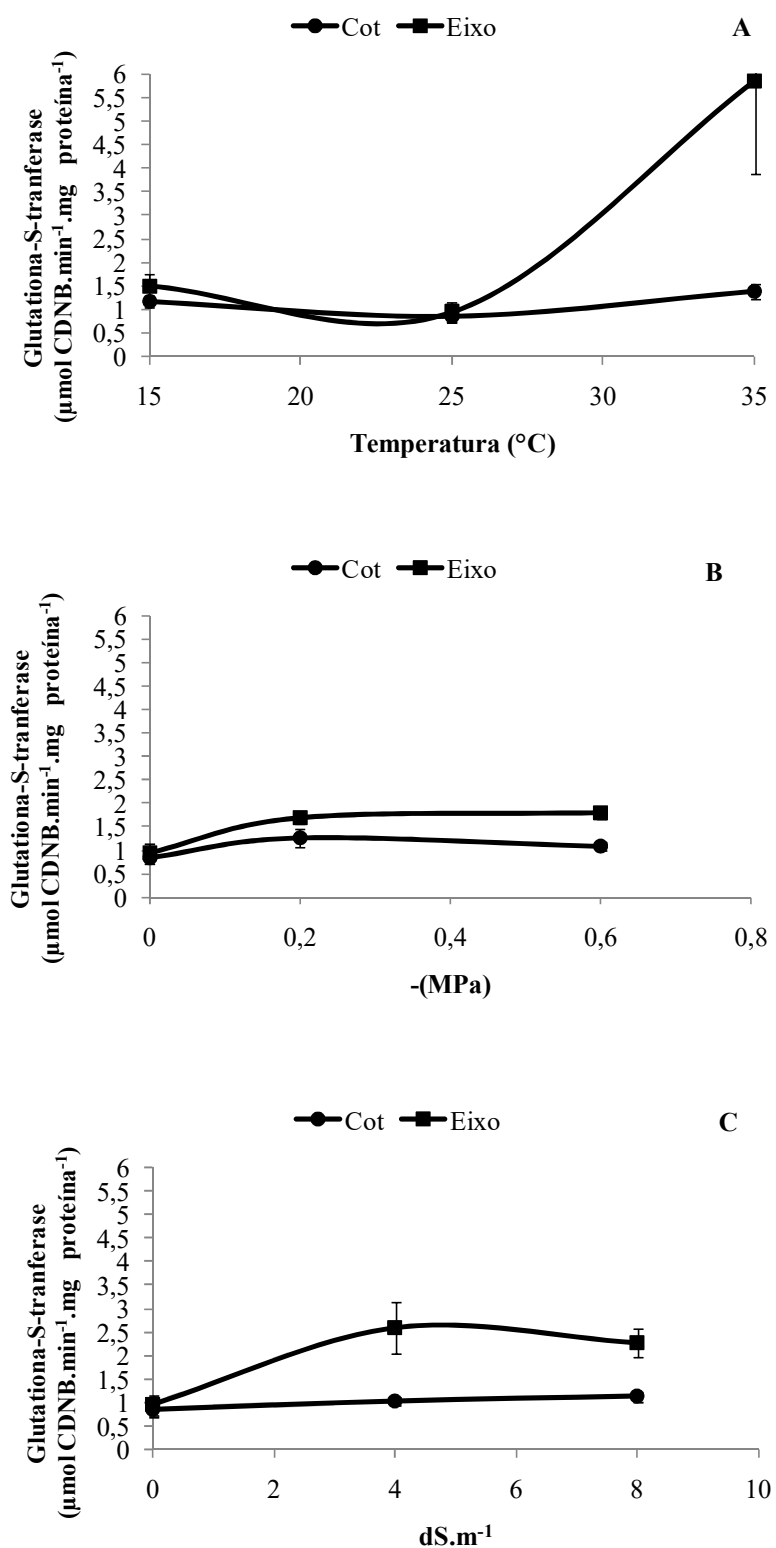
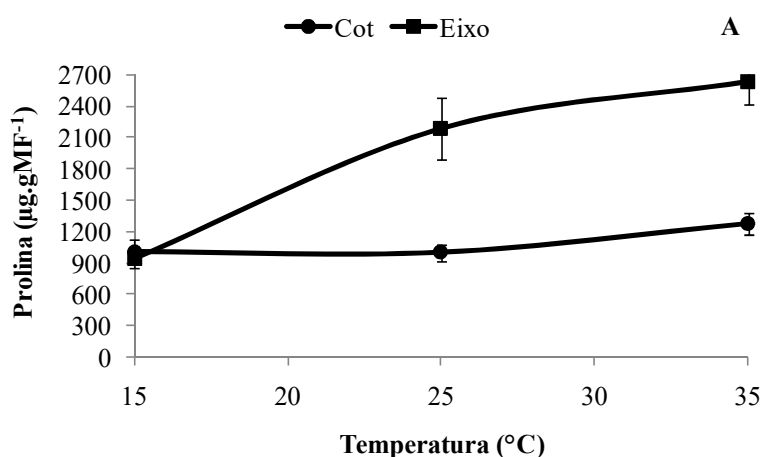


Figura 4. Atividade da Glutathione-S-transferase no cotil\u00e9done (COT) e eixo embrion\u00e1rio (EIXO) de sementes de *Erythrina velutina* submetidas a diferentes temperaturas (A); potenciais osm\u00f3ticos (B) e concentra\u00e7\u00f5es de solu\u00e7\u00e3o de NaCl (C), durante a germina\u00e7\u00e3o. M\u00e9dia de quatro repeti\u00e7\u00f5es \pm EPM.

As GSTs promovem a conjugação de GSH (glutathiona reduzida) com produtos endógenos causadores de danos oxidativos, como radicais hidroxila citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando sua desintoxicação (DUDLER et al., 1991; BARLING et al., 1993). Algumas GSTs também funcionam como glutathiona peroxidases, por atuarem diretamente sob tais produtos (BARLING et al., 1993).

Na figura 5 são apresentados os dados relativos ao teor de prolina nas sementes de *E. velutina*. Observou-se de maneira geral, uma variabilidade do acúmulo da prolina entre os tratamentos aplicados. Verificou-se um incremento nos teores de prolina no eixo embrionário submetido ao tratamento de temperatura a partir de 15°C sendo mais acentuado que nos cotilédones (Figura 5A). O teor de prolina nas sementes submetidas aos tratamentos salinos manteve-se praticamente em níveis constantes, com tendência a elevação se uma concentração maior que 8 dS.m⁻¹ for utilizada (Figura 5C), sendo que os maiores níveis foram encontrados no eixo embrionário.



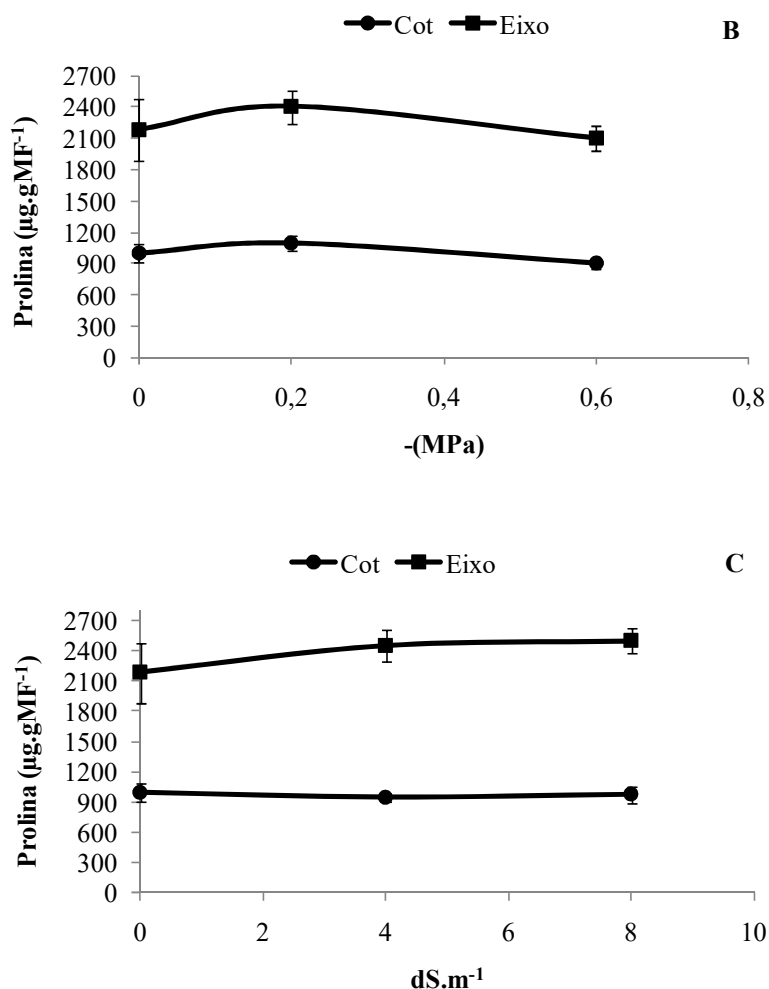


Figura 5. Teor de Prolina no cotilédone (COT) e eixo embrionário (EIXO) de sementes de *Erythrina velutina* submetidas a diferentes temperaturas (A); potenciais osmóticos (B) e concentrações de solução de NaCl (C), durante a germinação. Média de quatro repetições \pm EPM.

Com relação ao tratamento hídrico observou-se que para a prolina, assim como para enzimas antioxidantes, foi o estresse cujas sementes apresentaram maior sensibilidade. Nos cotilédones os níveis de prolina mantiveram-se constantes e no eixo embrionário ocorreu uma pequena elevação nos teores de 0,0 para -0,2 MPa (Figura 5B) sendo que a partir deste potencial houve redução, voltando praticamente aos níveis iniciais encontrados.

O acúmulo de prolina em plantas representa uma importante resposta adaptativa a estresses abióticos, principalmente devido à sua propriedade osmoprotetora. Durante situações de seca e alta salinidade, o seu acúmulo reduz a osmolaridade da célula,

promovendo o influxo de água, que por sua vez promove a manutenção do turgor necessário para a expansão celular e aumento da rigidez mecânica de células e tecidos (KAVI KISHOR et al., 2005).

Ainda sob condições de estresse osmótico, a integridade de membranas deve ser mantida a fim de evitar a desnaturação protéica. A prolina parece interagir com enzimas e outras proteínas preservando suas estruturas e atividades. Diversos trabalhos associam o acúmulo de níveis elevados de prolina e a tolerância a estresses osmóticos, como seca e salinidade (HONG et al., 2000). Além de contribuir para o ajustamento osmótico, os elevados teores de prolina presentes nas sementes de mulungu podem ter desempenhado um papel adicional de proteção das sementes durante os diferentes tratamentos abióticos aplicados.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- As atividades das enzimas antioxidantes e da prolina foram detectadas nos cotilédones e eixo embrionário de sementes de mulungu;
- A maior atividade enzimática apresentada no tratamento aplicado indica uma maior tolerância;
- A atividade antioxidante foi variável dependendo do tipo e nível de estresse aplicado, no entanto forneceu indicativos de que a germinação é pouco afetada devido as sementes de mulungu apresentarem mecanismos de defesa contra EROs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.J.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.280-292, 1998.

BARLING, D. et al. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **European Journal of Biochemistry**, v.216, p.579-86, 1993.

BATES, L.S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**, v.39, p.205-207, 1973.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, v.5, p.241-246, 2000.

BREUSEGEM, F.V.; VRANOVA, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. FUNEP: Jaboticabal, 2000. 588p.

CHANG, H.; SIEGEL, B.Z.; SIEGEL, S.M. Salinity induced changes in isoperoxidase in taro, *Colocasia esculenta*. **Phytochemistry**, v.23, p.233-235, 1984.

CHEN, C.T.; CHEN, L.M.; LIN, C.C.; KAO, C.H. Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. **Plant Science**, v.160, n.2, p.283-290, Jan. 2001.

CORTE, V.B. et al. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.083-091, 2010.

COSTA, G.; MOREL, J.L. Water relations, gas exchange and aminoacid content in Cd-treated lettuce. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.32, n.4, p.561-570, July 1994.

DEUNER, C. et al. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.711-720, 2011.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, n.1, p.47-95, Jan. 2002.

DUDLER, R. et al. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. **Molecular Plant- Microbe Interactions**, v.4, p.14-18, 1991.

GUEDES, R.S. et al. Germinação e vigor de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Allemão em diferentes substratos e temperaturas. **Revista Árvore**, v.35, n.5, p.975-982, 2011.

GOMES-JUNIOR, R.A. et al. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v.65, p.1330-1337, 2006.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 2nd ed. Oxford: Clarendon, 1989. 496 p.

HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, v.3, p.141-153, 1993.

HOEKSTRA, F.A.; WOLKERS, W.F.; BUITINK, J.; GOLOVINA, E.A. Desiccation Tolerance and Long Term Structural Stability. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEEDS: basic and applied aspects of seed biology, 1995, Reading. **Proceedings...** Reading: University of Reading, p.1-12, 1996.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D.P.S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline

accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, n.122, p.1129-1136, 2000.

KAVI KISHOR, P.B. et al. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v.108, p.1387-1394, 1995.

LASCANO, H.R. et al. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.1095–1102, 2001.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARTINEZ-CAYUELA, M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. **Ars Pharmaceutica**, v.39, n.1, p.5-18, 1998.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant Cell Physiology**, v.13, p.1091-1101, 1972.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v.7, n.9, p.405-410, Sept. 2002.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant and Cell Physiology**, v.22, n.5, p.867-880, 1981.

NASSIF, S.M.L.; VIEIRA, I.G.; FERNANDES, G.D. **Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação de sementes**. Disponível em <http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>>. Acesso em: 09 dez. 2011.

NKANG, A.; OMOKARO, D.; EGBE, A. Effects of desiccation on the lipid peroxidation and activities of peroxidase and polyphenoloxidase in seeds of *Telfairia occidentalis*. **Seed Science and Technology**, v.28, n.1, p.1-9, 2000.

PASTORI, G.M.; FOYER, C.H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, v.129, p.460-468, jun. 2002.

RICHARDS, L.A. **Suelos Salinos y Sódicos**. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México. 1980. 171p.

RIZZARDI, M.A. et al. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.957-965, Out. 2003.

SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. **Análise da Germinação**: um enfoque estatístico. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004, 248p.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, n.1, p.7-12, Jan. 1993.

SCHAT, H.; SHARMA, S.S.; VOOIJS, R. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v.101, n.3, p.477-482, Nov. 1997.

SPYCHALLA, J.P.; DESBOROUGH, S.L. Superoxide dismutase, catalase, and alpha-tocopherol content of stored potato tubers. **Plant Physiology**, v.94, p.1214-1218, 1990.

USHIMARU, T.; KANEMATSU, S.; KATAYAMA, M.; TSUJI, H. Antioxidative enzymes in seedling of *Nelumbo nucifera* germinated under water. **Physiologia Plantarum**, v.112, n.1, p.39-46, 2001.

VIEIRA, A.R.; VIEIRA, M. das. G.G.C.; OLIVEIRA, J.A. et al. Alterações fisiológicas e enzimáticas em sementes dormentes de arroz armazenadas em diferentes ambientes. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.2, p.53-61, 2000.

VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, n.11/12, p.1957-1968, nov./dez. 1991.

WISE, R.R.; NAYLOR, A.W. Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and endogenous antioxidants. **Plant Physiology**, v.83, p.278-282, 1987.

RESUMO GERAL

RIBEIRO-REIS, R.C. **Tolerância a estresses abióticos em sementes de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) nativa da caatinga.** 2012. 132p. (Tese - Doutorado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA.

O mulungu (*Erythrina velutina* Willd.), pertence à família Leguminosae e apresenta diversos usos, econômico, medicinal e para agricultura familiar nordestina. No entanto, pouco se conhece sobre o comportamento de suas sementes em condições de estresse, que ocorrem na região nordeste. Objetivou-se com esse trabalho caracterizar os perfis fisiológico, metabólicos da germinação e determinar a atividade de enzimas antioxidantes em sementes e plântulas de mulungu sob condições de estresse térmico, hídrico e salino. Foram avaliados a porcentagem, índice de velocidade, tempo médio, velocidade média e coeficiente de uniformidade da germinação, tamanho e massa fresca e seca de plântulas. Os cotilédones, eixo embrionário, parte aérea, raiz, bem como os cotilédones das sementes quiescentes foram separados e quantificados os teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), proteínas solúveis (PT), aminoácidos totais (AA), prolina e das atividades das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GOPX) e glutathione-S-transferase (GST). A germinação, a mobilização e degradação das reservas das sementes de *E. velutina* foram afetadas pelas temperaturas baixas e elevadas de incubação e também à restrição hídrica. A germinação das sementes não foi afetada negativamente até a CE de 18 dS.m⁻¹, no entanto, a restrição hídrica promovida pela solução de NaCl afetou negativamente o crescimento das plântulas. A atividade antioxidante foi variável dependendo do tipo e nível de estresse aplicado, no entanto forneceu indicativos de que a germinação pode ser pouco afetada devido a atividade de enzimas envolvidas no mecanismo de defesa contra espécies reativas de oxigênio sob condições de estresse abiótico.

Palavras-chave: Sementes, germinação, estresse abiótico, macromoléculas, enzimas antioxidantes, *Erythrina velutina*

ABSTRACT

RIBEIRO-REIS, R.C. **Tolerance to abiotic stress of *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) seeds - specie native of caatinga.** 2012. 132p. (Thesis - PhD in Botany). University State of Feira de Santana, Feira de Santana, BA

Mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) tree belongs to the family Leguminosae and shows high potential to family farming uses, medicinal and economic for northeast region of Brazil. However, the knowledge about the behavior of their seeds under stress condition is scarce. The objective of this study is to characterize the physiological and metabolic profiles of germination and to determine the activity of antioxidant enzymes in seeds and seedlings under conditions of heat, water and salt stress. Were assessed the percentage, average time, average speed, index of speed and coefficient of uniformity of germination, size and fresh and dry weight of seedlings. Cotyledons, embryonic axis, shoot, root, and cotyledons of quiescent seeds were collected and after extraction was subjected to measurements of total soluble sugars (TSS), reducing sugars (RS), soluble protein (TP), total amino acids (AA), proline and activities of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GOPX) and glutathione S-transferase (GST). The germination, mobilization and degradation of reserves of *E. velutina* seeds were affected by low and high temperatures of incubation and also water restriction. Seed germination was not affected negatively by EC 18 dS.m⁻¹, however water restriction promoted by NaCl solutions affected the growth of seedlings. Antioxidants activity varied depending on kind and level of applied stress, giving indications that germination might be slightly affected due to significant activity of antioxidant enzymes involved in defense against reactive oxygen species under conditions of abiotic stress.

Key words: seed, germination, abiotic stress, macromolecules, antioxidant enzymes, *Erythrina velutina*