

THELMA REGINA GABRIEL DA SILVA



COMPOSTOS DE RESERVA EM SEMENTES DE
DALBERGIA miscolobium BENTH.:
CARACTERIZAÇÃO HISTO E BIOQUÍMICA E
VARIAÇÃO DURANTE A GERMINAÇÃO.

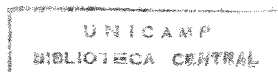
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Thelma Regina Gabriel da Silva 60-25
aprovada pela Comissão Julgadora 08/95

Sônia M. C. Dietrich

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em
ciências na Área de Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Machado de Campos Dietrich

Campinas - 1995



565079



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Si38c

Silva, Thelma Regina Gabriel da

Compostos de reserva em sementes de *Dalbergia
miscolobium* Benth : caracterizações histo e bioquímicas
e variação durante a germinação / Thelma Regina Gabriel
da Silva. -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Sônia M. C. Dietrich.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Germinação. 2. Sementes oleaginosas.
3. Citoquímica vegetal. 4. Química vegetal. 5. Plantas -
Histoquímica. 6. Plantas - Proteínas. 7. Cerrados.
8. Leguminosa. I. Dietrich, Sônia Machado de Campos.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

UNIDADE	73C
N.º CHAMADA:	7/UNICAMP
	Si 38c
V.	Ex
TEMPO BC/	28025
PROC.	667196
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 14,00
DATA	23/07/96
N.º CPD	

CM-000 90324-6

*Aos meus pais, Luzia e Milton, e ao Pedrinho,
pelo apoio, compreensão e imenso carinho.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Sonia M. C. Dietrich, pela orientação precisa e valiosa, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, pela confiança, incentivo e apoio, durante a realização deste trabalho, e especialmente pela inestimável compreensão e carinho nos momentos difíceis, meu respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Angelo L. Cortelazzo, a quem devo muito pela co-orientação, interesse, entusiasmo, oportunidade, cooperação, amizade, apoio e todas as demais forças e esforços, para que eu chegasse até aqui. A você Angelo, meu profundo agradecimento.

À Profa. Dra. Ana M. M. A. Lagôa, pela grande amizade, pelo incentivo e cooperação de sempre, pelas valiosas e inúmeras sugestões, durante a leitura do manuscrito e por ocasião da pré-banca, obrigada Maga.

À Profa. Dra. Maria de Fátima A. Pereira, pelas enriquecedoras sugestões dadas durante a realização da pré-banca.

Ao Prof. Dr. Gil M. Felipe e à Profa. Dra. Ana M. Monteiro, por terem sido os responsáveis pela minha orientação, durante a fase do trabalho desenvolvida no Depto. de Fisiologia Vegetal da UNICAMP.

À Profa. Dra. Tereza C. Cavalcanti, ao Sr. Fernando Guimarães e ao laboratório de Bioquímica do CAISM, não só pelas dosagens e caracterizações dos lipídios, mas também pelas importantes sugestões e pela cooperação demonstrada.

À Profa. Dra. Laurecir Gomes, que muito auxiliou nas eletroforeses e que de forma amiga e segura contribuiu para o enriquecimento desse trabalho, por tudo mais Laure, obrigada.

A Maria Helena Sartoran e Fernanda C. Reis, pelo grande auxílio prestado, durante os experimentos para extração e dosagem de carboidratos e proteínas.

À Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do IBt, aos queridos colegas e incentivadores amigos, que muito ajudaram no desenvolvimento desse trabalho e que compartilharam comigo momentos inesquecíveis.

Aos professores, colegas e funcionários do Depto. de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, por tudo o que me foi possível realizar e aprender, durante todos esses anos de trabalho conjunto.

Aos professores, colegas e funcionários do Depto. de Biologia Celular da UNICAMP, pelas oportunidades de trabalho e estudo, pela amizade e carinho especiais recebidos nesses últimos e decisivos momentos de realização e conquista.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) e à Coordenadoria de Apoio à Pesquisa (CAPES), pelas bolsas de auxílio financeiro recebidas.

À Pontifícia Universidade Católica de Campinas, pelo apoio e auxílio prestados.

Ao amigo e colaborador Nelson F. M. e Silva, pelo auxílio no trabalho de editoração dessa tese.

Aos velhos e novos amigos, Maga, Aldo, Ana, Marlene, Márcia, Angelo, Tânia, Rai, Pilar, Heidi, Laure, Lúcia, Urara e a todos aqueles que sempre estiveram ao meu lado, contribuindo à sua maneira para o meu crescimento.

À grande família, meu querido filho Pedro, meus pais e minhas irmãs, pelo incondicional apoio, pelo incentivo nas horas difíceis e pelo imenso amor que nos une.

À todos aqueles que de alguma maneira possibilitaram a realização desse trabalho.

Às forças e energias renovadoras e alimentadoras, de todos os entes iluminados, que sempre me acompanharam e acompanham, obrigada.

ÍNDICE

Introdução	01
Materiais e Métodos.....	15
1. Material.....	15
2. Métodos	15
2.1. Germinação	15
2.2. Padronização do aspecto das sementes.....	16
2.3. Padronização da massa da semente e do eixo embrionário	16
2.4. Teste de embebição	17
2.5. Determinação da massa fresca e massa seca do eixo embrionário e cotilédones.....	17
2.6. Caracterização citoquímica das sementes.....	18
2.6.1. Fixação	19
2.6.2. Inclusão e microtomia	19
2.6.3. Colorações	20
2.6.3.1. Hematoxilina-eosina (HE).....	20
2.6.3.2. Xylidine ponceau (XP).....	20
2.6.3.3. Azul de Toluidina (AT).....	20
2.6.3.4. Sudan black.....	21
2.6.3.5. Método do PAS.....	21
2.6.4. Análise das preparações	21
2.7. Determinação das substâncias de reserva das sementes provenientes de Brasília.....	22
2.7.1. Extração de lipídios totais	22
2.7.2. Extração de carboidratos solúveis.....	23
2.8. Determinação das substâncias de reserva das sementes provenientes de Itirapina.....	23
2.8.1. Extração e determinação de lipídios totais.....	23
2.8.2. Conteúdo de ácidos graxos.....	24
2.8.3. Extração e dosagem de proteínas.....	24
2.8.4. Eletroforese	25
2.8.5. Extração e dosagem de amido e açúcares solúveis	26
2.9. Análise estatística	27
Resultados.....	28

1. Germinação de sementes não padronizadas	28
2. Germinação de sementes padronizadas quanto a cor.....	28
3. Padronização da massa das sementes e dos eixos embrionários.....	31
4. Germinação de sementes padronizadas quanto à massa	31
5. Embebição de sementes padronizadas.....	37
6. Determinação da massa fresca e massa seca do eixo embrionário e cotilédones.....	37
6.1. No período de 0 até 6 horas de embebição	41
6.2. No período de 0 até 72 horas de embebição.....	41
6.3. No período de 3 dias até 21 dias de embebição	44
6.4. No período de 0 até 6 dias de embebição	44
6.5. No período de 0 até 12 dias de embebição	47
7. Caracterização citoquímica de cotilédones e eixos embrionários.....	47
7.1. Sementes provenientes de Brasília.....	50
7.1.1. Hematoxilina-eosina (HE).....	50
7.1.2. Xylidine ponceau (XP) a pH 2,5	53
7.1.3. Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0	53
7.1.4. Sudan black.....	58
7.1.5. Microscopia de polarização.....	58
7.2. Sementes provenientes de Itirapina.....	58
7.2.1. Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0	60
7.2.2. Xylidine ponceau (XP) a pH 2,5	64
7.2.3. Sudan black.....	66
7.2.4. Método do PAS.....	66
7.2.5. Microscopia de polarização.....	72
8. Determinação do conteúdo de lipídios, açúcares solúveis - Sementes de Brasília.....	72
8.1. Conteúdo de lipídios.....	72
8.2. Conteúdo de açúcares solúveis em etanol.....	77
9. Determinação do conteúdo de açúcares, proteínas e lipídios Sementes de Itirapina.....	77
9.1. Conteúdo de lipídios totais.....	77
9.2. Composição de ácidos graxos	79
9.3. Conteúdo de proteínas	82

9.4. Conteúdo de amido	82
9.5. Conteúdo de açúcares solúveis.....	84
10. Eletroforese	84
Discussão.....	87
Conclusões.....	117
Resumo.....	120
Bibliografia.....	122

Introdução

O cerrado é uma formação vegetal que ocupa grande parte do território nacional, abrangendo cerca de um quinto de sua área (Eiten, 1972). Sua flora é extremamente rica em espécies, que em sua maioria (cerca de 500 gêneros) é composta por plantas herbáceo-arbustivas. A flora arbustivo-arbórea mostra-se pouco diversificada, com menos de 200 gêneros (Heringer et al., 1977; Ferri, 1983). Essa vegetação apresenta particularidades de forma e distribuição hoje bem conhecidas, dispondo-se em ordem crescente de biomassa como campo sujo, campo cerrado, cerrado e cerradão, sendo as três primeiras formações campestres e a última uma formação florestal (Coutinho, 1990).

As características morfofisiológicas das plantas do cerrado são o produto da interação de fatores climáticos, topográficos e edáficos.

Os cerrados do Brasil, ocorrem a altitudes que variam do nível do mar até 1240m. A pluviosidade varia de 800 até 2000mm como média anual, estando os períodos mais chuvosos compreendidos entre os meses de janeiro a março, e os de seca compreendendo os meses de junho a agosto (Eiten 1972; Gibbs et al., 1983). A temperatura média anual está entre 20 e 26° C, podendo atingir mínimas de 9°C (Patos, MG) e 5°C (Boa Vista, RO) e máximas entre 26° C (Maranhão) e 44°C (São Paulo). Os cerrados a sudoeste de São Paulo também estão sujeitos, devido a suas altitudes, a frios ocasionais, com temperaturas em torno de 18°C ou mesmo praticamente não ter frio (Reis, 1971; Eiten, 1977). Portanto, em geral, o clima da região de cerrado é do tipo tropical quente e umido, não sendo este fator, o condicionante da fisionomia da vegetação, pois os cerrados, como as matas, ocorrem em diferentes tipos climáticos (Camargo, 1963). O limite de distribuição do cerrado seria condicionado mais pelo solo do que por qualquer outro fator ecológico.

Os solos do cerrado apresentam características físicas e morfológicas de diferentes formações sendo profundos, com boa drenagem e baixa capacidade de retenção hídrica. A textura varia desde a areia até a argila, sendo do tipo latossolo-arenoso (Ranzani, 1971; Freitas e Silveira, 1977). Essas características acabam facilitando o crescimento e a boa penetração do sistema radicular das plantas, que atinge grandes profundidades, permitindo o acesso ao lençol de água subterrâneo em pouco tempo. De fato, a maioria das plantas lenhosas ou arbóreas do cerrado tem um sistema radicular bem desenvolvido, cuja taxa de crescimento em relação à parte aérea é maior (Rizzini e Heringer, 1962; Poggiani, 1971; Rizzini, 1965; Arasaki e Felipe, 1990; 1991).

O maior crescimento da raiz em relação à parte aérea tem sido atribuído à escassez nutricional dos solos do cerrado. A deficiência de zinco apresentada pelos mesmos, afeta a síntese de triptofano, que é precursor do ácido indolil-3-acético (AIA). Isso levaria a uma produção deficiente deste fitorregulador de crescimento. Possivelmente, haveria uma diferença na concentração desse hormônio entre a raiz e parte aérea, devido não só à degradação de AIA (pela AIA-oxidase) na raiz ser menor, como também por estarem aquém do necessário os níveis deste hormônio na parte aérea, para se verificar o crescimento normal durante o desenvolvimento das plantas (Beltrão, 1963; Poggiani, 1971).

A baixa taxa de crescimento e a baixa capacidade fotossintética observadas nas plantas de cerrado, podem ser resultado dentre outras coisas, das características escleromórficas das folhas que resultaria em uma resistência maior do mesófilo à entrada de dióxido de carbono. Isso todavia, pode ser compensado pela manutenção da abertura de seus estômatos durante todo o dia. No entanto, a utilização dos produtos da fotossíntese seria limitada pelo oligotrofismo mineral, principalmente a deficiência de nitrogênio e fósforo, que poderiam levar a um baixo aproveitamento do carbono fixado, por falta de enzimas ou de compostos ricos em energia (Arens, 1963; Lopes e Cox, 1977; Robison e Walker, 1981).

A escassez nutricional do solo aliada à extrema acidez e às altas concentrações de alumínio condicionariam o escleromorfismo oligotrófico e o aspecto xeromórfico da vegetação de cerrado. Estudos realizados neste solo, mostram que o mesmo não apresenta deficiência hídrica e que apesar de suas plantas apresentarem adaptações de proteção à seca (xeromorfismo), as mesmas não apresentam comportamentos adaptados a ambientes secos (xerofitismo), pois apresentam, por exemplo, livre transpiração foliar, mesmo no período de seca (Rawitscher et al., 1943; Arens, 1963; Ferri, 1977). Porém, segundo Goodland (1971), as plantas de cerrado apresentariam um escleromorfismo alumino-tóxico, tornando mais claro o escleromorfismo oligotrófico descrito por Arens (1963). A alta concentração de alumínio, teria um efeito direto no processo de absorção dos nutrientes, já escassos, devido ao pH e ao dano causado às raízes (Goodland, 1971; Malavolta et al., 1977). Assim, a ocorrência de vegetação densa e de porte nos cerrados, estaria condicionada a fatores edáficos e nutricionais, com alterações que levariam ao aumento da fertilidade, com o aumento do pH e diminuição do alumínio (Goodland e Pollard, 1973; Ferri, 1977, Lopes e Cox, 1977; Ribeiro et al., 1982). Estes fatos provavelmente, teriam relação com o gradiente de vegetação observado nos cerrados (Ferri, 1975; Lopes e Cox, 1977).

As adaptações fisiológicas das espécies que se desenvolvem nas condições de cerrado são muito importantes para a sua sobrevivência, principalmente no que tange à tolerância às altas concentrações de alumínio, havendo, porém, poucos estudos neste sentido. Com relação a este aspecto, observa-se a ocorrência de plantas acumuladoras de alumínio (mais de 1000mg/Kg de tecido, geralmente foliar), e as não acumuladoras tolerantes. Estas últimas são capazes de absorver nutrientes em presença de alumínio, sem que este seja absorvido. Este grupo de plantas compreende a maior parte das plantas de cerrado, entre elas as Leguminosae, Myrtaceae, Compositae e outras (Goodland, 1971; Haridasan, 1982).

Nas espécies acumuladoras de alumínio, este seria estocado principalmente nas folhas, transportado via floema, independentemente da época do ano (Medeiros e Haridasan, 1985). Tais espécies, apresentam níveis normais de cálcio, magnésio e zinco, o que não seria esperado devido à baixa disponibilidade destes nutrientes, e face ao pH baixo e à presença do alumínio no solo. Isso reflete o grau de adaptação obtido por essas plantas, que chegaria ao ponto de superar a interferência do alumínio na alocação dos elementos citados e também na provável capacidade de inativá-lo metabolicamente (Haridasan et al., 1986).

Alguns trabalhos mostram também, como adaptação das espécies de cerrado às condições adversas, a presença de tegumento impermeável nas sementes havendo a necessidade de escarificação para que possam germinar (Joly e Felipe, 1979; Felipe e Silva, 1984; Felipe, 1990)

Portanto, o conhecimento da fisiologia de plantas do cerrado é de especial interesse, não só devido à grande área ocupada por este tipo de vegetação, como também pelas peculiaridades das condições ambientais de seu habitat. O potencial de muitas espécies dos cerrados deveria ser explorado através de um número maior de estudos que levassem a uma compreensão mais ampla dessa formação vegetal, visando especialmente a sua manutenção, ou seja, a maneira como se multiplicam as suas espécies vegetais, com interesse principal no estudo da germinação e dos problemas ligados ao crescimento e desenvolvimento inicial das mesmas (Melhem, 1975; Mantovani e Martins, 1988).

Os componentes da semente que são o tegumento, endosperma ou os cotilédones e o eixo embrionário apresentam características ou propriedades químicas e físicas que seguramente influenciam o processo de germinação.

Para germinarem, as sementes requerem condições adequadas de umidade, temperatura e concentração de oxigênio. Essas exigências podem variar bastante entre as espécies mas, de maneira geral, o processo de embebição em água nas condições normais de pressão e temperatura desencadeia a germinação em sementes

viáveis e não dormentes. Com a embebição, ocorre a ativação metabólica na semente.

Segundo Bewley e Black (1985), o processo de respiração das sementes durante a germinação pode ser dividido em quatro fases: fase 1, onde ocorrem as hidratações e ativações das enzimas e substâncias mitocondriais associadas ao ciclo de Krebs e à cadeia respiratória, podendo durar algumas horas; fase 2 ou fase lag, onde ocorre o término da hidratação e todo o sistema enzimático pré-existente se encontra ativado. O quociente respiratório apresenta valores próximos a 3,0, indicando um processo de respiração anaeróbico (Spragg e Yemm, 1959). Apesar de nem todas as sementes apresentarem essa fase, no caso da soja e de inúmeras outras espécies, ela ocorre durante horas. Esse tempo pode se estender sob condições não ideais para a germinação, tais como baixas temperaturas ou estresse hídrico (Bradford, 1990). Na fase 3 há novo incremento na respiração aeróbica (QR próximo a 1,0). No início desta fase (ou final da fase 2 em vários casos), é observada a protrusão da radícula. Finalmente, na fase 4, ocorre nova queda no consumo de oxigênio, que coincide com o início da mobilização do material de reserva dos cotilédones ou do endosperma.

O crescimento do eixo embrionário também é um processo que merece estudos especiais. Sabe-se que após a indução da germinação, o crescimento dessa estrutura apresenta um padrão, observado para diversas espécies. Em cevada, por exemplo, ocorrem alterações na massa seca e fresca do eixo embrionário durante a germinação de sementes intactas, o mesmo ocorrendo para a massa seca e comprimento do eixo em ervilha. Ambos os resultados demonstraram que a germinação envolve duas fases distintas (Brown, 1972).

Para muitos autores, parece claro que a alteração no desenvolvimento do eixo seria uma consequência de alterações nas condições ambientais. Para outros, essa mudança seria devida a uma aceleração no suprimento de nutrientes a partir do tecido de reserva. Evidências sugerem ainda que o modelo de crescimento é uma

propriedade intrínseca do próprio eixo, sem excluir que o crescimento é também dependente de processos que ocorrem em outras partes do sistema, ou que exista uma forte interação entre as diferentes partes durante a germinação. (Brown, 1972).

Assim, mudanças na morfologia e fisiologia das várias partes da semente durante a germinação são usualmente acompanhadas por alterações no metabolismo, que é baixo na semente quiescente e é ativado no começo da germinação (Mayer e Shain, 1974). Essas alterações devem ser decorrentes dos constituintes presentes nas diferentes sementes.

As principais substâncias de reserva nas sementes são carboidratos, proteínas e lipídios. A proporção dessa composição, pode variar de espécie para espécie e até entre espécies de uma mesma família. Dessa forma, podemos distinguir basicamente, dois tipos de sementes: aquelas em que as principais reservas são carboidratos e proteínas e outras em que lipídios e proteínas aparecem em maior quantidade (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989).

No início da embebição, em algumas sementes como soja, os carboidratos são as primeiras moléculas a serem metabolizadas, seguidas pelos lipídios (Hutton e Stumpf, 1971).

Os carboidratos podem ser armazenados na forma de amido que é o principal material de reserva nas sementes cultivadas como trigo, arroz, milho e feijão (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989).

O amido é formado por dois homopolissacarídeos da glicose: amilose e amilopectina. A forma e tamanho dos grãos de amido é variável entre as espécies sendo que o conteúdo de amilose em relação ao da amilopectina determina a forma do grão. Maiores quantidades de amilopectina tornam o grão mais elíptico e maiores quantidades de amilose, mais esféricos. O amido é armazenado em organelas chamadas amiloplastos. Estas organelas podem conter enzimas que participam na síntese dessa reserva. Sua quantidade é geralmente espécie-específica podendo variar de alguns grãos, até dezenas (Banks e Muir, 1980; Bewley e Black, 1985).

Em legumes, a reserva de amido é normalmente depositada nas células dos cotilédones. Geralmente esse acúmulo se inicia concomitante ao de albuminas e se estende até depois que é iniciado o amadurecimento do fruto (Pate, 1975).

O amido é uma forma de reserva bastante comum em leguminosas podendo atingir mais de 50% da massa seca em *Pisum sp* e *Vicia faba* (Halmer, 1985).

A degradação de amido é feita pela α -amilase, que existe em pequenas quantidades nas sementes maduras. Entretanto, no início da germinação essa quantidade aumenta. Em alguns casos, há também um incremento na quantidade de fosforilases e de β -amilase (Van Onckelen et al., 1977), também envolvidas na degradação do amido.

Em certas sementes, a maior quantidade de carboidratos de reserva não é formada por amido mas por outros polissacarídeos, sendo que os principais podem ser subdivididos em três grandes grupos: mananos, galactanos e xiloglicanos. Os mananos são encontrados normalmente nos endospermas de certas espécies de Palmae, Umbeliferae e Leguminosae; galactanos ocorrem em cotilédones, sendo muito abundantes no gênero *Lupinus*; finalmente, os xiloglicanos aparecem em grandes quantidades, principalmente em cotilédones de sementes de leguminosas da sub-família Caesalpinoideae (Meier e Reid, 1982).

As proteínas de reserva são geralmente classificadas em função de sua solubilidade. Em cereais, as mais abundantes são prolaminas, solúveis em soluções alcólicas, como por exemplo em milho e sorgo ou as glutelinas, solúveis em soluções básicas ou ácidas diluídas, como em trigo, arroz e aveia. Em leguminosas, as globulinas representam a maior parcela das proteínas de reserva e são solúveis em solução salina. Como exemplo podemos citar a faseolina do feijão, glicinina da soja e canavalina em feijão de porco. A principal função destas proteínas é a de fornecer aminoácidos ou nitrogênio para as plântulas (Pernollet e Mossé, 1983).

As proteínas de reserva normalmente se encontram depositadas em organelas celulares denominadas corpos protéicos. Em geral, esses corpos se modificam logo

O tamanho dos corpos lipídicos de várias oleaginosas é espécie-dependente e o conteúdo relativo de triacilgliceróis, fosfolipídios e proteínas está relacionado com esse tamanho. Com o aumento de diâmetro, ocorre aumento no conteúdo de triacilglicerol e uma correspondente diminuição no conteúdo de proteínas e fosfolipídios (Tzen, et al., 1993).

Os lipídios se tornam disponíveis após sua hidrólise, fornecendo material lipídico para o desenvolvimento da plântula ou, através da gluconeogênese, como fonte de carbono, após a β -oxidação de ácidos graxos, durante a germinação. É sabido que os lipídios hidrofóbicos contidos nos corpos lipídicos estão ligados à hemicamada da membrana celular voltada para seu interior e sua interação com proteínas origina compostos genericamente chamados de oleosinas (Yatsu e Jacks, apud Dyas e Goad, 1994). Entretanto, a ontogenia dos corpos lipídicos é discutível havendo divergências quanto à sua origem a partir do retículo endoplasmático (Stobart et al., 1986; Murphy e Cummins, 1989).

Embora na maioria dos corpos lipídicos de sementes o principal lipídio presente seja o triacilglicerol, pequenas quantidades de diacilgliceróis e ácidos graxos livres foram detectadas (Huang, 1992).

A fase inicial da hidrólise de lipídios é catalisada pelas lipases presentes nos corpos lipídicos, originando gliceróis e ácidos graxos. Em alguns tipos de sementes, como por exemplo milho, mamona e nabo silvestre, as lipases estariam sempre associadas com a membrana dos corpos lipídicos. Em outras sementes como soja, girassol e amendoim por exemplo, as lipases aparecem somente após ter início a germinação (Huang, 1985).

A atividade das lipases presentes nos corpos lipídicos, aumenta concomitante ao decréscimo dos lipídios de reserva durante a germinação e seria também proporcional ao conteúdo de lipídios da semente (Wang, et al., 1984). Após a hidrólise dos lipídios, as membranas remanescentes dos corpos lipídicos podem fundir-se para formar parte do vacúolo central (Huang, 1992).

Em amendoim, a membrana remanescente pode ser reutilizada após a redução lipídica, para a rápida produção de novo retículo endoplasmático (RE) no início da germinação, desde que este RE contenha polipeptídeos de baixo peso molecular, similares àqueles das membranas dos corpos lipídicos os quais coincidentemente, desaparecem neste período (Jacks, et al., 1990).

Ferreira et al. (1979), analisaram a composição do embrião e gametófito de *Araucaria angustifolia* durante a germinação e as fases iniciais do crescimento e sugeriram que a degradação das reservas se inicia ao mesmo tempo no embrião e gametófito. Como a maior degradação do amido do gametófito ocorre tardiamente, sugeriram que o embrião tem seus mecanismos próprios de suprir energia para as fases iniciais de germinação.

McFadden (1963), sugeriu que a composição química das sementes pode ser um importante fator na determinação do vigor da plântula, quando sementes do mesmo cultivar são obtidas de diferentes fontes.

Lowe e Ries (1973), estudaram o efeito de conteúdo protéico do endosperma, no crescimento de plântulas de trigo. Concluíram que endospermas ricos em proteínas produzem plântulas vigorosas, independentemente do tipo de embrião, mostrando que o fator responsável pelo maior crescimento destas, está no endosperma.

Na fase inicial do crescimento, o embrião é completamente dependente das reservas da semente, as quais são degradadas pelas enzimas hidrolíticas e translocadas dos órgãos de reserva para o embrião em crescimento. Entretanto, a simples degradação pode ser questionada, ante a possibilidade dessas reservas, como proteínas, poderem ser transportadas pelo sistema vascular existente no cotilédone para a radícula, desde o início da germinação, sem degradação enzimática, pelo menos em sua totalidade (Cortelazzo e Vidal, 1991).

Durante a germinação observam-se alterações nos corpos protéicos de células cotiledonares, que podem ser detectadas pela modificação da reatividade protéica. A

descompactação ou desagregação dessas moléculas e seu aparecimento em estruturas vasculares para o seu transporte, pode então ser visualizado pela ocorrência nestes, de material com reações positivas para proteínas (Vidal e Pimentel, 1985). A degradação da reserva protéica pode ser observada no tecido da plântula ou semente que tenha sido quimicamente fixado, incluído e seccionado (Lott, 1980). Em soja, nos primeiros dias de germinação foram detectadas "in situ" alterações morfológicas e quantitativas no conteúdo protéico de suas células cotiledonares. Durante esse período, foi encontrado material protéico no interior das células dos vasos, enquanto esse conteúdo diminuía nas demais células do cotilédone, sugerindo um transporte da reserva protéica na forma de polipeptídeos (Cortelazzo e Vidal, 1991), que teriam seu ponto isoelétrico aparente diminuído durante o processo (Cortelazzo e Vidal, 1989).

Assim sendo, a pesquisa mais detalhada das modificações estruturais cotiledonares na fase de germinação e do desenvolvimento de um sistema de condução implicado no transporte de substâncias de reserva para o eixo embrionário, poderiam elucidar em parte esta relação.

O eixo embrionário é geralmente reconhecido como sítio de síntese de hormônios. Em diversos cereais, a degradação do amido pela α -amilase no endosperma, é dependente da síntese de giberelina que ocorre no embrião (Chrispeels e Varner, 1967). Do mesmo modo, em cotilédones de sementes de ervilha, durante a germinação, a hidrólise de proteínas é controlada pelo eixo (Muntz et al., 1985). Em diversas outras espécies, a formação e a atividade de enzimas hidrolíticas dependeria da presença do eixo (Halmer, 1985). Entretanto, a influência do embrião na degradação das reservas cotiledonares e dessa forma, seu controle na sua mobilização, é ainda discutível uma vez que há muitos exemplos de plantas cuja remoção do eixo provoca pouco ou nenhum efeito na atividade enzimática (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989).

Uma outra maneira pela qual o embrião poderia regular a degradação das reservas cotiledonares seria através de sua própria atuação como fonte de consumo. Isto implica que o tecido de reserva deva ser autosuficiente, tendo a capacidade de sintetizar todas as enzimas necessárias para a sua degradação, sem a requisição de nenhum fator proveniente do eixo embrionário. O controle do embrião seria simplesmente através da incorporação dos produtos da hidrólise do tecido de reserva, mantendo as concentrações abaixo de um nível crítico. Evidências para esta hipótese foram encontradas em trabalhos de Yomo e Varner (1973) com ervilha, onde foi demonstrado que a atividade proteolítica da semente diminuiu quando as plantas receberam fornecimento de aminoácidos exógenos. Oaks (1965), observou os mesmos resultados em milho.

Portanto, o papel do embrião no controle da degradação de reservas é ainda indefinido. Provavelmente, a característica do padrão de crescimento do eixo se deve a alterações metabólicas que ocorrem durante a germinação, as quais também podem ser dependentes ou controladas pelo desenvolvimento do embrião.

A literatura mostra poucos trabalhos a respeito da fisiologia da germinação de plantas de cerrado e principalmente estudos de laboratório, uma vez que as primeiras dessas constatações na natureza, tiveram início na década de sessenta (Labouriau et al., 1963; 1964; Melhem, 1975; Felipe, 1984; Felipe, 1990). Os estudos realizados, além de determinarem as condições de germinação para as sementes de espécies de cerrado, analisaram aspectos de seu crescimento em determinada fase de desenvolvimento inicial (Felipe e Dale, 1990; Godoy e Felipe, 1992a,b; Sasaki e Felipe, 1992; Paulilo et al., 1993).

Diante da possibilidade de ampliar o conhecimento sobre aspectos germinativos e do crescimento inicial de uma espécie de cerrado, o presente estudo se fez com *Dalbergia miscolobium* Bentham (1860).

Essa espécie também denominada *D. violacea* ou *D. dolichopetala*, pertence à família das leguminosas, apresenta porte arbóreo e tem importância econômica

como madeira e planta ornamental. É popularmente conhecida como "cabiúna do cerrado" ou "jacarandá do cerrado", devido ao seu potencial madeireiro ser semelhante ao de *D. nigrans*, o "jacarandá da bahia" (Rizzini, 1971).

O seu desenvolvimento no geral é considerado do tipo lento, porém o crescimento da raiz principal é muito rápido, produzindo órgãos subterrâneos capazes de multiplicação vegetativa e denominados raízes geminíferas plagiotrópicas (Rizzini e Heringer, 1962). Seus frutos são indeiscentes, oblongos, planos, membranosos e retos, em forma de foice, com sementes reniformes, achatadas, com rostelo e em número de uma ou duas por fruto (Ferri, 1969).

A análise de frutos jovens de *D. miscolobium*, formados a partir de flores polinizadas manualmente, mostra que é uma espécie xenógama, que apresenta sistema de auto-incompatibilidade de ação tardia, ou seja, com a autopolinização, teria início a formação do embrião que no entanto, é logo abortado. Verificou-se também que o aumento do tamanho dos frutos leva à maior frequência de embriões na posição apical e que a ocorrência de abortos se dá preferencialmente com os embriões em posição basal, próximo ao pedúnculo (Sasaki e Felipe, 1995).

D. miscolobium floresce de janeiro a fevereiro, produzindo frutos maduros entre maio e junho, quando ocorre a sua dispersão pelo vento. Assim, eles são dispersos na estação seca. A fase de emergência das plântulas no entanto, depende das condições hídricas, ocorrendo ao ar livre em setembro, quando do período de chuvas, sendo que as sementes permanecem viáveis dentro dos frutos pelo menos quatro meses, até o início do período chuvoso (Sasaki e Felipe, 1995).

Apesar de sua grande ocorrência em cerrados *D. miscolobium*, foi classificada como planta não acumuladora tolerante ao alumínio, apresentando quantidades deste elemento em torno de 250mg/K em suas folhas (Haridasan, 1982).

Considerando as condições ambientais peculiares dos cerrados, a abordagem que tem sido feita nos estudos com espécies dessa formação, analisam seus aspectos adaptativos e conseqüentemente, em estágios normalmente avançados de

desenvolvimento. Portanto, há necessidade de maiores informações para ampliar o conhecimento sobre a fase inicial da germinação e crescimento de suas espécies formadoras. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos principais:

- Determinar um padrão de crescimento para o eixo embrionário em termos de massa fresca e massa seca;

- Caracterizar citoquimicamente o padrão de crescimento inicial e a composição das principais reservas do eixo embrionário e cotilédones;

- Detectar citoquímica e bioquimicamente as alterações nos conteúdos das reservas das sementes, bem como a sua mobilização;

- Estabelecer um parâmetro que permita analisar precisamente o padrão de desenvolvimento e crescimento inicial da plântula para essa espécie.

Material e Métodos:

1. Material

Foram utilizadas na primeira etapa do trabalho, sementes de *Dalbergia miscolobium* Benth (cabiuna), fornecidas por M.S.J.C.S.Silva do CPAC-Embrapa, Brasília. Numa segunda etapa, foram utilizadas sementes provenientes do Cerrado de Itirapina, SP.

Para a caracterização inicial do material, foram utilizadas sementes quiescentes intactas (tegumento, cotilédones e eixo embrionário) e para o estudo do padrão de crescimento do eixo embrionário e determinação das substâncias de reserva, foram utilizados, separadamente, cotilédones e eixos.

2. Métodos

2.1. Germinação

Os testes de germinação, para o material de Brasília, foram feitos colocando-se as sementes para germinar em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, forradas duplamente com papel de filtro embebido em 10 ml de água destilada. Essas placas permaneceram na luz fluorescente branca em câmaras de crescimento tipo "Forma Scientific", modelo 24, à temperatura de 25°C, durante o período de realização do experimento. Foram utilizadas 40 sementes por placa, com cinco repetições.

Para o material de Itirapina, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri com 15 cm de diâmetro, forradas duplamente com papel de filtro embebido com 15 ml de água destilada. Estas placas foram mantidas sob as mesmas condições descritas acima. Quando necessário, foi aplicada solução anti-fúngica, utilizando-se Micostatin (100 unidades/ml), aplicada diretamente nos papéis de filtro, em substituição à água destilada. Foram utilizadas 25 sementes por placa, com quatro repetições.

2.2. Padronização do aspecto das sementes

Foram realizados testes de germinação com sementes de diferentes aspectos, baseados na cor e na contaminação aparente do material por fungos. Assim sendo, foram definidos dois tipos de sementes: o primeiro, representado por sementes "claras" (coloração castanho-clara), sem contaminação aparente por fungos e no segundo, sementes "escuras" (castanho-escuras e pretas) e/ou aparentemente contaminadas por fungos. Essa seleção foi feita a partir da porcentagem de ocorrência dos dois tipos em 1000 sementes, separadas em 10 amostras de 100 sementes cada.

2.3. Padronização da massa da semente e do eixo embrionário

Com a finalidade de se estabelecer um padrão para o estudo da mobilização de reservas, foi determinada uma faixa de massa para as sementes a serem utilizadas. A escolha dessa faixa foi feita tomando-se ao acaso 1000 sementes de *Dalbergia*, verificando-se a distribuição normal e a frequência absoluta das classes de massa encontradas na amostragem. As sementes utilizadas foram as de massa

correspondente à da parte média da curva de distribuição. A padronização da massa do eixo embrionário foi feita pelo mesmo tipo de determinação, numa amostragem de 50 eixos de sementes de massa padronizada.

2.4. Teste de embebição

Sementes padronizadas foram colocadas para embeber em béqueres de 50 ml contendo 30 ml de água destilada. Esses recipientes permaneceram na luz fluorescente branca, a 25°C, em câmaras de crescimento, conforme descrito em 2.1. As medidas de massa foram feitas em balança de torção DLMZ com sensibilidade de 0,0001g, em intervalos de 1 hora, por um período de 6 horas. A partir deste período, as medidas foram feitas a cada 6 horas, até totalizar 48 horas de embebição.

2.5. Determinação da massa fresca e massa seca do eixo embrionário e cotilédones

Para o estudo do padrão de crescimento do eixo embrionário do material de Brasília, sementes padronizadas foram colocadas para embeber por períodos de tempo que variaram de zero hora a 21 dias. As determinações foram feitas a cada 60 minutos para as primeiras 6 horas de embebição; a cada 6 horas, para o intervalo entre 0 e 3 dias de embebição e finalmente, a cada 72 horas, para o intervalo de 0 a 21 dias. As sementes foram colocadas para embeber em placas de Petri com 5 cm de diâmetro, forradas duplamente com papel de filtro embebido em 5ml de água destilada. Essas placas permaneceram em luz fluorescente branca ou no escuro, em câmaras de crescimento à temperatura de 25°C. Nos experimentos realizados no

escuro, as placas foram recobertas com 3 sacos plásticos pretos. Foram utilizadas 5 sementes por placa, com cinco repetições.

Com o material proveniente de Itirapina, a metodologia para a embebição foi a descrita no item 2.1. e as determinações de massa realizadas por períodos de tempo que variaram de zero hora até 12 dias. As determinações foram feitas em intervalos de 24 horas.

As determinações de massa fresca dos eixos embrionários e dos cotilédones, foram feitas em balança de torção DLM2, com sensibilidade de 0,0001g. A massa seca foi obtida utilizando-se o mesmo tipo de balança após secagem do material por 48 horas, em estufa a 80°C. Foram feitas três repetições com 5 amostras cada, para cada intervalo de tempo.

2.6. Caracterização citoquímica das sementes

Para o estudo citoquímico do material proveniente de Brasília, foram utilizados cotilédones e eixos embrionários de sementes padronizadas quiescentes e com 24, 48 e 72 horas de embebição, nas condições já anteriormente especificadas.

As sementes provenientes de Itirapina foram caracterizadas citoquimicamente a partir da coleta de amostras diárias num período de zero a 12 dias a partir do início da embebição. Esta caracterização também foi feita em materiais selecionados com base no crescimento do eixo embrionário, por ocasião da protrusão da radícula e com 5, 10, 20, 30 e 50 mm de comprimento do eixo hipocótilo-radicular.

2.6.1. Fixação

Os cotilédones e eixos foram submetidos a três tipos de fixação, conforme o método de coloração a ser posteriormente realizado.

Para as colorações com Hematoxilina e Eosina, Azul de Toluidina e Xylidine ponceau, os materiais foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5%, em tampão fosfato 0,1M a pH 7,4, durante 48 horas, a 5°C (Kierman, 1981).

Para o método do PAS (ácido periódico, seguido do Reativo de Schiff), os materiais foram fixados em etanol a 100% durante 24 horas, a 5°C (Lison, 1963).

Para a caracterização de lipídios, os materiais foram fixados em solução aquosa de formaldeído a 10% durante 24 horas a 5°C e lavados em água corrente por 24 horas (Maia, 1979).

2.6.2. Inclusão e microtomia

Após a fixação em paraformaldeído tamponado, os materiais foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (de 70% até 100%). A seguir, esses materiais e aqueles fixados em etanol a 100%, foram diafanizados em xilol durante 30 minutos e posteriormente deixados em óleo de cedro, por 15 dias, para término da diafanização (Policard et al., 1957). Os materiais assim processados foram incluídos em parafina, seccionados em micrótomos R. Jung-Heidelberg, em cortes com 8 μ m de espessura, seguindo-se desparafinização em xilol e reidratação em concentrações decrescentes de etanol (Lison, 1963).

Os materiais fixados em formol a 10% foram seccionados em cortes com 24 μ m de espessura, em micrótomos de congelação. Os cortes assim obtidos foram coletados diretamente em lâminas e deixados secar ao ar.

2.6.3. Colorações

2.6.3.1. Hematoxilina - eosina (HE)

Para uma visualização geral, os cortes foram corados em solução de Hematoxilina por 6 minutos, lavados em água destilada durante 12 minutos, imersos em solução de eosina 0,5% em etanol 95% durante 10 minutos e lavados com 2 banhos de etanol absoluto. A secagem foi feita ao ar e a montagem das lâminas em bálsamo do Canadá, com índice de refração $n_D = 1,54$) (Maia, 1979).

2.6.3.2. Xylidine ponceau (XP)

A detecção de radicais catiônicos totais "in situ" foi feita através da coloração dos cortes pelo Xylidine ponceau a 0,1% em ácido acético a 3%, pH 2,5, durante 15 minutos. Em seguida foi feito um banho em ácido acético a 2% por 30 minutos e uma rápida desidratação em etanol 95% e 100%. A diafanização foi feita em xilol e a montagem das lâminas em bálsamo do Canadá (Cortelazzo, 1992).

2.6.3.3. Azul de Toluidina (AT)

Para a visualização dos radicais aniônicos totais "in situ" foi utilizado Azul de Toluidina 0,025% em tampão McIlvaine (ácido cítrico e fosfato dibásico de sódio) a pH 4,0. Os materiais foram corados durante 15 minutos, rapidamente lavados em água destilada, secados ao ar e montados em bálsamo do Canadá (Vidal, 1977).

2.6.3.4. Sudan black

Para a detecção de grupamentos hidrofóbicos, os materiais fixados em solução aquosa de formaldeído a 10% foram corados com Sudan Black, a 0,7%, em etanol 70%, durante 20 minutos e lavados várias vezes em etanol 70% até a remoção do excesso do corante. A montagem das lâminas foi feita com água destilada (Maia, 1979).

2.6.3.5. Método do PAS

Como forma de evidenciar os polissacarídeos neutros, parte do material fixado em etanol absoluto foi submetido ao método do PAS, a partir da oxidação em ácido periódico a 0,5% durante 10 minutos. A seguir os cortes foram lavados em água destilada, secos ao ar e colocados em reativo de Schiff (Lillie, 1954) durante 8 minutos no escuro. Após a coloração foram submetidos a 3 banhos consecutivos de 3 minutos cada em água sulfurosa (18 partes de água destilada, 1 parte de HCl 1N e 1 parte de metabissulfito de sódio 10%), seguidos de uma rápida desidratação em etanol 95 e 100% e montagem em bálsamo do Canadá (Cortelazzo, 1992).

2.6.4. Análise das preparações

Os materiais processados e corados conforme descrito anteriormente, foram observados em microscópio fotônico Zeiss ou em microscópio Polzeiss com o analisador e polarizador cruzados. Após a análise, os materiais selecionados foram fotografados.

2.7. Determinação das substâncias de reserva das sementes provenientes de Brasília

Para esse estudo foi utilizado o método de extração fracionada visando inicialmente a obtenção de duas frações: uma contendo os lipídios e a outra, proteínas e carboidratos, a partir das solubilizações desses compostos em solventes orgânicos. Foram realizadas análises a partir do material extraído a fresco ou seco.

2.7.1. Extração de lipídios totais

A partir do material fresco, foi utilizado o método descrito por Leung et al. (1981), no qual as amostras de cotilédones e eixos embrionários intactos (aproximadamente 50 mg) de sementes quiescentes foram colocados inicialmente em isopropanol a frio para inibição de lipases. Essas amostras permaneceram nesta solução por cerca de uma hora, após o que, foram submetidas a várias extrações de 24 horas em solução de clorofórmio-metanol 2:1 (v/v), à temperatura ambiente (Folch et al., 1957). Foram feitas 6 extrações para os cotilédones e 3 para os eixos até a remoção total dos lipídios. A determinação do conteúdo de lipídios foi feita através de método gravimétrico após filtração e evaporação da solução a baixa pressão, em evaporador rotatório, a 37°C.

Com o material seco, foram utilizados os mesmos processos de extração e determinação com exceção do isopropanol que não foi empregado. As amostras foram obtidas após secagem do material (eixos embrionários e cotilédones), em estufa a 80°C, por 24 horas e sua respectiva homogeneização em pó, através de moinho de malha (cotilédones) ou maceração em almofariz (eixos embrionários). As amostras foram definidas em 100 mg para cotilédones e 50 mg para eixos embrionários. Foram feitas 3 repetições para cada material.

2.7.2. Extração de carboidratos solúveis

Após a remoção dos lipídios, as amostras foram submetidas a extração em etanol 80% a 80°C, por 10 minutos, sendo o sobrenadante obtido após centrifugação a 2.500 x g. Foram realizadas pelo menos, 4 extrações para cotilédones e eixos. Os extratos contendo carboidratos livres solúveis em etanol, foram submetidos à análise de açúcares totais pelo método do fenol-sulfúrico, segundo Dubois et al. (1956) e açúcares redutores, segundo Somogyi (1945), utilizando-se glicose como padrão.

Esse procedimento foi aplicado tanto para o material fresco como para o seco, com 3 repetições para cada material.

2.8. Determinação das substâncias de reserva das sementes provenientes de Itirapina

Para as extrações e dosagens de lipídios, ácidos graxos, amido, açúcares livres e proteínas, foram utilizados cotilédones de sementes nos estádios de crescimento estabelecidos pelas caracterizações citoquímicas.

2.8.1. Extração e determinação de lipídios totais:

Para as determinações do conteúdo de lipídios totais foram utilizados materiais frescos de eixos embrionários e cotilédones nos diferentes estádios de crescimento estabelecidos. As amostras foram coletadas em triplicata sendo que a massa fresca foi em torno de 0,2 g para eixos e 1,0 g para cotilédones por amostra.

Foi utilizado o método descrito por Leung et al. (1981), conforme descrito no item 2.7.1 de material e métodos. A determinação do conteúdo de lipídios foi feita através de método gravimétrico após filtração e evaporação da solução em

evaporador rotatório a 37°C . Os resultados foram expressos em mg de lipídio por grama de matéria fresca ou seca dos materiais. Para cada amostra foram feitas 3 repetições.

Quando necessário, o material foi estocado em isopropanol e mantido a -20 C.

2.8.2. Conteúdo de ácidos graxos

Foram utilizados 0,2 g de eixos embrionários e 1,0 g para cotilédones por amostra. A extração dos lipídios foi feita segundo o método de Bligh & Dyer (1959).

O óleo foi saponificado e esterificado para a obtenção dos metil-ésteres, segundo Hartman & Lago (1973). A separação dos ésteres metílicos foi feita a partir da injeção de 1 µl dos ácidos graxos metilados em cromatógrafo a gás CG-37 acoplado a um integrador processador CG mod.200, com coluna de metal com 2.500 mm X 3,17 mm, contendo como fase estacionária FFAP (poli-etilenoglicol ácido nitrotereftálico) a 10% e como suporte, chromosorb W-silica. A temperatura de análise variou de 200 a 230°C a uma velocidade programada de 2°C/min, permanecendo por mais 45 min a 230°C. A velocidade do papel foi de 1 mm/min; dos gases N₂ e H₂ foi de 0,5 ml/s e do ar sintético, 3,3 ml/s.

Os ácidos graxos foram identificados comparando-se os cromatogramas obtidos com padrões existentes, baseados nos tempos de retenção de vários ácidos graxos conhecidos (Sigma).

2.8.2. Extração e dosagem de proteínas

Para a extração de proteínas, as amostras foram submetidas a 5 lavagens com MCA (metanol, clorofórmio, água, 12:5:3 v/v/v), seguidas de centrifugações a 3.000 x g durante 15 min. Os precipitados obtidos foram deixados em 10 ml de NaOH 0,1 M por 24 horas a 5°C. A seguir, foi feita centrifugação durante 15 minutos a 3.000 x g. Os

precipitados foram resolubilizados e centrifugados mais duas vezes. Aos sobrenadantes foi adicionado ácido perclórico (PCA) de forma a ser obtida uma concentração final de 5% de PCA. Essas soluções foram colocadas em banho-maria a 90°C durante 15 minutos e novamente centrifugadas durante 15 minutos a 3.000 x g. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados solubilizados em 5 ml de NaOH 0,1 N.

As dosagens de proteínas foram feitas pelo método do Coomassie Blue (Bradford, 1976). O reativo de Bradford foi preparado a partir da dissolução de 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-B-1131) em 50 ml de etanol a 95%. A esta solução foram acrescentados 100 ml de ácido ortofosfórico a 85% completando-se o volume para um litro com água destilada, seguindo-se filtração. Aliquotas de 0,1 ml foram retiradas dos extratos e a elas foram adicionados 1 ml do reagente, sendo feitas 3 repetições para cada amostra. A curva padrão foi feita a partir de soroalbumina bovina (BSA) nas concentrações 5, 10, 20, 30 e 40 µg/ml. As diluições necessárias foram feitas com NaOH 0,1 N e as leituras realizadas em absorvância de 595 nm.

2.8.3. Eletroforese

A extração de proteínas para a eletroforese foi feita com 1 ml de tampão redutor Tris HCl 62 mM, pH 6,8, 2-Mercaptoetanol 0,2%, Azul de Bromofenol 0,01%, SDS 2,7% e EDTA $5 \cdot 10^{-4}$ M, ou com 1ml de tampão não redutor (sem 2-Mercaptoetanol), seguido de incubação a 37°C, durante 16 horas. Após esse período as amostras foram fervidas durante 10 minutos e centrifugadas a 13.000 x g por 10 minutos. Foram utilizadas amostras com 10,0 mg de material cotiledonar seco, nos estádios estabelecidos. Foram aplicados 30µl por amostra em cada poço.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (10,0%) com SDS foi feita segundo Zingales (1984). O tampão utilizado na eletroforese foi Tris 25 mM, glicina 190 mM e

SDS 0,1%. Para cada placa foram aplicados 25 mA durante 3 horas. Padrões de peso molecular (Pharmacia Fine Chemicals-Uppasala, Sweden), foram sempre analisados em paralelo e continham β fosforilase (94.000), soroalbumina bovina (67.000), sub-unidade da catalase (60.000), ovoalbumina (43.000), sub-unidade da lactato desidrogenase (36.000) e anidrase carbônica (30.000). A coloração foi feita pelo Coomassie Blue R 250 a 0,2% em ácido acético 10% e metanol 50% durante uma hora e meia, e descoloração em metanol 50% e ácido acético 10%.

2.8.4. Extração e dosagem de amido e açúcares solúveis

Para a extração de amido e açúcares solúveis, as amostras foram colocadas em 10 ml de uma mistura de metanol clorofórmio e água (MCA) na proporção de 12:5:3 v/v/v segundo adaptação de Shannon (1968). Após homogeneização, procedeu-se à centrifugação durante 10 minutos a 3000 rpm. Foram feitas 3 extrações e após as centrifugações, para cada quatro volumes dos sobrenadantes, foi acrescentado um volume de metanol e um volume e meio de água destilada. As soluções foram colocadas em funil de decantação, agitadas e deixadas em repouso durante 24 horas à temperatura ambiente. Após esse período, as fases inferiores foram descartadas e as fases superiores recolhidas e reservadas para a dosagem de açúcares livres.

O precipitado das extrações com MCA foi ressuspenso com ácido perclórico a 30% (PCA), segundo método de McCready et al.(1950). Foram feitas 3 extrações com 5 ml de PCA.

As dosagens de amido e açúcares livres foram realizadas utilizando-se o reagente de antrona, obtido a partir da mistura de 200 mg de antrona (Sigma) em 100 ml de ácido sulfúrico a 95% (McCready et al.1950). Alíquotas de 1,0 ml de cada extrato foram acrescentadas de 2 ml do reagente de antrona. Após agitação, os tubos foram aquecidos e mantidos durante 5 minutos em água fervente (Scott & Melvin, 1953). Para as

diluições necessárias utilizou-se água destilada. As leituras das absorvâncias foram feitas a 620 nm. Foram feitas 3 repetições por amostra.

Os cálculos para as dosagens foram feitos utilizando-se curva padrão obtida a partir de soluções aquosas com 10, 30, 50 e 70 μg de glicose por mililitro. Para o amido, os valores foram multiplicados pelo fator 0,9, segundo McCready et al. (1950).

2.9. Análise estatística

Em todos os resultados foram realizadas análises estatísticas pelo teste F, sendo calculada a diferença mínima significativa (DMS) a 5% pela tabela Tukey, quando F foi significativo (Snedecor, 1962). Por isso todas as diferenças citadas são estatisticamente significativas. Os dados de porcentagem de germinação, foram transformados em valor angular, que corresponde ao arco seno da raiz quadrada da porcentagem. As leituras obtidas das extrações feitas foram relacionadas com as leituras dos seus respectivos padrões pelo cálculo de correlação e regressão. Nesses resultados considerou-se a massa fresca ou seca inicial das amostras e as diluições ocorridas durante o processo de extração. Os dados foram expressos em mg por massa e porcentagem por massa. Os tempos de embebição foram definidos como tratamento.

Resultados

1. Germinação de sementes não padronizadas

O objetivo desse experimento foi o de testar a germinação de sementes não padronizadas, evitando-se porém, aquelas que apresentavam contaminação aparente por fungos. Pela figura 1 pode ser observado que algumas das sementes de *D. miscolobium* provenientes de Brasília, germinaram após 24h de embebição. A partir do 4º dia, mais de 50% das sementes já haviam germinado e ao redor do 7º dia de embebição, a germinação atingiu o seu máximo. Em termos gerais, houve uma alta porcentagem final de germinação que atingiu mais de 90% já a partir do 6º dia (Figura 1).

2. Germinação de sementes padronizadas quanto a cor

Esse experimento teve como objetivo verificar a relação entre a cor das sementes não padronizadas e seu poder de germinação. Além disto, observou-se a frequência de ocorrência e a contaminação aparente por fungos dos tipos de sementes. Entre as 1.000 sementes (não padronizadas), a maior parte (cerca de 89%), foi de sementes claras e o restante de sementes escuras (cerca de 11%). Entre as sementes claras, 25,6% estavam aparentemente contaminadas.

Nos testes de germinação, a porcentagem de germinação das sementes claras foi maior do que a de sementes escuras (Figura 2).

Figura 1 - Porcentagem média cumulativa da germinação (valor angular) de sementes não padronizadas de *Dalbergia miscolobium*, procedentes de Brasília - DF, na luz, a 25° C. Cada ponto representa a média de 5 repetições. As comparações das médias foram feitas através do cálculo da DMS 5% (Tukey).

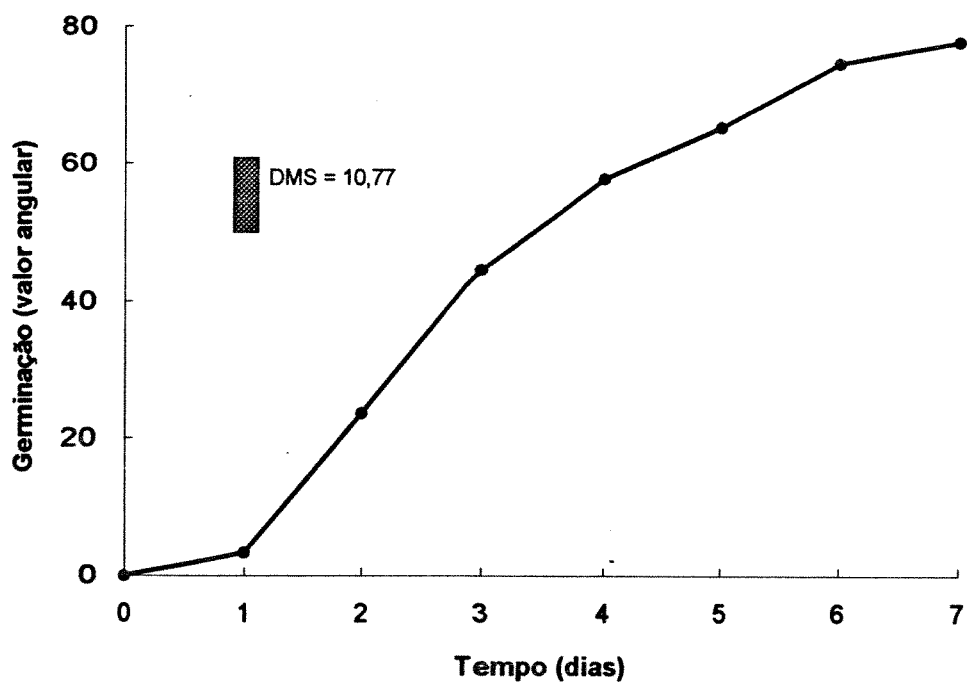
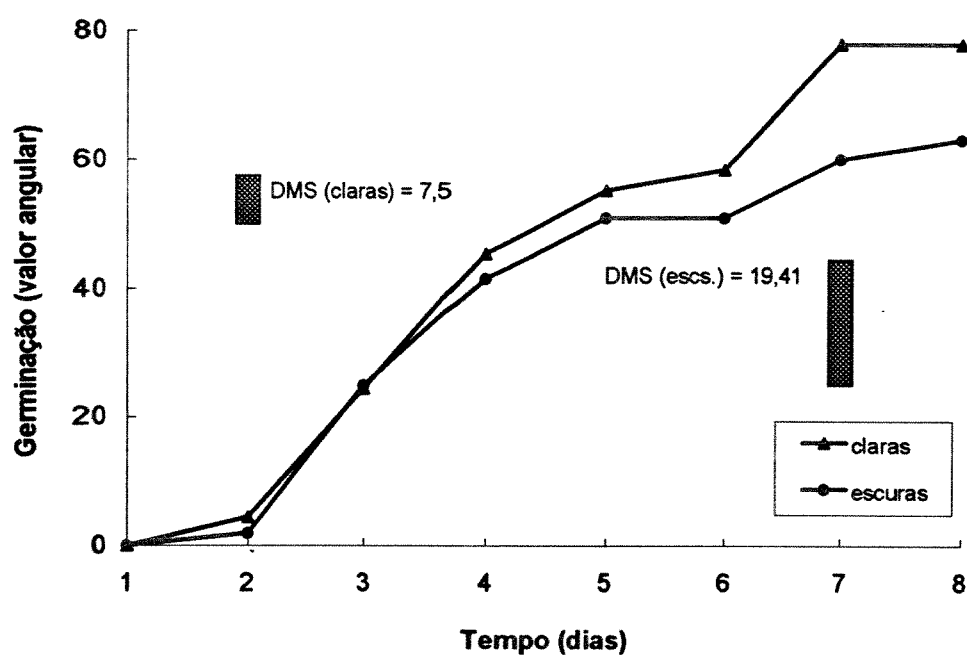


Figura 2 - Porcentagem média cumulativa da germinação (valor angular) de sementes de *Dalbergia miscolobium*, selecionadas segundo critério de cor, na luz, a 25° C. Cada ponto representa a média de 5 repetições. As comparações das médias foram feitas através do cálculo da DMS 5% (Tukey).



3. Padronização da massa das sementes e dos eixos embrionários

Os resultados da padronização da massa das sementes claras provenientes de Brasília, revelou que o maior número de indivíduos pertence às classes de 60 até 105 mg, que apresentaram 845 exemplares em 1.000 (Figura 3). Para os eixos embrionários, verificou-se que as suas massas se situam entre 2 até 3,5 mg para a maior parte dos 50 indivíduos analisados dentre as sementes selecionadas com massa padronizada (Figura 4).

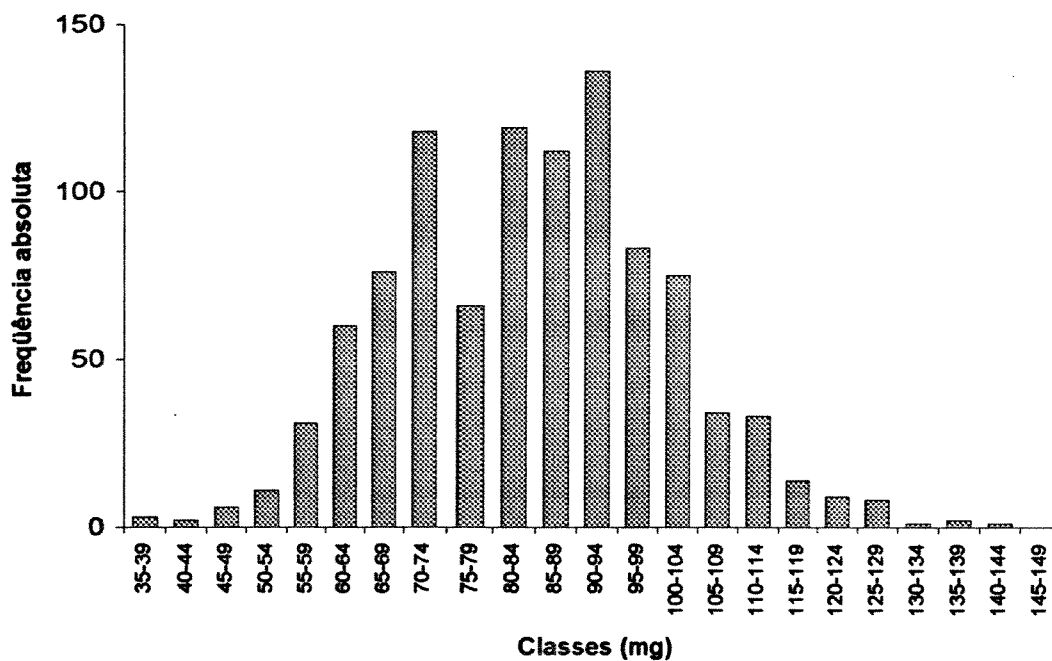
Para as sementes provenientes de Itirapina, verificou-se que o maior número de sementes pertence às classes de 90 até 145 mg, que apresentaram 726 exemplares em 1.000 (Figura 5). Para os eixos embrionários verificou-se que a maior parte dos indivíduos apresentou a mesma faixa de massa daquela obtida para as sementes provenientes de Brasília, ou seja, de 2,0 até 3,5 mg nas sementes de massa padronizada (Figura 6).

4. Germinação de sementes padronizadas quanto a massa

As sementes padronizadas de Brasília, começaram a germinar com 2 dias de embebição. Após esse período, houve um rápido aumento na porcentagem de germinação e após o 5º dia de embebição, mais de 90% das sementes haviam germinado. O máximo de germinação foi de 99%, atingido a partir do 6º dia de embebição (Figura 7).

No caso das sementes de Itirapina, verificou-se um padrão mais lento de germinação, quando comparado àquele apresentado pelas sementes de Brasília. As primeiras sementes começaram a germinar no 4º dia de embebição atingindo a marca dos 50% no 6º dia e uma germinação maior do que 90% após o 10º dia. Os

Figura 3 - Distribuição e frequência absoluta das classes de massa fresca das sementes de *Dalbergia miscolobium* procedentes de Brasília - DF. Amostragem em 1000 sementes.

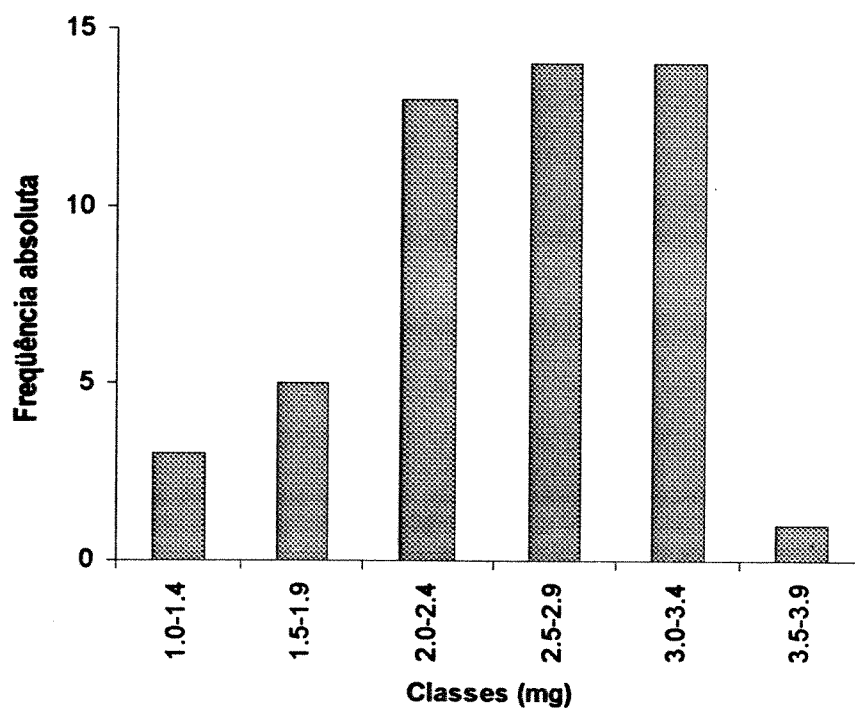


Massa média = 84,47 mg

cv = 19,5 %

ep = 0,52

Figura 4 - Distribuição e frequência absoluta das classes de massa fresca de eixo embrionário de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, procedentes de Brasília - DF. Amostragem em 50 sementes.

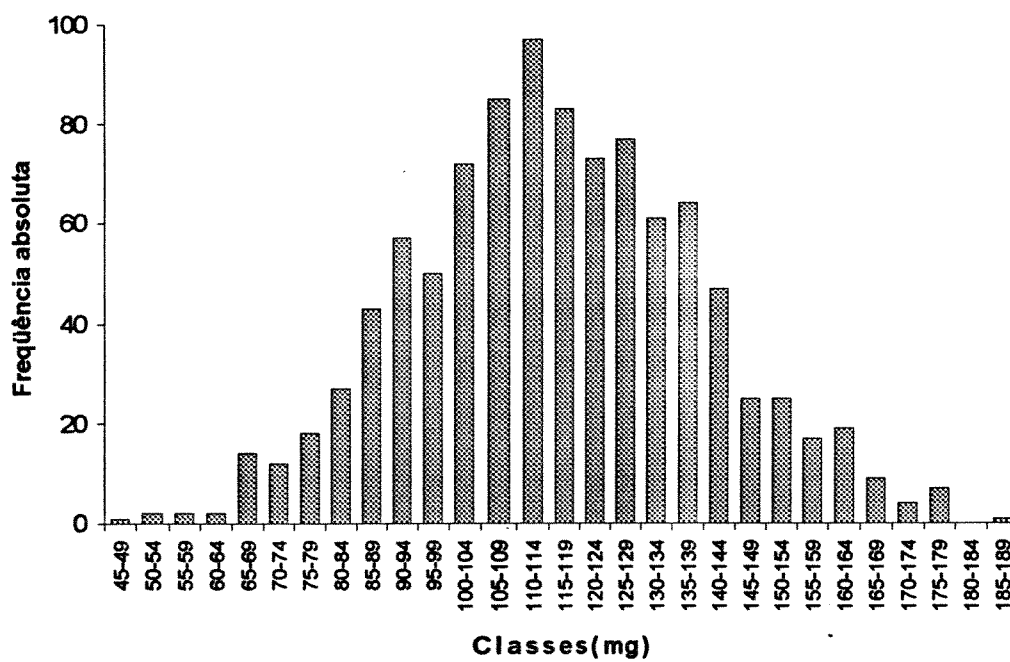


Massa média = 2,56 mg

cv = 23,6 %

ep = 0,09

Figura 5 - Distribuição e frequência absoluta das classes de massa fresca das sementes de *Dalbergia miscolobium*, procedentes de Itirapina - SP. Amostragem em 1000 sementes.

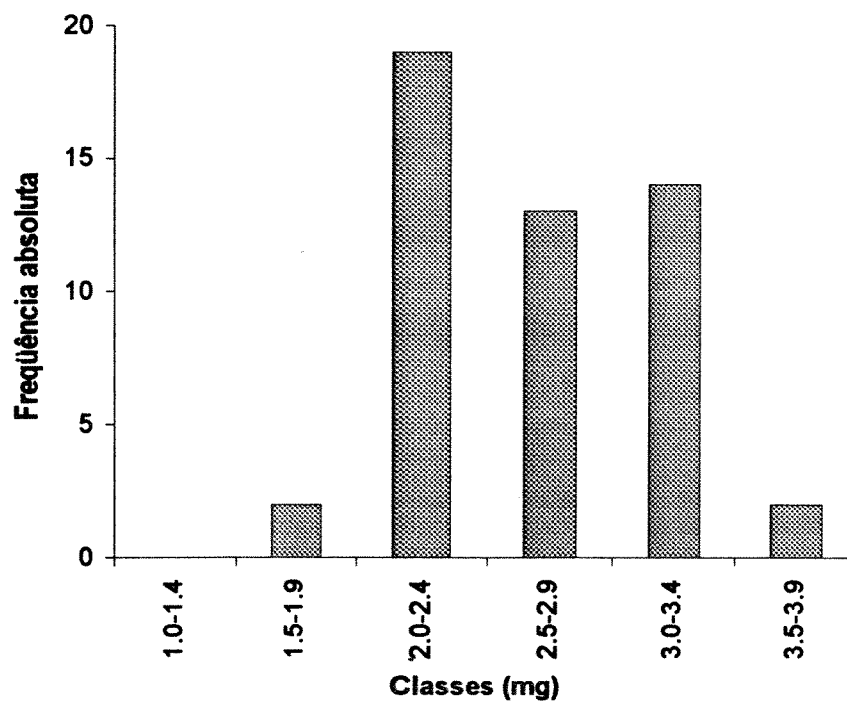


Massa média = 116,4 mg

cv = 19,9 %

ep = 0,73

Figura 6 - Distribuição e frequência absoluta das classes de massa fresca de eixos embrionários de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, procedentes de Itirapina - SP. Amostragem em 50 sementes.

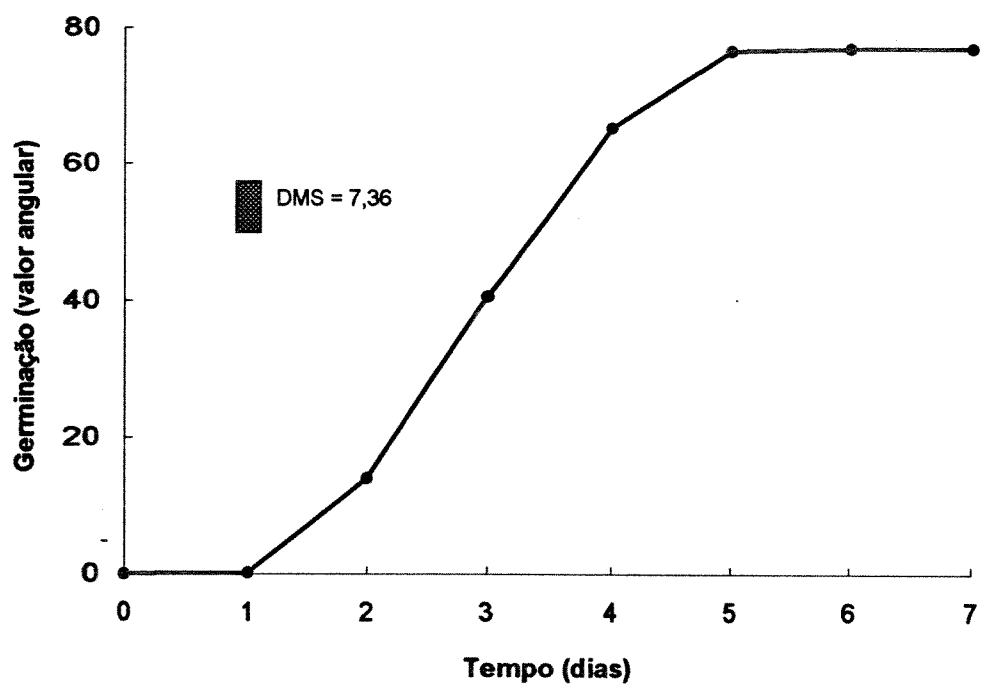


Massa média = 2,65 mg

cv = 18,09 %

ep = 0,07

Figura 7 - Porcentagem média cumulativa da germinação (valor angular) de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, procedentes de Brasília - DF, na luz, a 25° C. Cada ponto representa a média de 5 repetições. As comparações das médias foram feitas através do cálculo da DMS 5% (Tukey).



maiores valores foram obtidos com 12 dias do início da embebição (Figura 8).

5. Embebição de sementes padronizadas

Os resultados da curva de embebição das sementes de Brasília encontram-se na Figura 9. Pode ser observado que após 5 horas de embebição, as sementes apresentaram, em média, massas duas vezes e meia maiores do que sua massa fresca inicial. Esses valores se mantiveram constantes (sem diferenças significativas) até o final do experimento, após 48h de embebição.

Sementes provenientes de Itirapina também atingem valores de massa fresca bastante superiores aos iniciais (cerca de 3 vezes) após 5 horas de embebição. Depois desse tempo, não foram encontradas diferenças significativas entre as massas das sementes (Figura 10).

Pode ser observado um maior acúmulo de água nas sementes de Itirapina quando comparadas àquelas de Brasília: enquanto as primeiras triplicam sua massa fresca inicial devido à entrada de água, as segundas têm um aumento um pouco menor, com incremento da ordem de 2,5 vezes (Figuras 9 e 10).

6. Determinação da massa fresca e massa seca do eixo embrionário e cotilédones

As determinações das massas frescas e secas de eixos embrionários e cotilédones, referem-se às sementes provenientes de Brasília, nos itens 6.1 a 6.3 e àquelas provenientes de Itirapina, no itens 6.4 e 6.5.

Figura 8 - Porcentagem média cumulativa da germinação (valor angular) de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, procedentes de Itirapina - SP, na luz, a 25° C. Cada ponto representa a média de 3 repetições. As comparações das médias foram feitas através do cálculo da DMS 5% (Tukey).

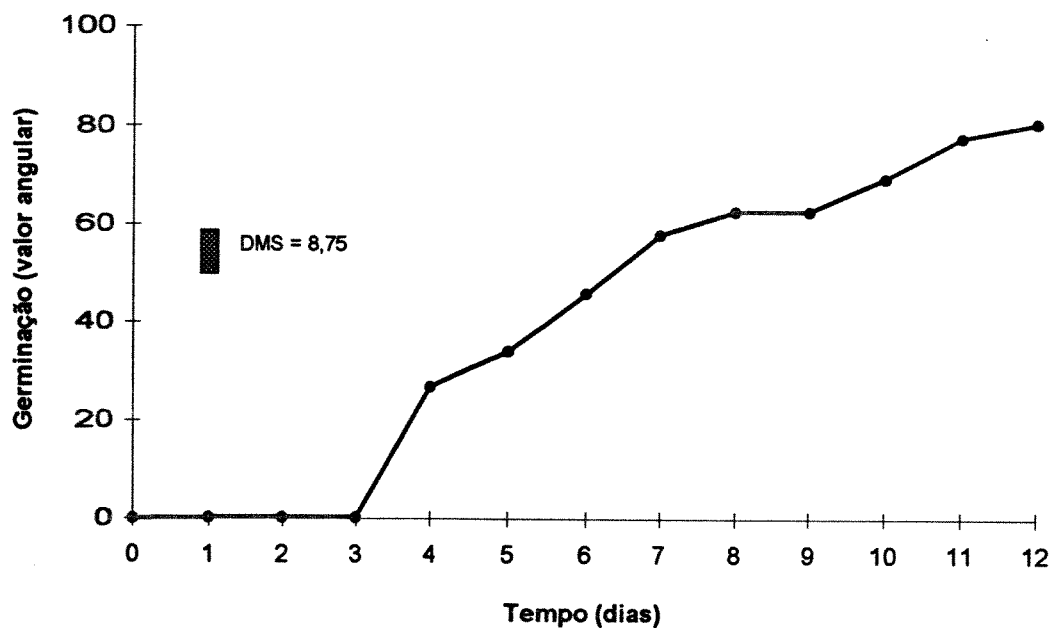
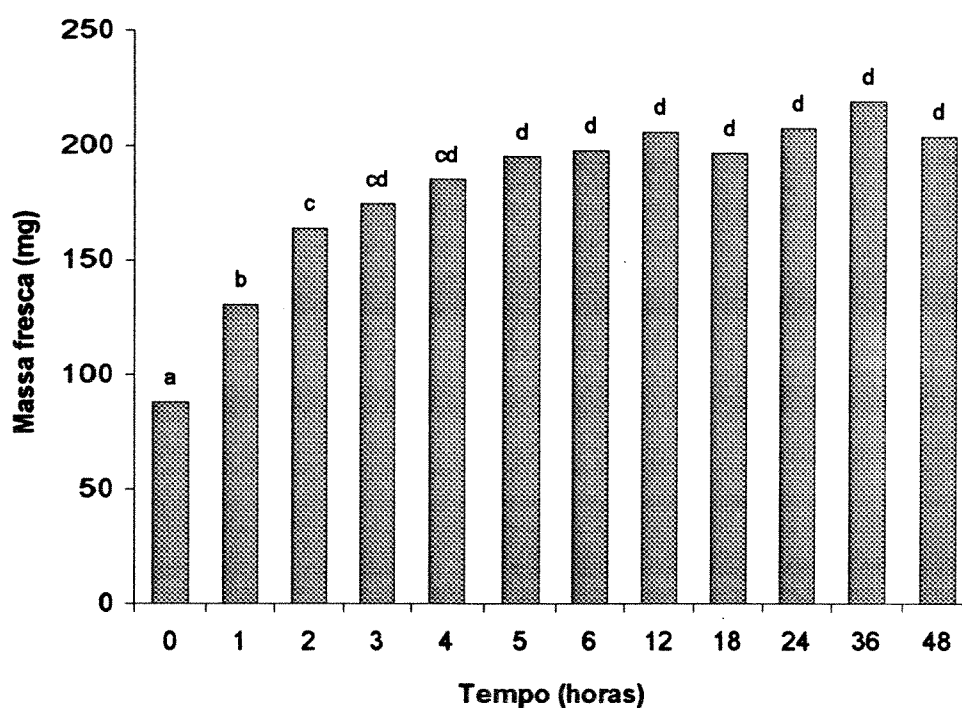


Figura 9 - Embebição de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, procedentes de Brasília - DF, na luz, a 25° C.

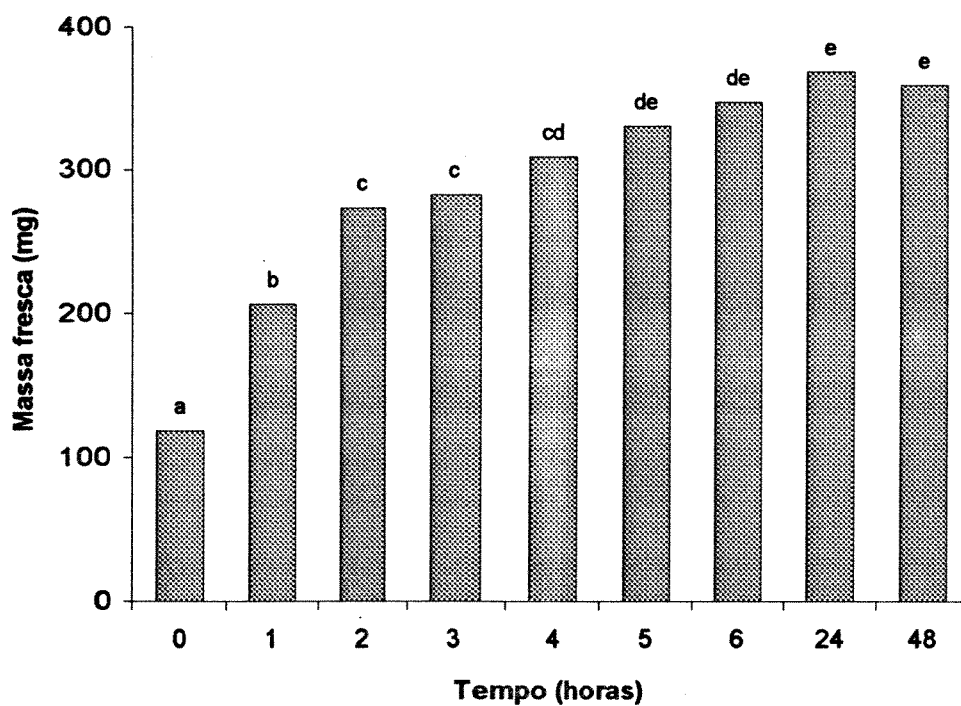


DMS = 26,48

cv = 6,7 %

Valores acompanhados da mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas em nível de $P = 0,05$ (Tukey).

Figura 10 - Embebição de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, procedentes de Itirapina - SP, na luz, a 25° C.



DMS = 43,56

cv = 7,2 %

Valores acompanhados da mesma letra nas colunas não apresentam diferenças significativas em nível de $P = 0,05$ (Tukey).

6.1. No período de 0 até 6 horas de embebição

Não foram observadas diferenças significativas nos valores de massa seca para eixos embrionários durante esse período. Em termos de matéria fresca, apenas entre 0 e 1 hora houve um incremento significativo, sendo que a seguir, apesar de ser notada uma tendência ao aumento, não foram observadas diferenças significativas até a 6ª hora de embebição (Tabela 1).

Para os cotilédones, também não foram observadas diferenças significativas na massa seca durante esse período. Entretanto, quanto a massa fresca foi verificado um aumento significativo crescente até 3-4 horas de embebição após o que houve uma estabilização (Tabela 1).

6.2. No período de 0 horas até 72 horas de embebição

Quando se mediu a massa fresca dos eixos embrionários a cada 6 horas, entre 0 e 72 horas, observou-se que ocorrem diferenças devidas à embebição logo no início do experimento, entre 0 e 6 horas, como demonstrado no item anterior. Após esse tempo, uma nova diferença significativa entre os valores obtidos ocorreu entre 48 e 54h e entre 66 e 72h de embebição. Em relação à massa seca, apenas após 48 horas foi notada alguma diferença significativa (Tabela 2). Nos cotilédones, a massa fresca, nos diferentes tempos de embebição, também apresentou diferenças significativas entre 0 e 6h e após 36-48h de embebição. Com relação à massa seca dos cotilédones, não foi encontrada nenhuma diferença significativa no período analisado (Tabela 2).

Tabela 1 - Determinação da massa fresca e massa seca de eixo embrionário e cotilédones sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, durante embebição na luz, a 25° C, até 6 horas. Sementes procedentes de Brasília - DF. Os dados representam a média de 25 repetições. N. S. corresponde a resultados estatisticamente não significativos.

Tempo (horas)	Massa fresca (mg)		Massa seca (mg)	
	Eixo	Cotilédones	Eixo	Cotilédones
0	2,50 A	83,46 A	2,31 a	79,84 a
1	4,63 B	126,09 B	2,52 a	78,03 a
2	4,82 B	159,00 C	2,43 a	79,83 a
3	5,20 B	169,30 CD	2,35 a	76,74 a
4	5,43 B	179,61 CD	2,46 a	78,93 a
5	5,47 B	189,46 D	2,29 a	80,64 a
6	4,89 B	184,12 D	2,27 a	74,97 a
cv (%)	13,10	7,50	13,50	6,10
DMS	1,24	23,35	N.S.	N.S.

Valores acompanhados da mesma letra não apresentam diferenças significativas em nível de $P = 0,05$ (Tukey).

Tabela 2 - Determinação da massa fresca e massa seca de eixo embrionário e cotilédones de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, durante embebição na luz, a 25° C, de 0 até 72 horas. Sementes procedentes de Brasília - DF. Os dados representam a média de 25 repetições. N. S. corresponde a resultados estatisticamente não significativos.

Tempo (horas)	Massa fresca (mg)		Massa seca (mg)	
	Eixo	Cotilédones	Eixo	Cotilédones
0	2,56 A	82,27 A	2,36 abc	77,09 a
6	4,52 AB	184,82 B	2,40 abc	76,25 a
12	4,47 AB	199,93 BCD	2,82 ab	72,26 a
18	4,74 AB	197,27 BC	2,37 abc	74,54 a
24	4,73 AB	200,72 BCD	2,41 abc	74,64 a
30	4,87 AB	207,18 CDEF	2,29 ab	73,18 a
36	5,49 B	204,71 BCDE	2,25 a	70,28 a
42	6,63 B	229,56 F	2,38 abc	77,46 a
48	6,78 B	205,85 BCDEF	2,27 ab	75,22 a
54	11,69 C	226,94 EF	3,16 d	75,07 a
60	11,42 C	220,15 CDEF	2,80 bcd	73,50 a
66	12,02 C	221,93 DEF	2,83 cd	71,82 a
72	15,06 D	222,08 DEF	3,06 d	74,35 a
cv (%)	17,40	5,40	9,70	4,90
DMS	2,79	23,76	0,54	N.S.

Valores acompanhados da mesma letra não apresentam diferenças significativas em nível de $P = 0,05$ (Tukey).

6.3. No período de 3 dias até 21 dias de embebição

Nos experimentos realizados sob luz constante, a massa fresca de eixos embrionários, aumentou entre o 3º e o 6º dias de embebição. Após esse tempo, houve nova diferença significativa após o 9º dia e após o 15º dia de embebição. No intervalo estudado, houve um incremento de cerca de 12 vezes na matéria fresca dos eixos embrionários (Tabela 3). Para a massa seca, houve aumento significativo após o 6º, 9º e 15º dias de embebição (Tabela 3).

Nos cotilédones, a massa fresca aumentou a partir do 6º dia de tratamento, sendo que após esse período, não foram encontradas diferenças significativas até o 21º dia de embebição (Tabela 3). Com relação à matéria seca dessa estrutura, somente após o 15º dia ocorreu uma diminuição significativa (Tabela 3).

A partir do 6º dia de embebição na luz os cotilédones e a parte aérea dos eixos embrionários em estágios mais adiantados de crescimento, tornaram-se verdes.

No experimento feito no escuro, verificou-se que a massa fresca e a massa seca do eixo e dos cotilédones apresentaram diferenças significativas. A massa fresca do eixo apresentou aumentos significativos após 6, 9 e 15 dias de embebição, o mesmo ocorrendo para a massa seca (Tabela 4). Para os cotilédones, em relação à massa fresca as diferenças foram significativas depois de 6 e 15 dias de embebição. Quanto à massa seca, observou-se uma diminuição significativa a partir do 12º dia (Tabela 4).

6.4. No período de 0 até 6 dias de embebição

Em relação à massa fresca dos eixos embrionários das sementes de Itirapina nesse período, foram obtidos valores diferentes estatisticamente a partir de 24h de

Tabela 3 - Determinação da massa fresca e massa seca de eixo embrionário e cotilédones de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, durante embebição na luz, a 25° C, num período de 3 a 21 dias.. Sementes procedentes de Brasília - DF. Os dados representam a média de 25 repetições.

Tempo (dias)	Massa fresca (mg)		Massa seca (mg)	
	Eixo	Cotilédones	Eixo	Cotilédones
3	6,19 A	215,69 A	2,55 a	76,00 a
6	18,04 B	229,36 AB	3,37 a	73,60 a
9	24,98 B	273,04 B	4,34 b	72,12 a
12	43,70 C	300,95 B	6,96 c	67,81 a
15	39,52 C	292,17 B	6,31 c	66,96 a
21	74,22 D	293,38 B	12,19 d	54,93 b
cv (%)	35,90	9,20	14,70	6,90
DMS	11,71	48,06	1,71	9,25

Valores acompanhados da mesma letra não apresentam diferenças significativas em nível de P = 0,05 (Tukey).

Tabela 4 - Determinação da massa fresca e massa seca de eixo embrionário e cotilédones de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, durante embebição no escuro, a 25° C, num período de 3 a 21 dias.. Sementes procedentes de Brasília - DF. Os dados representam a média de 25 repetições.

Tempo (dias)	Massa fresca (mg)		Massa seca (mg)	
	Eixo	Cotilédones	Eixo	Cotilédones
3	6,08 A	227,66 A	2,23 a	72,69 a
6	12,09 AB	238,64 AB	2,89 ab	72,60 a
9	35,47 B	294,43 BC	4,78 b	66,54 ab
12	67,98 C	350,29 C	7,63 c	61,40 ab
15	72,78 C	362,15 C	8,20 c	56,86 b
21	124,29 D	460,17 D	13,17 d	55,79 b
cv (%)	22,70	12,71	19,30	8,60
DMS	23,56	66,57	2,45	11,33

Valores acompanhados da mesma letra não apresentam diferenças significativas em nível de $P = 0,05$ (Tukey).

embebição. Após esse período, observou-se uma variação acentuada somente no 4º dia de embebição. Não foram observadas diferenças significativas na massa seca desse órgão (Tabela 5). Para cotilédones verificou-se um aumento na massa fresca com 24 horas de embebição, não havendo diferenças significativas após esse período. Na massa seca, observou-se uma tendência à diminuição a partir do 2º dia de embebição, que atingiu seu valor mínimo no 6º dia (Tabela 5).

6.5. No período de 0 até 12 dias de embebição

Nesse período observou-se para o eixo, diferenças significativas em termos de massa fresca e massa seca. Na massa fresca, os aumentos foram significativos a partir do 3º dia verificando-se alterações com 4, 5, 7, 9 e 12 dias. Quanto à massa seca, obteve-se diferenças significativas a partir do 6º dia de embebição (Tabela 6).

Para os cotilédones, só foram obtidas diferenças significativas em termos de massa fresca. Essas diferenças ocorreram no 2º, 7º e 12º dias de embebição (Tabela 6).

7. Caracterização citoquímica de cotilédones e eixos embrionários

Os resultados das análises citoquímicas estão subdivididos segundo a origem das sementes, em dois sub-itens: O primeiro, para as sementes provenientes de Brasília e o segundo, para aquelas provenientes de Itirapina.

Tabela 5 - Determinação da massa fresca e massa seca de eixo embrionário e cotilédones de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, durante embebição na luz, a 25° C, até 6 dias.. Sementes procedentes de Itirapina - SP. Os dados representam a média de 15 repetições.

Tempo (dias)	Massa fresca (mg)		Massa seca (mg)	
	Eixo	Cotilédones	Eixo	Cotilédones
0	2,95 A	112,35 A	2,73 ab	102,81 a
1	6,65 B	263,37 B	2,67 ab	98,51 a
2	7,63 CB	268,09 B	2,86 a	96,16 ab
3	6,54 B	265,39 B	2,40 b	90,31 bc
4	10,05 DC	269,35 B	2,77 ab	95,08 ab
5	14,24 E	264,65 B	2,90 a	90,46 bc
6	12,07 ED	259,22 B	2,86 a	86,97 c
cv (%)	32,40	9,20	14,60	7,70
DMS	3,07	24,79	0,44	7,96

Valores acompanhados da mesma letra não apresentam diferenças significativas em nível de $P = 0,05$ (Tukey).

Tabela 6 - Determinação da massa fresca e massa seca de eixo embrionário e cotilédones de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium*, durante embebição na luz, a 25° C, até 12 dias.. Sementes procedentes de Itirapina - SP. Os dados representam a média de 15 repetições.

Tempo (dias)	Massa fresca (mg)		Massa seca (mg)	
	Eixo	Cotilédones	Eixo	Cotilédones
0	2,43 A	103,52 A	2,59 a	100,87 a
2	5,78 A	269,77 B	2,86 a	98,93 a
3	6,32 AB	281,89 BC	2,85 a	99,85 a
4	11,85 B	277,25 BC	3,23 ab	97,89 a
5	21,34 C	273,44 B	3,71 ab	96,11 a
6	21,83 C	306,17 BCD	4,20 cb	103,05 a
7	31,18 D	323,16 CD	5,24 cd	94,99 a
8	34,04 DE	345,39 DE	5,78 d	95,89 a
9	39,29 E	333,74 D	7,13 e	89,88 a
12	52,02 F	391,45 E	13,01 f	89,99 a
cv (%)	22,1	13,6	21,9	12,1
DMS	5,87	46,64	1,31	13,75

Valores acompanhados da mesma letra não apresentam diferenças significativas em nível de $P = 0,05$ (Tukey).

7.1. Sementes provenientes de Brasília

Foram realizadas análises em cortes provenientes de sementes quiescentes, ou após 24, 48 e 72 horas de embebição.

Após as colorações, os citoplasmas das células do parênquima dos cotilédones e eixos embrionários, mostraram a presença de corpos globulares. Esse padrão se manteve nas primeiras 72 horas de embebição. O tamanho desses corpos diminuiu à medida que os mesmos faziam parte de células mais próximas do floema cotiledonar.

Um problema enfrentado na caracterização citoquímica do material, foi o de, em muitos casos, os resultados do material com 72 horas ter sido semelhante ao obtido em células com 48 horas ou até mesmo com 24 horas de embebição.

7.1.1. Hematoxilina eosina (HE)

Com o uso desses corantes, em todos os tempos analisados, as paredes das células cotiledonares puderam ser detectadas em roxo devido à sua coloração pela hematoxilina (Figuras 11-12). Nos cortes de cotilédones, foram identificadas células parenquimáticas e feixes de floema formando os tecidos dessas partes da semente.

No interior das células do parênquima e dos vasos, observou-se a presença de inúmeros corpúsculos globulares corados pela eosina (Figuras 11-12). Aparentemente, a quantidade desses corpúsculos não sofreu alteração durante os períodos de embebição analisados.

Para os eixos embrionários, verificou-se o mesmo padrão de coloração obtido para os cotilédones, ou seja, paredes celulares hematoxilina-positivas, e um conteúdo citoplasmático globular e eosinófilo (Figura 13). Verificou-se ainda nos cortes dos eixos embrionários examinados, a presença de núcleos e nucléolos fortemente corados e um padrão mais difuso dos caracteres observados nos cotilédones, sendo

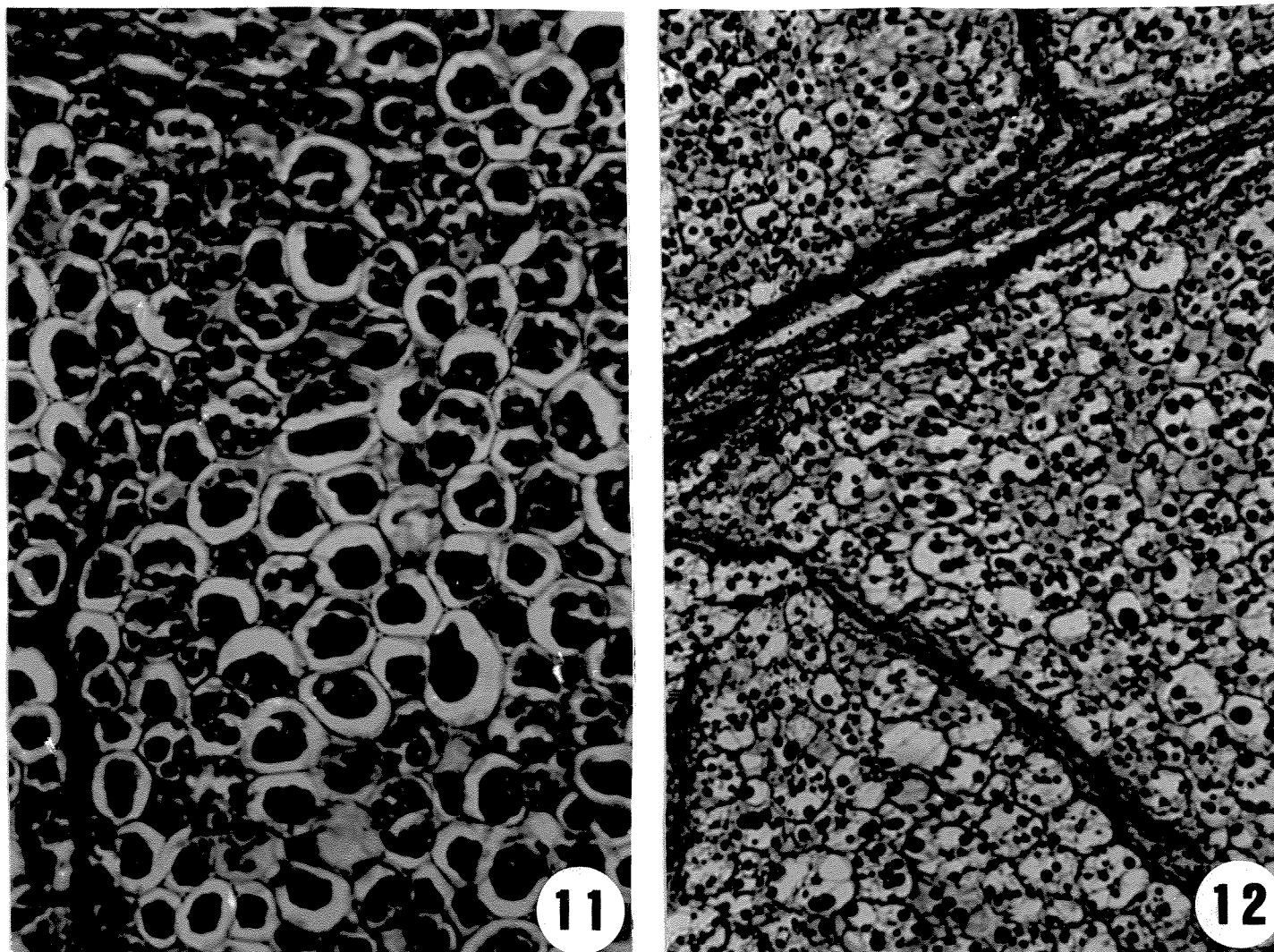


Fig.11-12: Cortes de cotilédones submetidos a coloração pela hematoxilina e eosina. Podem ser notadas as paredes celulares coradas em roxo pela hematoxilina e um conteúdo citoplasmático globular e eosina-positivo. No interior dos feixes de floema, pode ser notada a presença de material corado pela eosina (↑) Aumento: 400 X. **Fig.11:** Semente quiescente. O material citoplasmático encontra-se mais agregado e pode ainda ser notada a expansão das paredes celulares ocorridas durante o processo de fixação. **Fig.12:** Sementes após 3 dias de embebição. Nota-se uma desagregação dos glóbulos citoplasmáticos.

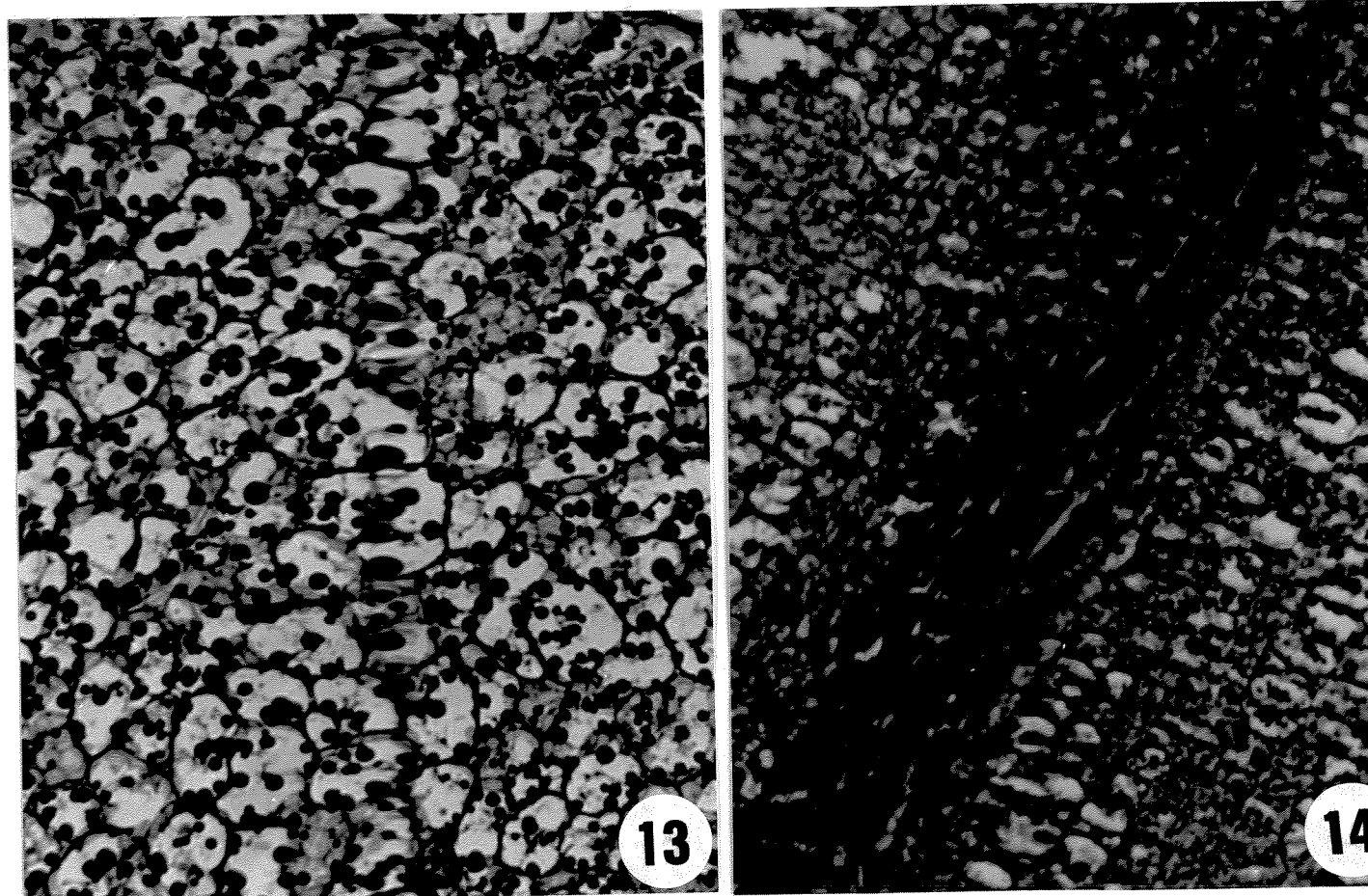


Fig.13-14: Cortes de eixos embrionários submetidos a coloração pela hematoxilina e eosina. O padrão de coloração foi semelhante aos cotilédones, com as paredes hematoxilina-positivas e o citoplasma eosinófilo. Aumento: 400 X. **Fig.13:** Eixo embrionário de semente após 1 dia de embebição, onde pode ser visualizado o aspecto globular do material citoplasmático. **Fig.14:** Eixo embrionário após 3 dias de embebição. As células do sistema vascular apresentam-se mais coradas e podem ser notados núcleos e nucléolos (↑) corados intensamente pela eosina.

que as células do sistema vascular apresentaram-se mais intensamente coradas (Figura 14).

7.1.2. Xylidine ponceau (XP) a pH 2,5

As células cotiledonares tiveram suas paredes menos coradas por esse método, quando comparadas aos resultados obtidos pela hematoxilina. Entretanto, o conteúdo citoplasmático globular, já descrito para o método da HE, foi intensamente corado pelo XP (Figuras 15-16). No interior das células do floema pôde ser observada uma grande quantidade de material globular XP positivo. Em cortes da porção abaxial de cotilédones com 72 horas de embebição verificou-se um acentuado desarranjo no padrão globular observado nos demais tempos e regiões (Figura 16).

Nos eixos embrionários verificou-se a manutenção do padrão globular observado anteriormente através do emprego de HE (Figura 17). Eixos embrionários corados pelo XP apresentaram também um aspecto mais difuso do padrão globular e a presença de substâncias XP positivas no interior dos vasos (Figura 18). O padrão de distribuição bem como a morfologia do material corado, diferiu bastante a partir do tempo zero até 3 dias de embebição.

7.1.3. Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0

Por esse método as paredes das células cotiledonares apresentaram-se metacromáticas (arroxeadas). O mesmo padrão globular do conteúdo citoplasmático pode ser observado com esse corante, sendo que o interior dos glóbulos mostrou-se esverdeado (ortocromático) e a região periférica mostrou-se azul, sugerindo a presença de materiais com diferença de afinidade pelo corante (Figuras 19-20). Foi ainda notada a presença de material globular no interior dos vasos, como nos métodos anteriores (Figura 21).

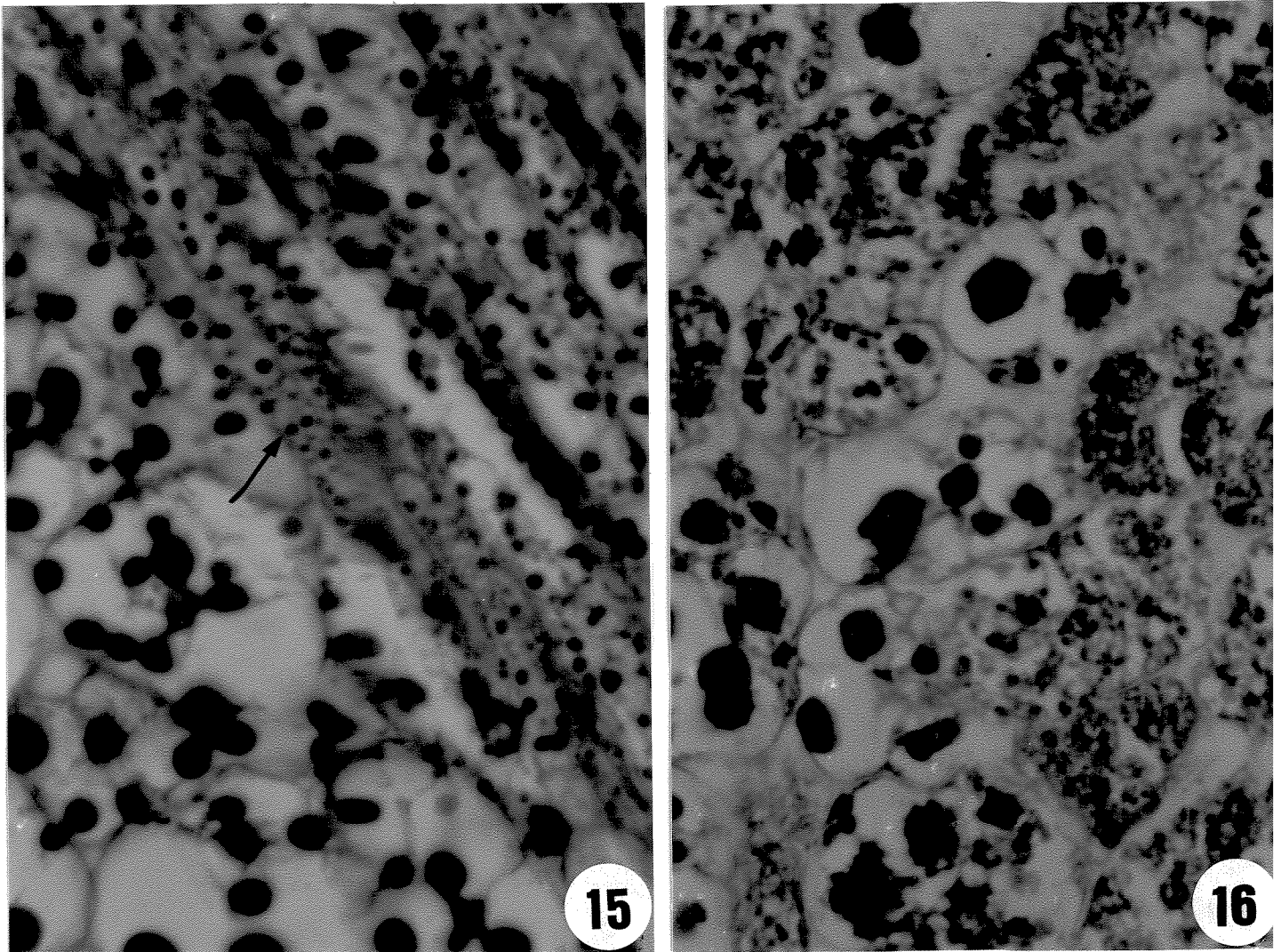


Fig.15-16: Cortes de cotilédones corados pelo xylydine ponceau a pH 2,5. Paredes celulares são coradas menos intensamente do que os corpos protéicos presentes no citoplasma das células. Aumento: 400 X. **Fig.15:** Cotilédone de semente com 1 dia de embebição. Nota-se a presença de material XP-positivo no interior das células do floema. (↑). **Fig.16:** Material com 3 dias de embebição, apresentando os corpos protéicos com um aspecto mais difuso em relação ao material anterior.

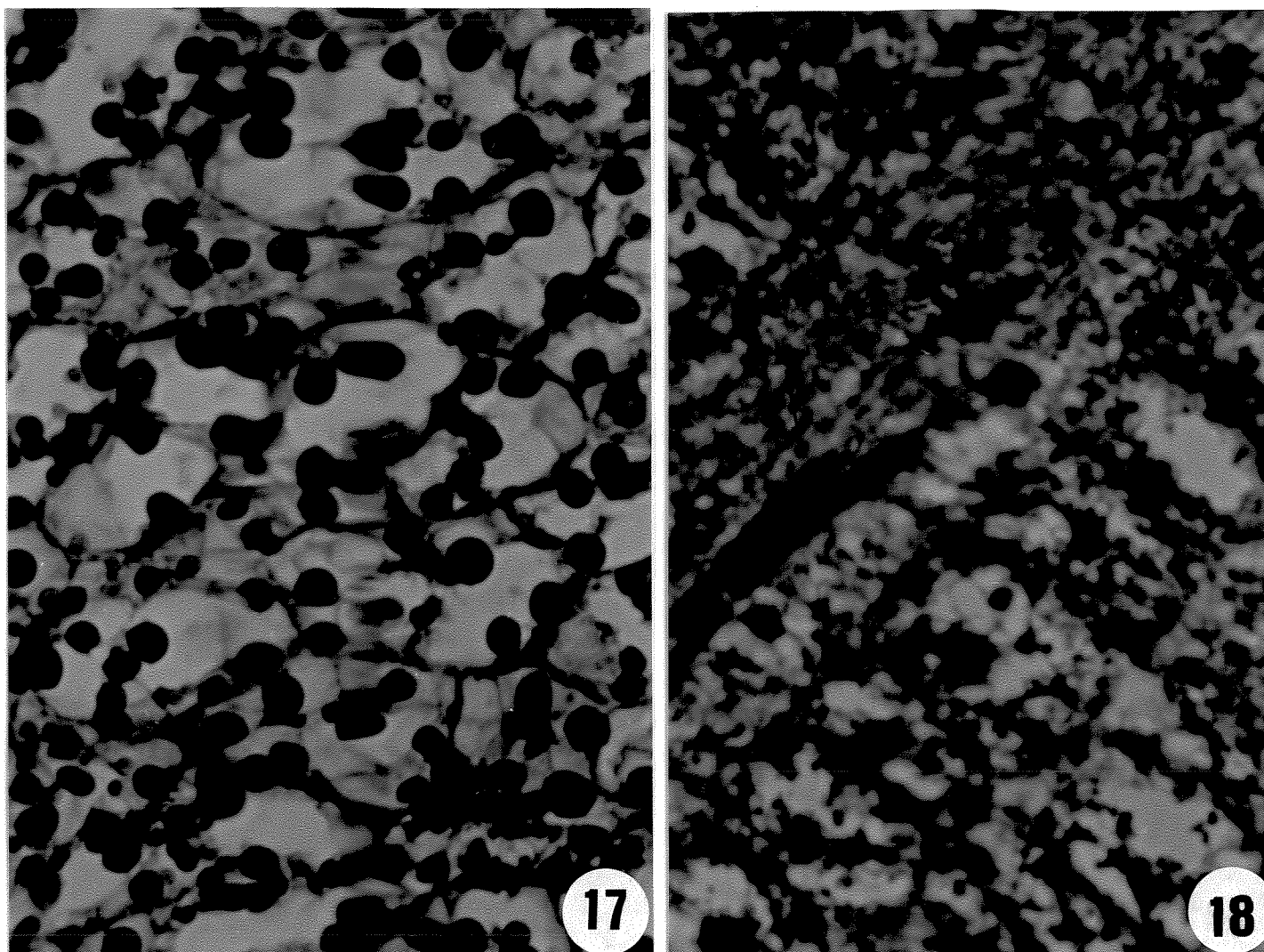


Fig.17-18: Cortes de eixos embrionários corados pelo xylydine ponceau a pH 2,5. Destaca-se o formato globular do material protéico corado. Aumento: 400 X. **Fig.17:** Material após 1 dia de embebição. **Fig.18:** Material após 3 dias de embebição. Nota-se que o material globular diminuiu drasticamente seu diâmetro durante esse período. Nas células vasculares, destaca-se a presença de material intensamente corado (↑).

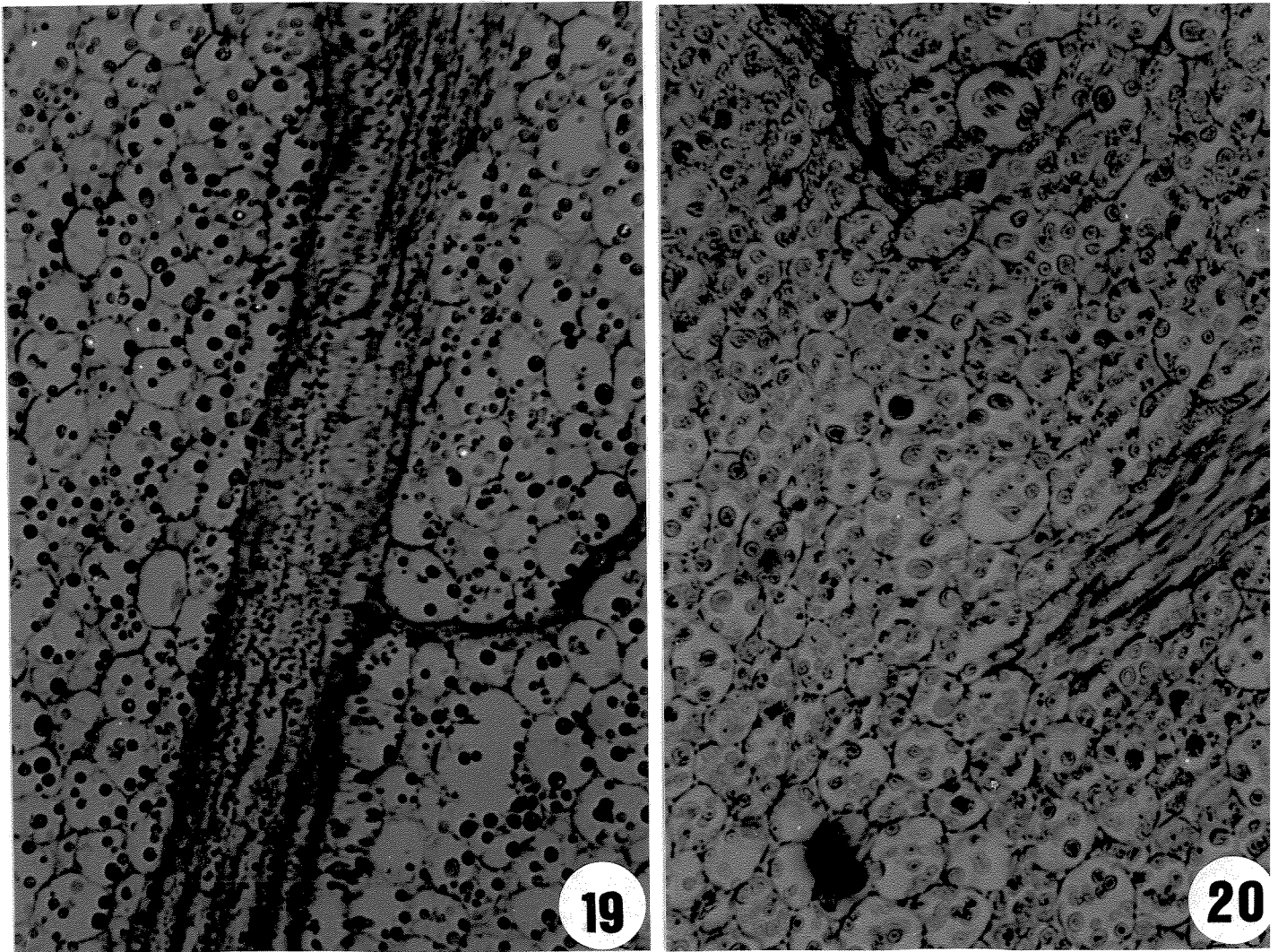


Fig.19-20: Cortes de cotilédones corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. São visualizados os corpos protéicos corados em verde e as paredes celulares azul-arroxeadas. Aumento: 400 X. **Fig.19:** Material com 1 dia de embebição. Nota-se uma série de glóbulos no interior dos feixes de floema. **Fig.20:** Material após 3 dias de embebição. Os corpos protéicos, estão aparentemente corados em verde mais claro

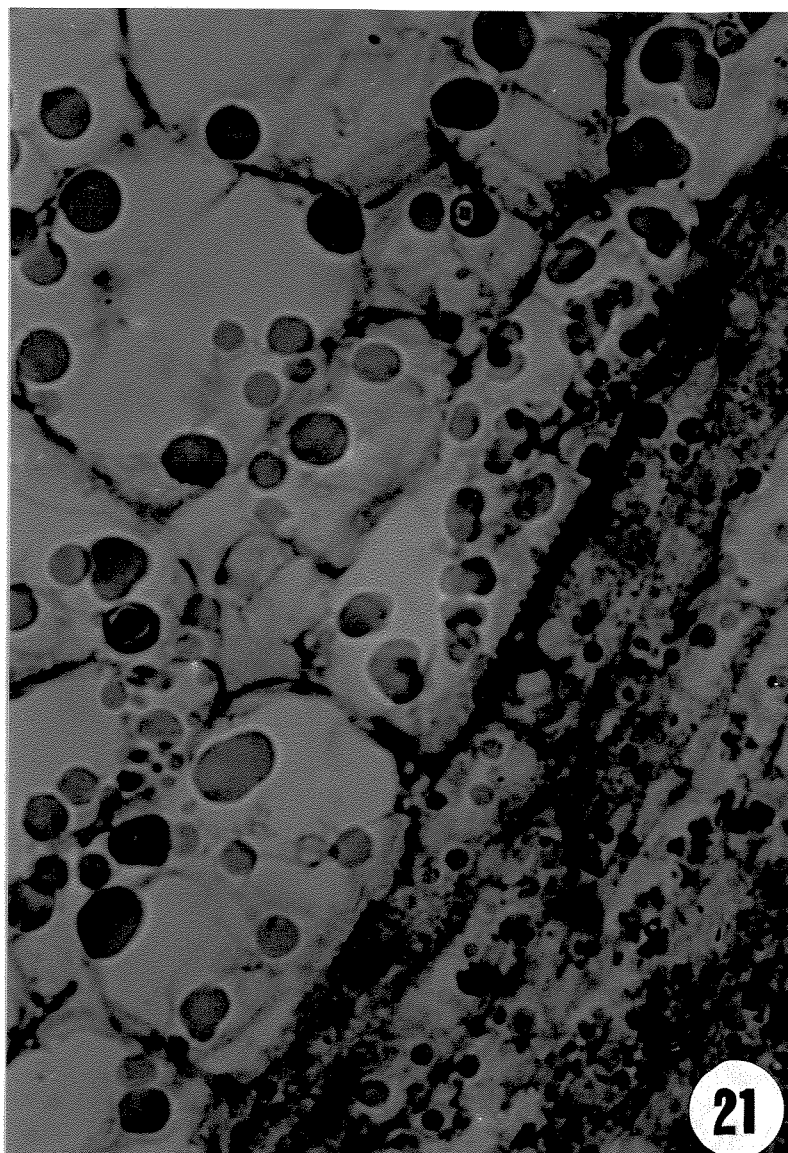


Fig.21: Detalhe de corte longitudinal de cotilédone após 1 dia de embebição e corado pelo azul de toluidina a pH 4,0. Pode ser notada a metacromasia das paredes celulares e a ortocromasia dos corpos protéicos. Nota-se ainda a presença de material ortocromático globular no interior dos feixes de floema. Aumento: 1000 X.

As células do eixo embrionário apresentaram suas paredes mais metacromáticas do que as células dos cotilédones (Figura 22) mantendo a ortocromasia dos glóbulos que aparecem em abundância. No material com 3 dias de embebição, foi possível detectar a presença de núcleos e nucléolos intensamente corados em azul e um material citoplasmático com aparência granular (Figura 23).

7.1.4. Sudan-black (SB)

Os resultados indicaram uma grande quantidade de de reserva lipídica, tanto nas células de cotilédones quanto nas do eixo embrionário nos diferentes tempos de embebição, merecendo portanto atenção especial (dados não apresentados).

7.1.5. Microscopia de polarização

O uso do microscópio de polarização com polarizador e analisador cruzados, permitiu a observação de uma forte birrefringência nas paredes celulares de maneira geral (cotilédones e eixo) e a detecção intracelular de grãos de amido, que apareceram em pequena quantidade (dados não apresentados).

7.2 Sementes provenientes de Itirapina

Os resultados indicaram haver, apesar da padronização das sementes, uma variação considerável na velocidade de germinação e crescimento, confirmando os resultados obtidos com as sementes provenientes de Brasília. Aos 6 dias de embebição por exemplo, foi possível a observação de 5 estádios de crescimento do eixo hipocótilo-radicular, apesar da germinação ter tido início por volta do 4º dia de

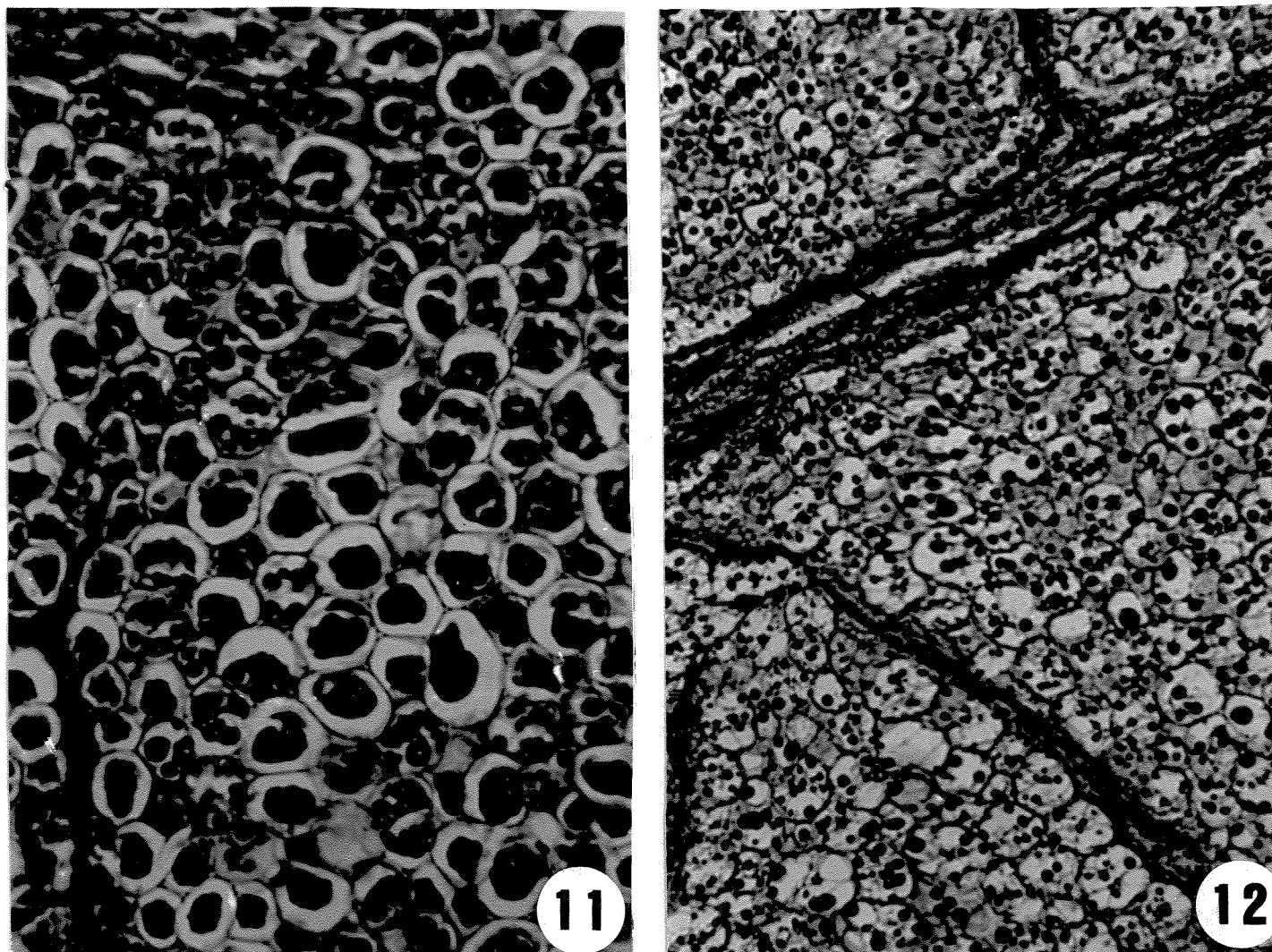


Fig.11-12: Cortes de cotilédones submetidos a coloração pela hematoxilina e eosina. Podem ser notadas as paredes celulares coradas em roxo pela hematoxilina e um conteúdo citoplasmático globular e eosina-positivo. No interior dos feixes de floema, pode ser notada a presença de material corado pela eosina (↑) Aumento: 400 X. **Fig.11:** Semente quiescente. O material citoplasmático encontra-se mais agregado e pode ainda ser notada a expansão das paredes celulares ocorridas durante o processo de fixação. **Fig.12:** Sementes após 3 dias de embebição. Nota-se uma desagregação dos glóbulos citoplasmáticos.

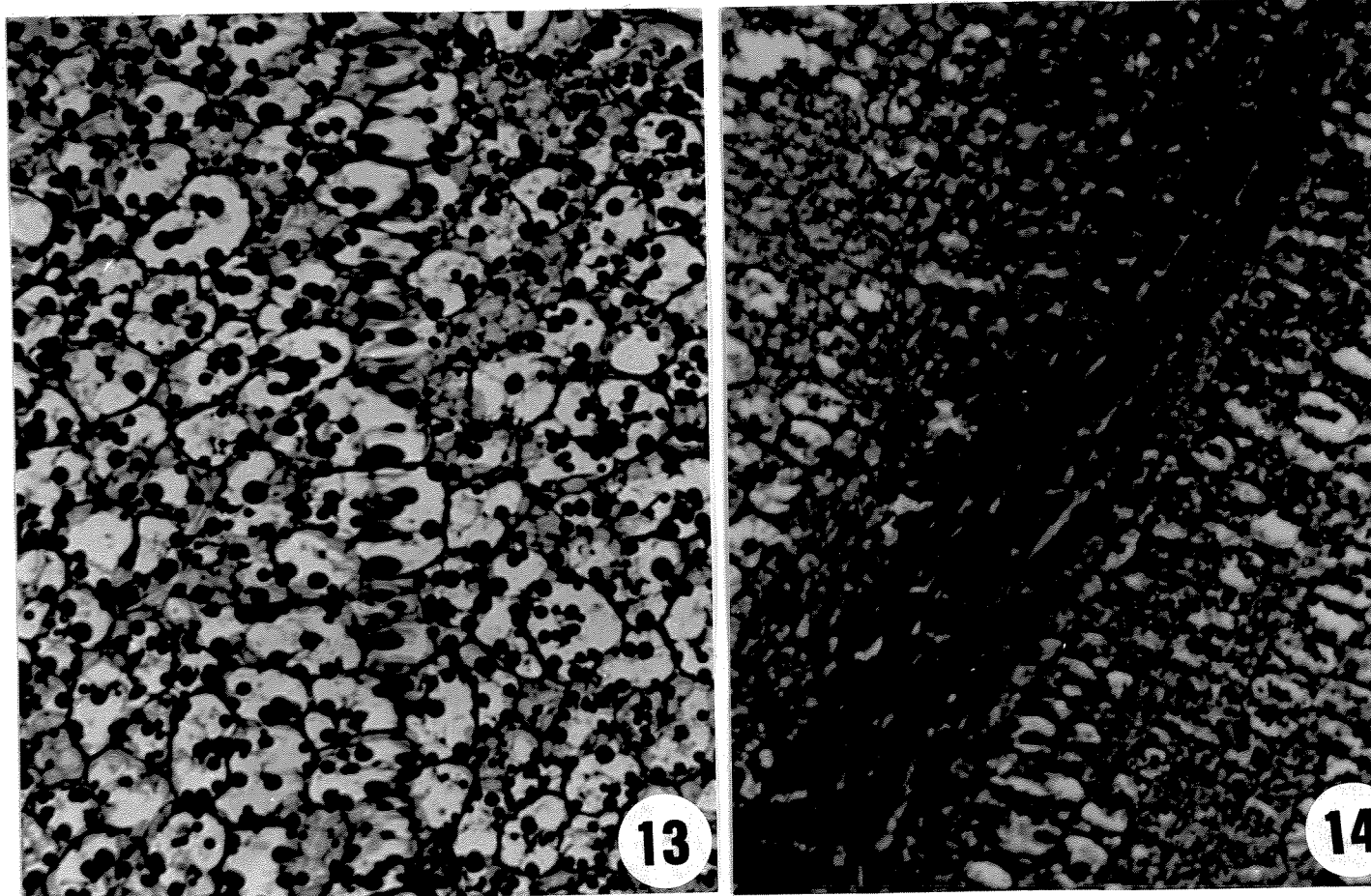


Fig.13-14: Cortes de eixos embrionários submetidos a coloração pela hematoxilina e eosina. O padrão de coloração foi semelhante aos cotilédones, com as paredes hematoxilina-positivas e o citoplasma eosinófilo. Aumento: 400 X. **Fig.13:** Eixo embrionário de semente após 1 dia de embebição, onde pode ser visualizado o aspecto globular do material citoplasmático. **Fig.14:** Eixo embrionário após 3 dias de embebição. As células do sistema vascular apresentam-se mais coradas e podem ser notados núcleos e nucléolos (↑) corados intensamente pela eosina.

que as células do sistema vascular apresentaram-se mais intensamente coradas (Figura 14).

7.1.2. Xylidine ponceau (XP) a pH 2,5

As células cotiledonares tiveram suas paredes menos coradas por esse método, quando comparadas aos resultados obtidos pela hematoxilina. Entretanto, o conteúdo citoplasmático globular, já descrito para o método da HE, foi intensamente corado pelo XP (Figuras 15-16). No interior das células do floema pôde ser observada uma grande quantidade de material globular XP positivo. Em cortes da porção abaxial de cotilédones com 72 horas de embebição verificou-se um acentuado desarranjo no padrão globular observado nos demais tempos e regiões (Figura 16).

Nos eixos embrionários verificou-se a manutenção do padrão globular observado anteriormente através do emprego de HE (Figura 17). Eixos embrionários corados pelo XP apresentaram também um aspecto mais difuso do padrão globular e a presença de substâncias XP positivas no interior dos vasos (Figura 18). O padrão de distribuição bem como a morfologia do material corado, diferiu bastante a partir do tempo zero até 3 dias de embebição.

7.1.3. Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0

Por esse método as paredes das células cotiledonares apresentaram-se metacromáticas (arroxeadas). O mesmo padrão globular do conteúdo citoplasmático pode ser observado com esse corante, sendo que o interior dos glóbulos mostrou-se esverdeado (ortocromático) e a região periférica mostrou-se azul, sugerindo a presença de materiais com diferença de afinidade pelo corante (Figuras 19-20). Foi ainda notada a presença de material globular no interior dos vasos, como nos métodos anteriores (Figura 21).

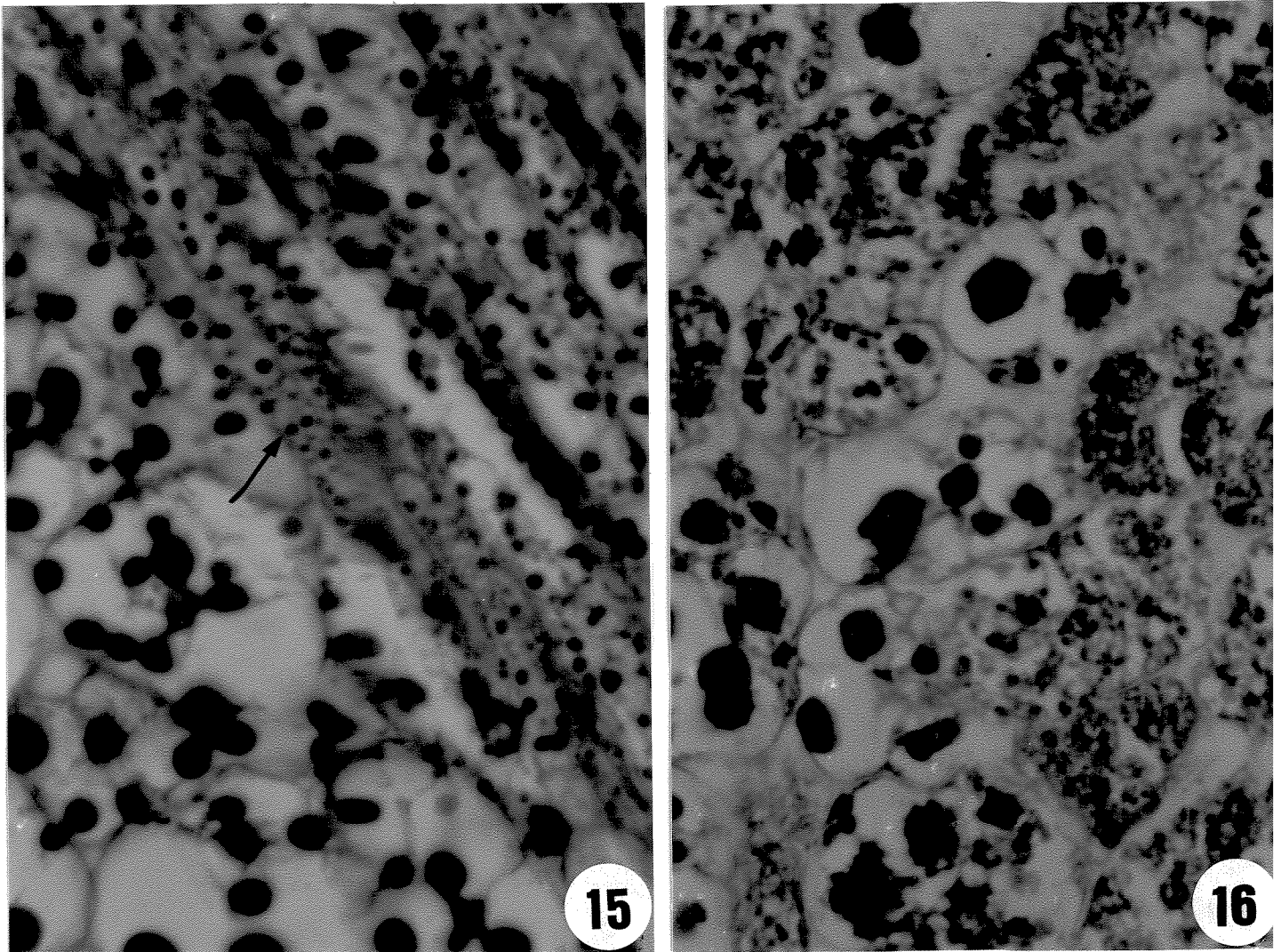


Fig.15-16: Cortes de cotilédones corados pelo xylydine ponceau a pH 2,5. Paredes celulares são coradas menos intensamente do que os corpos protéicos presentes no citoplasma das células. Aumento: 400 X. **Fig.15:** Cotilédone de semente com 1 dia de embebição. Nota-se a presença de material XP-positivo no interior das células do floema. (↑). **Fig.16:** Material com 3 dias de embebição, apresentando os corpos protéicos com um aspecto mais difuso em relação ao material anterior.

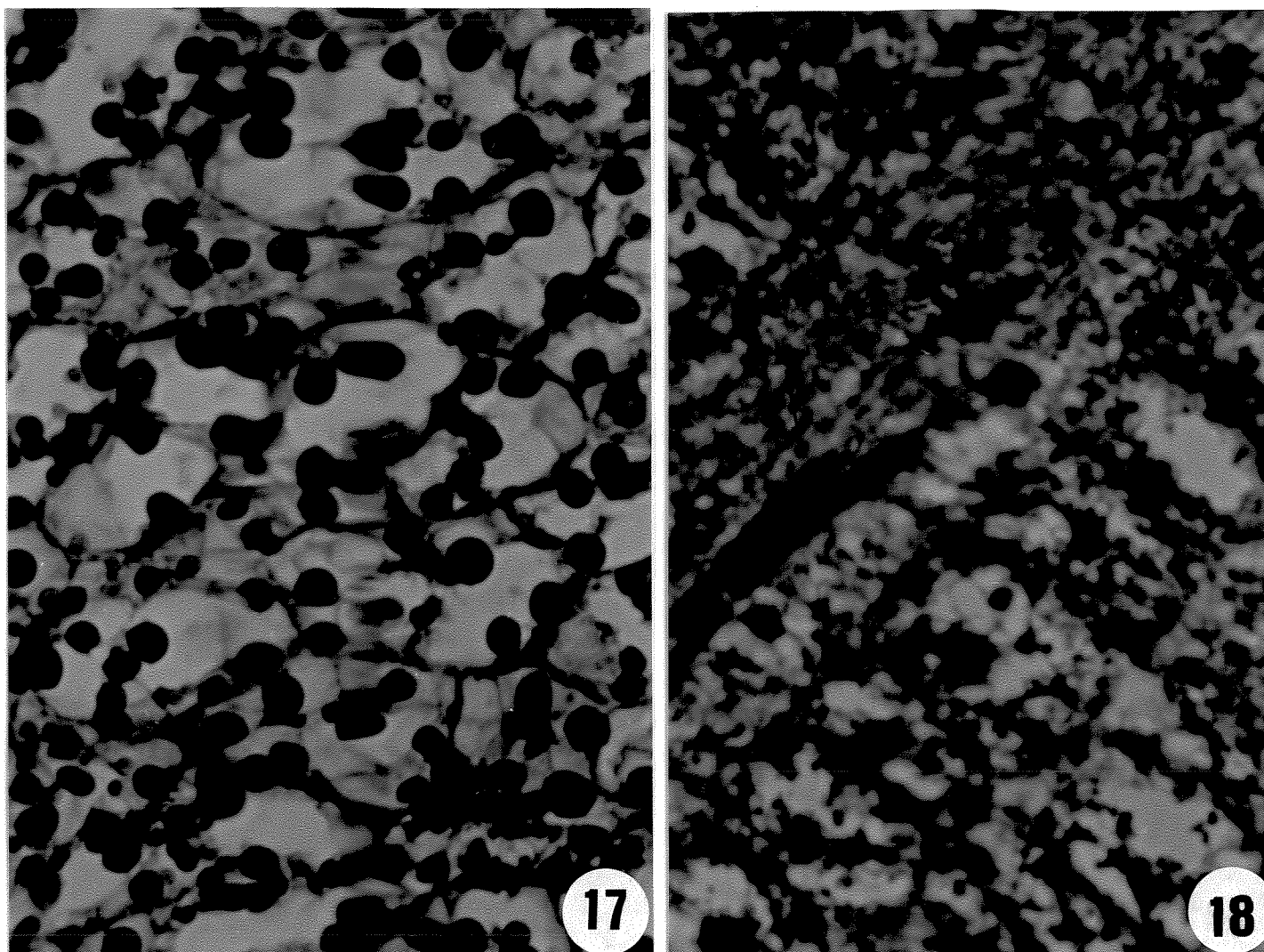


Fig.17-18: Cortes de eixos embrionários corados pelo xylydine ponceau a pH 2,5. Destaca-se o formato globular do material protéico corado. Aumento: 400 X. **Fig.17:** Material após 1 dia de embebição. **Fig.18:** Material após 3 dias de embebição. Nota-se que o material globular diminuiu drasticamente seu diâmetro durante esse período. Nas células vasculares, destaca-se a presença de material intensamente corado (↑).

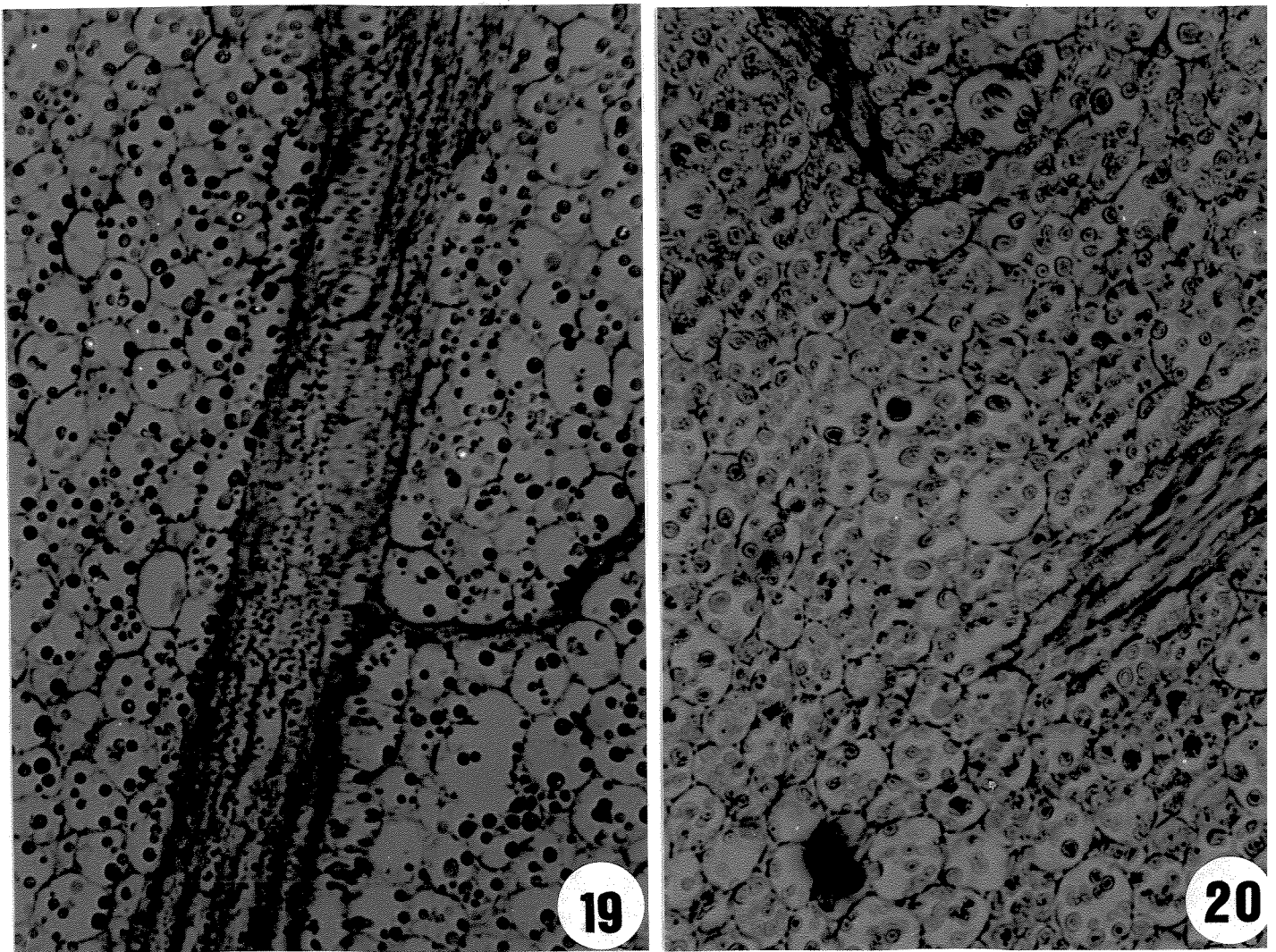


Fig.19-20: Cortes de cotilédones corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. São visualizados os corpos protéicos corados em verde e as paredes celulares azul-arroxeadas. Aumento: 400 X. **Fig.19:** Material com 1 dia de embebição. Nota-se uma série de glóbulos no interior dos feixes de floema. **Fig.20:** Material após 3 dias de embebição. Os corpos protéicos, estão aparentemente corados em verde mais claro

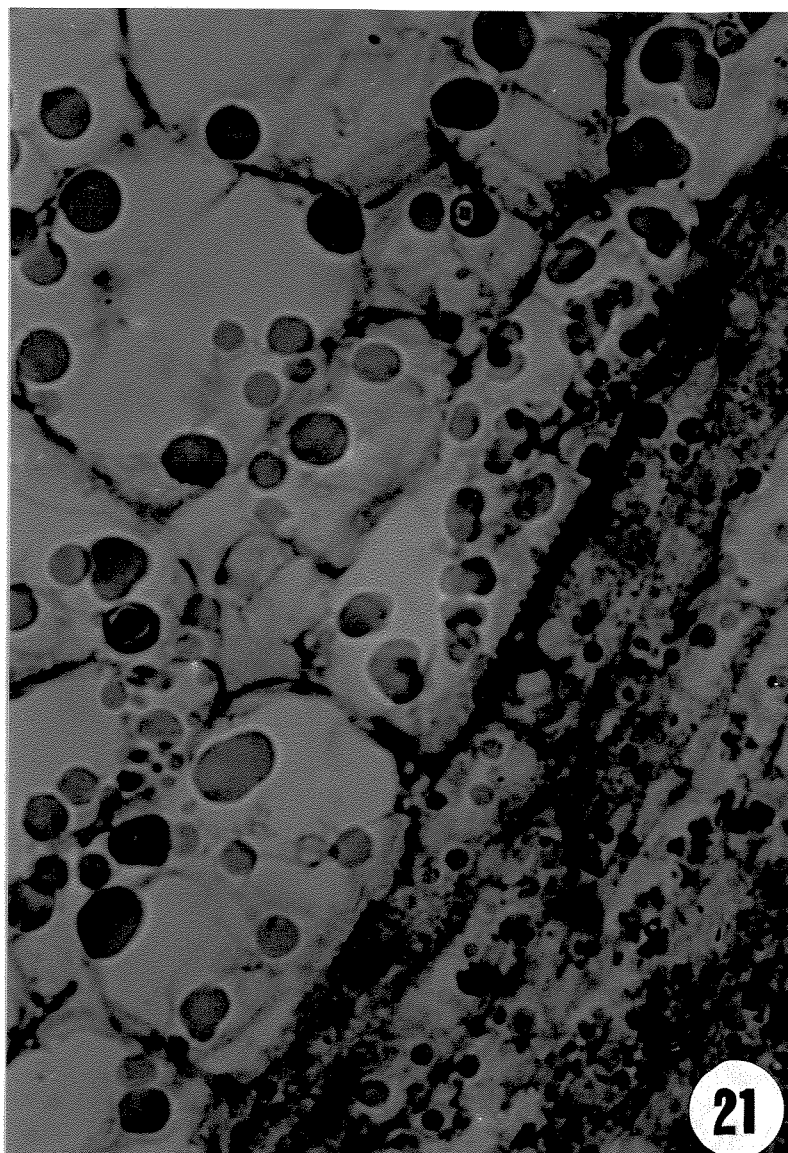


Fig.21: Detalhe de corte longitudinal de cotilédone após 1 dia de embebição e corado pelo azul de toluidina a pH 4,0. Pode ser notada a metacromasia das paredes celulares e a ortocromasia dos corpos protéicos. Nota-se ainda a presença de material ortocromático globular no interior dos feixes de floema. Aumento: 1000 X.

As células do eixo embrionário apresentaram suas paredes mais metacromáticas do que as células dos cotilédones (Figura 22) mantendo a ortocromasia dos glóbulos que aparecem em abundância. No material com 3 dias de embebição, foi possível detectar a presença de núcleos e nucléolos intensamente corados em azul e um material citoplasmático com aparência granular (Figura 23).

7.1.4. Sudan-black (SB)

Os resultados indicaram uma grande quantidade de de reserva lipídica, tanto nas células de cotilédones quanto nas do eixo embrionário nos diferentes tempos de embebição, merecendo portanto atenção especial (dados não apresentados).

7.1.5. Microscopia de polarização

O uso do microscópio de polarização com polarizador e analisador cruzados, permitiu a observação de uma forte birrefringência nas paredes celulares de maneira geral (cotilédones e eixo) e a detecção intracelular de grãos de amido, que apareceram em pequena quantidade (dados não apresentados).

7.2 Sementes provenientes de Itirapina

Os resultados indicaram haver, apesar da padronização das sementes, uma variação considerável na velocidade de germinação e crescimento, confirmando os resultados obtidos com as sementes provenientes de Brasília. Aos 6 dias de embebição por exemplo, foi possível a observação de 5 estádios de crescimento do eixo hipocótilo-radicular, apesar da germinação ter tido início por volta do 4º dia de

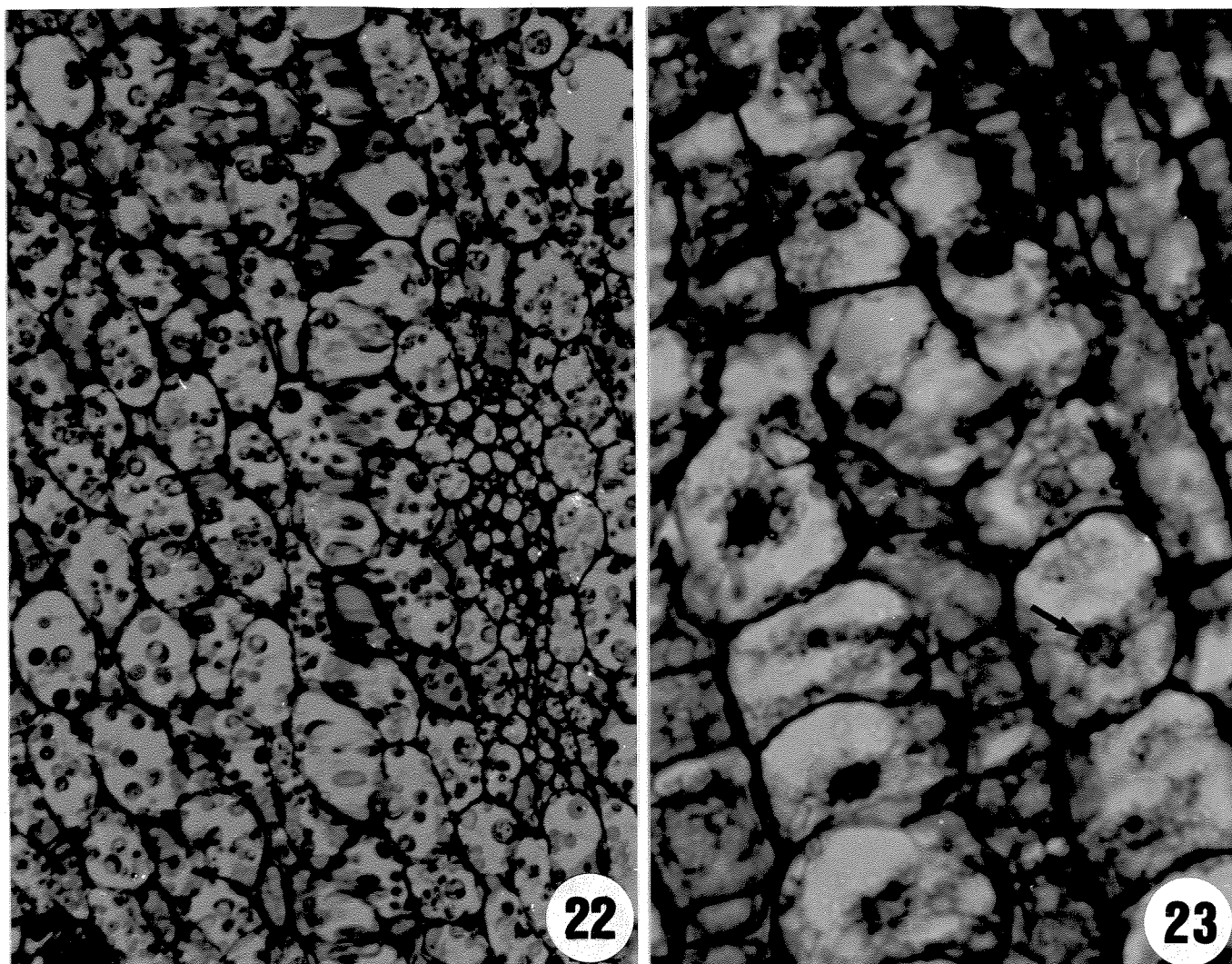


Fig.22-23: Cortes de eixos embrionários corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. Pode ser notada a metacromasia das paredes celulares coradas em roxo e o conteúdo globular do citoplasma. **Fig.22:** Material com 1 dia de embebição. Os corpos protéicos apresentam-se bem globulares e ortocromáticos. Aumento: 400 X. **Fig.23:** Material após 3 dias de embebição. Nota-se a forte metacromasia das paredes, o material citoplasmático granular e a coloração dos núcleos e nucléolos em azul(↑). Aumento: 1000 X.

embebição. Para ilustrar a relativa independência do padrão morfológico e do tempo de embebição das sementes, são mostradas as Figuras 24 a 27, onde pode ser notado o mesmo padrão morfológico dos corpos protéicos para células cotiledonares com 2, 4 e 6 dias de embebição (Figuras 24-26) e diferentes padrões para material com o mesmo tempo de embebição (Figuras 25 e 27).

Em nível citoquímico, foram observadas diferenças no padrão morfológico dos materiais de reserva, já a partir de 48 horas de embebição, seguindo-se um período variável em termos de tempo, mas sem modificações muito evidentes, até a protrusão da radícula.

Assim, foi selecionado material baseado em estádios estabelecidos com base no padrão de crescimento, a cada 5 mm, desde a protrusão e até 50 mm de comprimento do eixo hipocótilo-radicular. Nesse material, não foram verificadas diferenças marcantes até 20 e entre 20 e 50 mm. Assim, dos estádios inicialmente estabelecidos, foram selecionados cinco: sementes quiescentes (S0); sementes com 48 horas de embebição (S1); protrusão da radícula (S2); eixo hipocótilo-radicular com até 20 mm (S3) e com até 50 mm (S4) de comprimento. Para cotilédones e eixos embrionários foram mantidos os mesmos índices, de 0 a 4, alterando-se para C ou E a letra correspondente.

7.2.1. Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0

Nos cortes de cotilédones corados pelo azul de toluidina (Figuras 28 a 35) as células apresentaram suas paredes fortemente metacromáticas (arroxeadas, λ_{\max} = 580-590 nm) em contraste com a ortocromasia do conteúdo citoplasmático (esverdeado, λ_{\max} = 620-630 nm).

Nos cotilédones de sementes quiescentes (C0), o conteúdo citoplasmático se apresentou uniforme em todas as células do parênquima, com um aspecto globular e agregado. Delimitando esses glóbulos pôde ser notado um envoltório corado em

Fig.24-27: Cortes de cotilédones com diferentes períodos de embebição corados pelo xylidine ponceau a pH 2,5, mostrando padrões semelhantes para diferentes tempos de embebição, ou padrões diferentes para um mesmo tempo de embebição. Podem ser notados os corpos protéicos intensamente corados e, mais discretamente, as paredes celulares. Aumento: 400 X. **Fig.24:** Material com 2 dias de embebição. **Fig.25:** Material com 4 dias de embebição. **Fig.26:** Material com 6 dias de embebição. **Fig.27:** Material com 4 dias de embebição, apresentando corpos protéicos de menor tamanho.

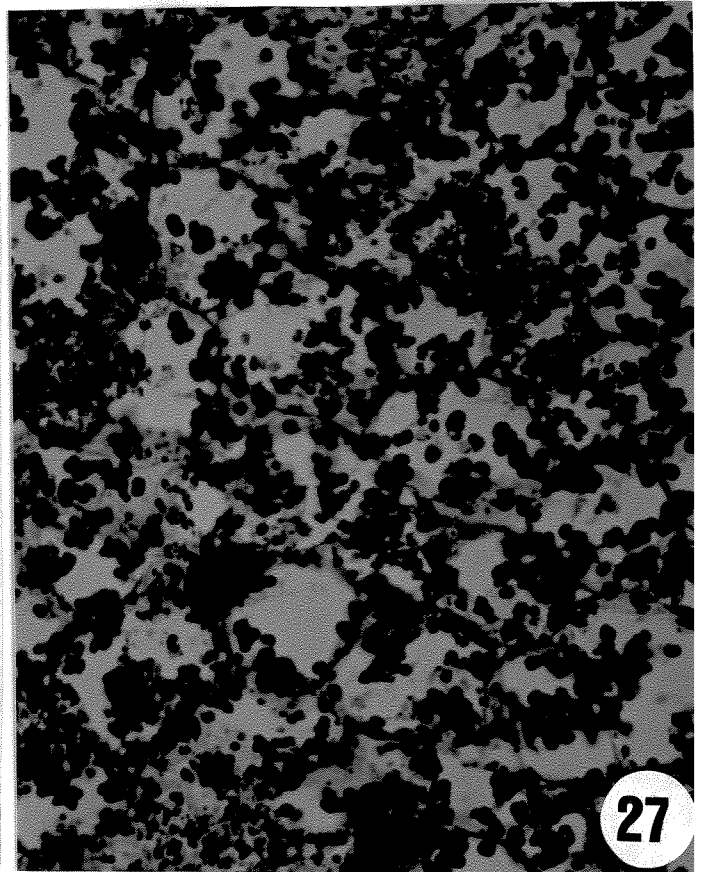
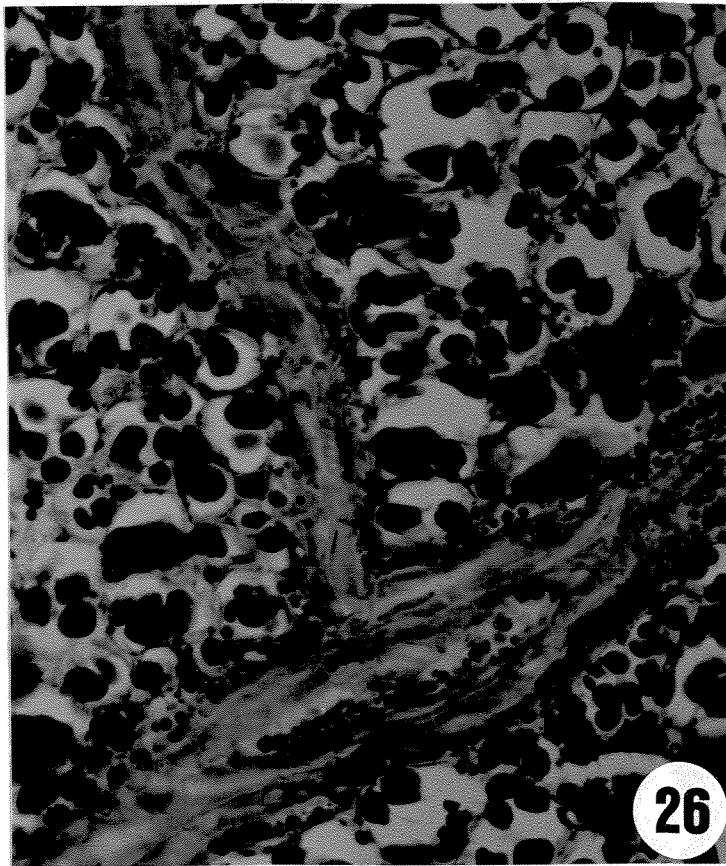
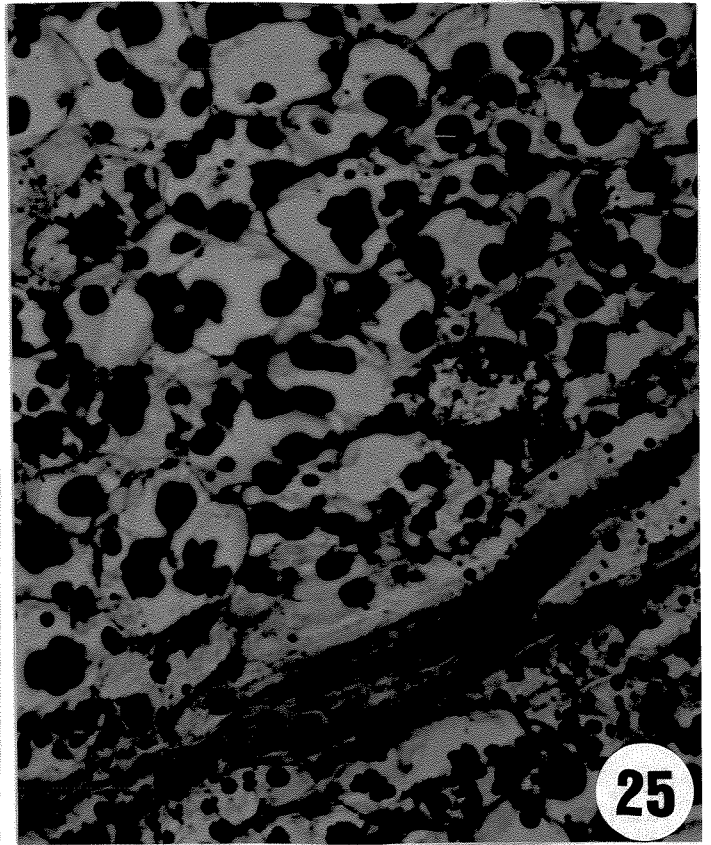
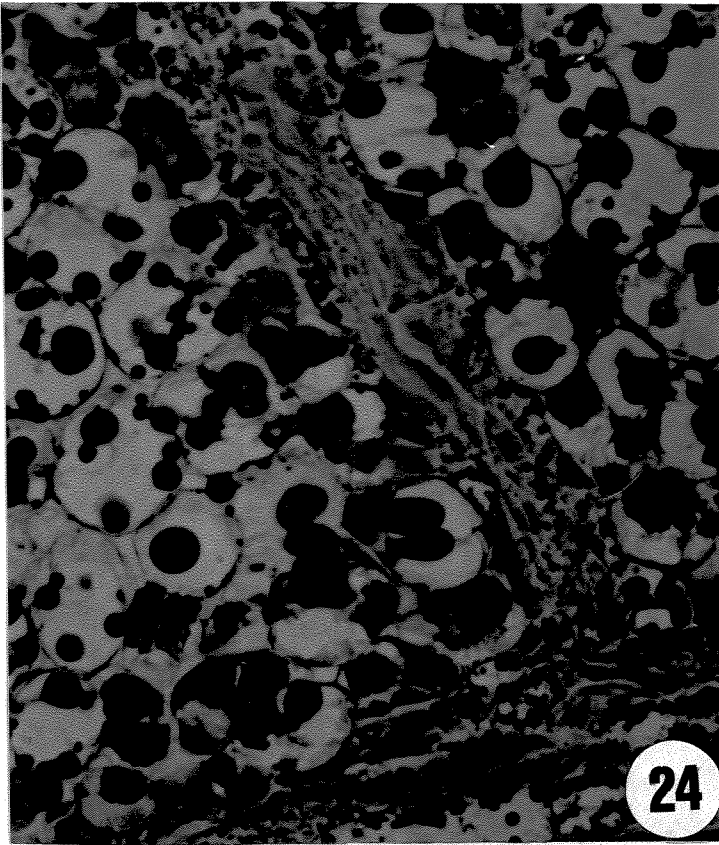


Fig.28-31: Cortes de cotilédones de sementes com diferentes tempos de embebição, corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. Pode ser notada a metacromasia das paredes celulares e um conteúdo citoplasmático ortocromático. Aumento: 400X. **Fig.28:** Material proveniente de semente quiescente (C0). Os corpos protéicos, ortocromáticos são delimitados por membrana corada em azul. **Fig.29:** Material após 48 h de embebição (C1). Podem ser notados materiais AT-positivos no interior dos vasos. Apesar de pequenas, ocorrem diferenças já após 48 horas de embebição. **Fig.30:** Material com o eixo hipocótilo radicular menor do que 20 mm. Os corpos protéicos em sua maior parte já se encontram individualizados. **Fig.31:** Material com o eixo hipocótilo-radicular com 40 mm. As paredes celulares tornam-se mais metacromáticas

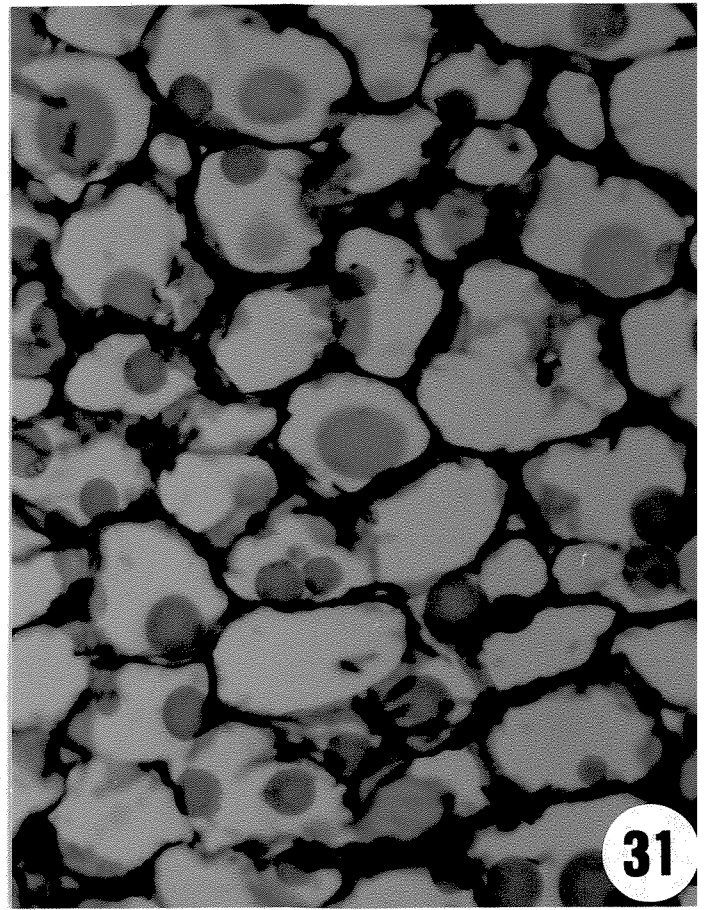
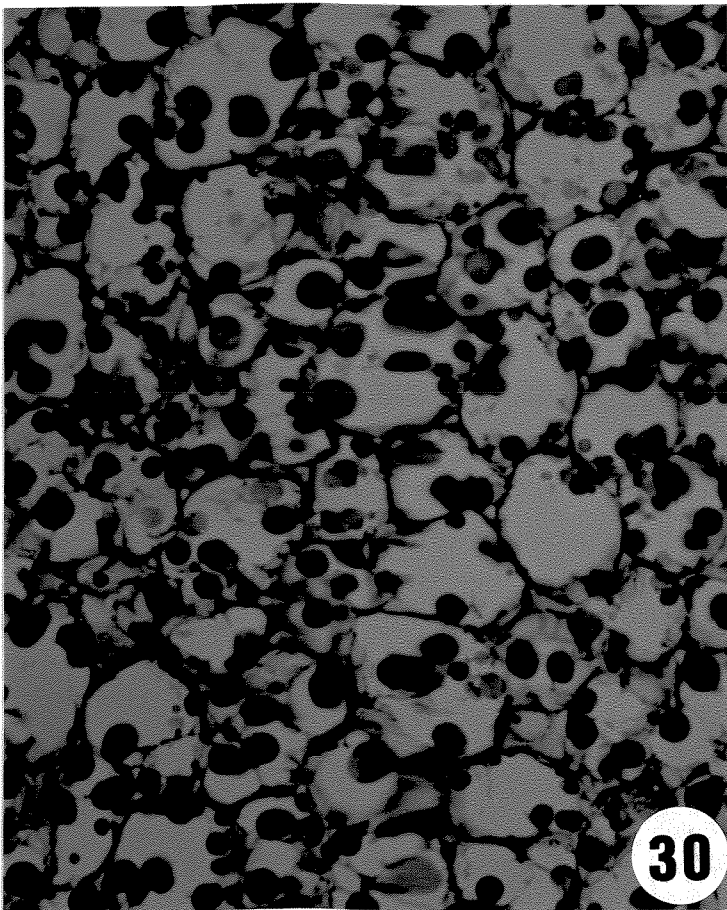
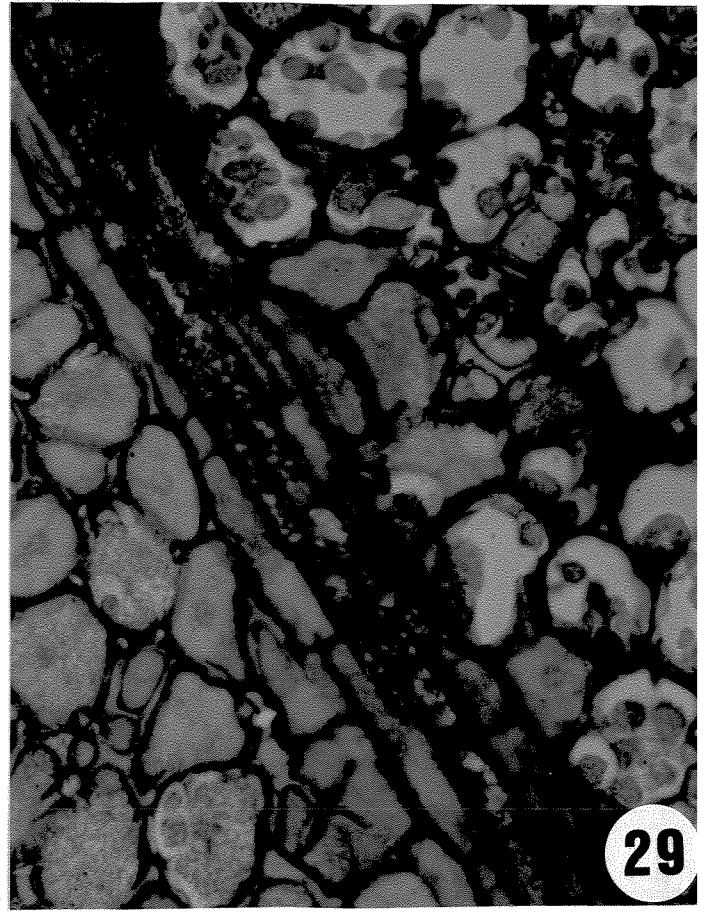
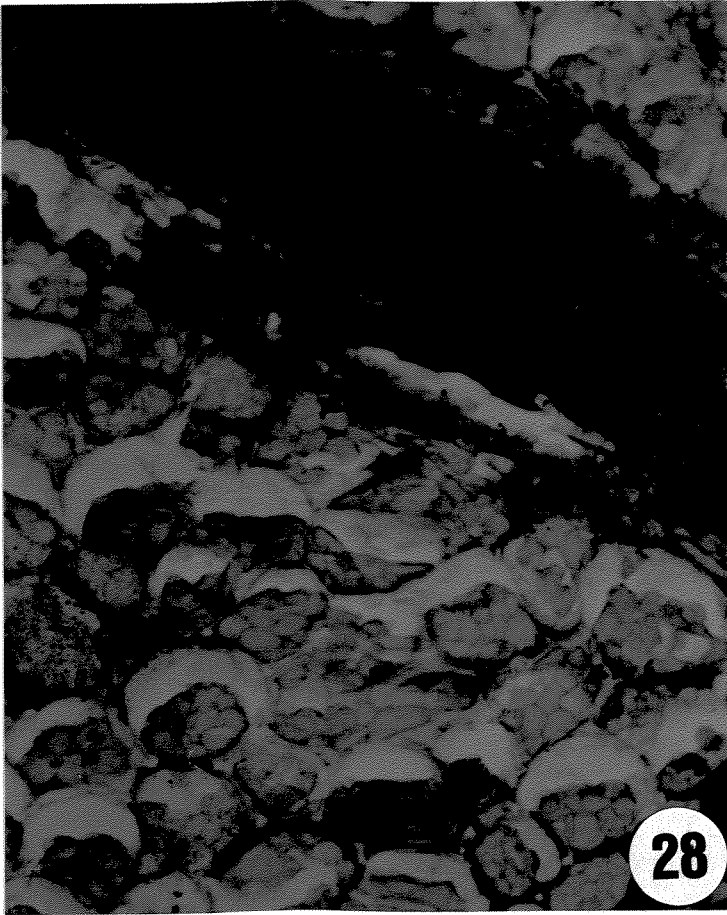
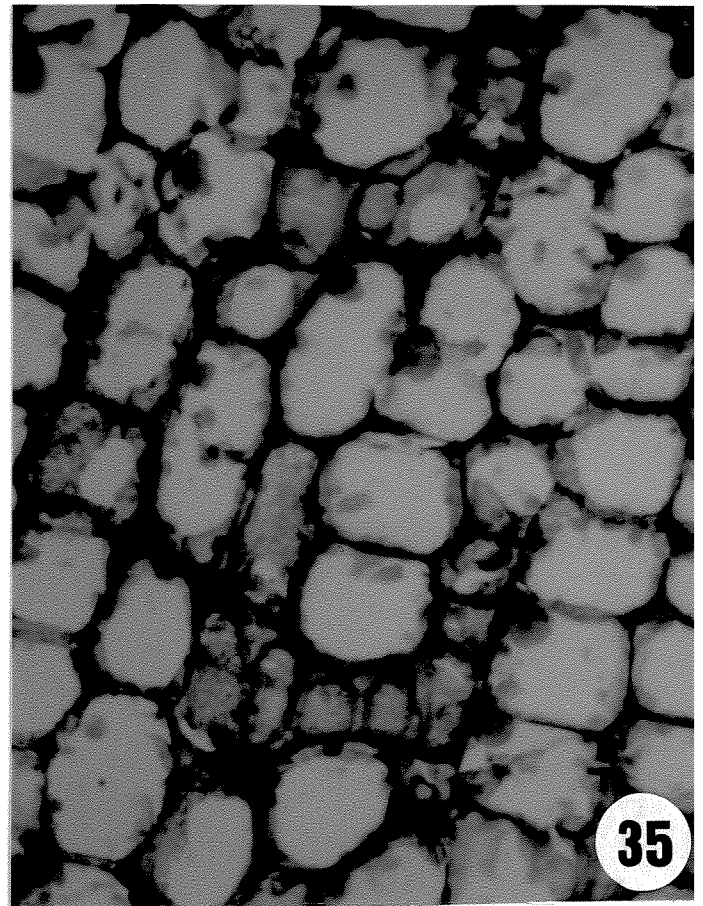
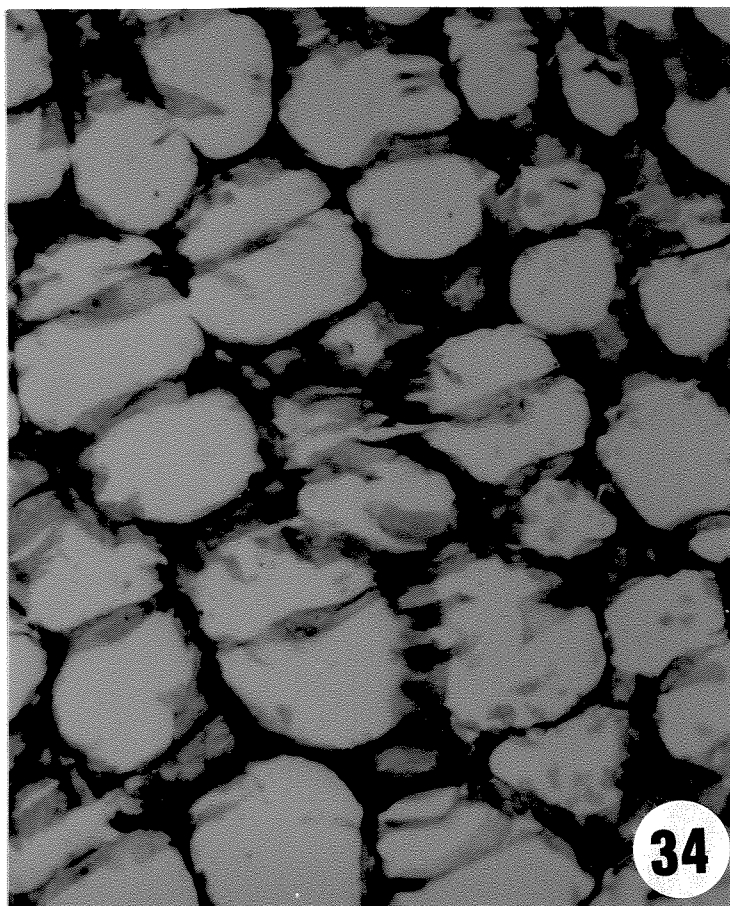
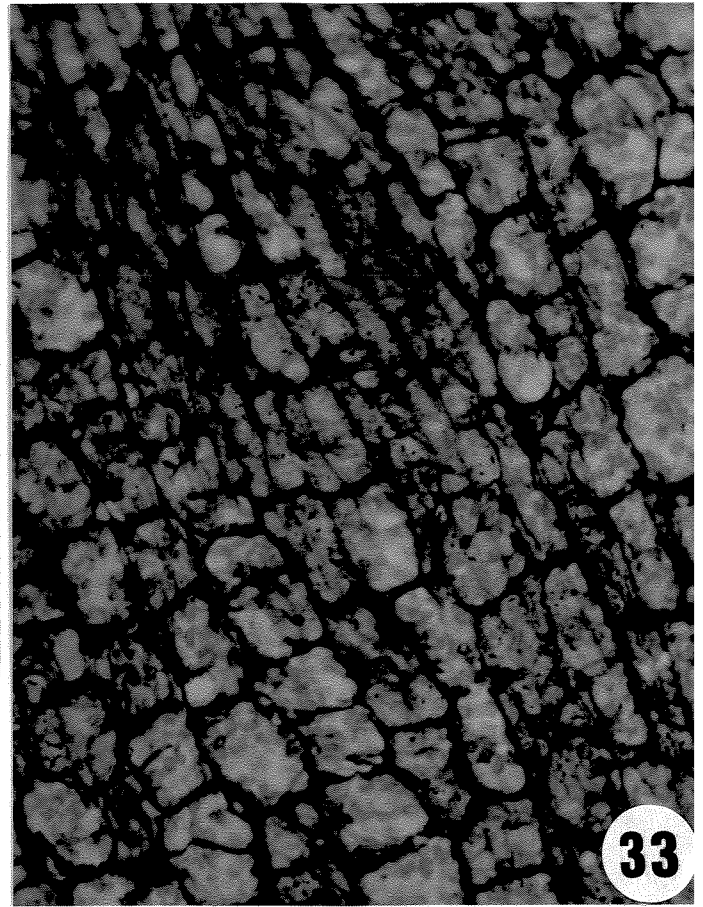
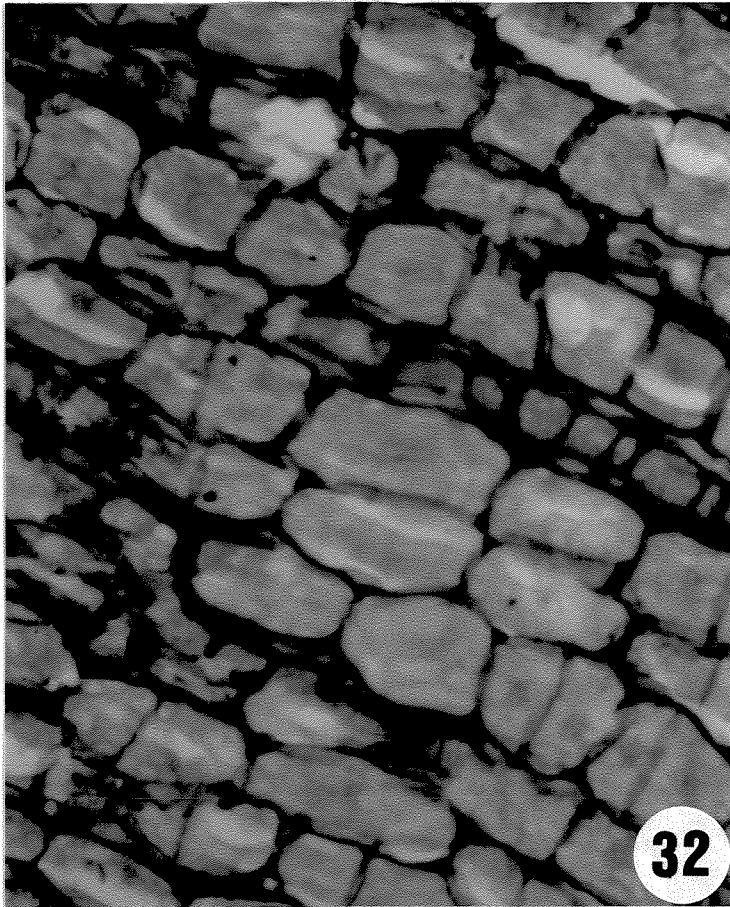


Fig.32-35: Cortes de eixos embrionários corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. Podem ser notadas as paredes celulares coradas em roxo (metacromáticas) em contraste com o material citoplasmático corado em verde (ortocromático). Aumento: 400 X. **Fig.32:** E0 **Fig.33:** E1 **Fig.34:** E3 **Fig.35:** E4.



azul. Os feixes do floema apresentaram suas paredes celulares mais metacromáticas quando comparadas com as células do parênquima (Figura 28). A partir de 48 horas embebição (C1) já pôde ser observada uma separação dos glóbulos citoplasmáticos, principalmente nas células da região central dos cotilédones (Figura 29). Essa desagregação se acentuou (Figura 30) nos estádios C2 e C3 e no estádio C4 estes glóbulos se apresentaram maiores, em menor quantidade, com um formato circular bem definido e um aparente aumento na ortocromasia (Figura 31). Nas paredes celulares pôde ser observado um aumento da metacromasia de C0 até C4 (Figuras 28-31).

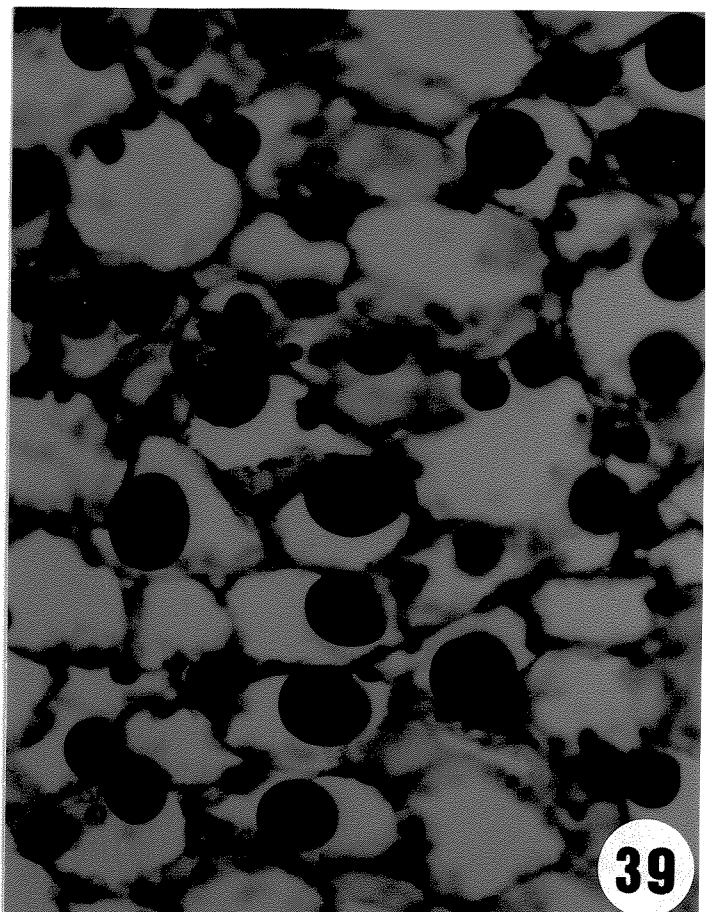
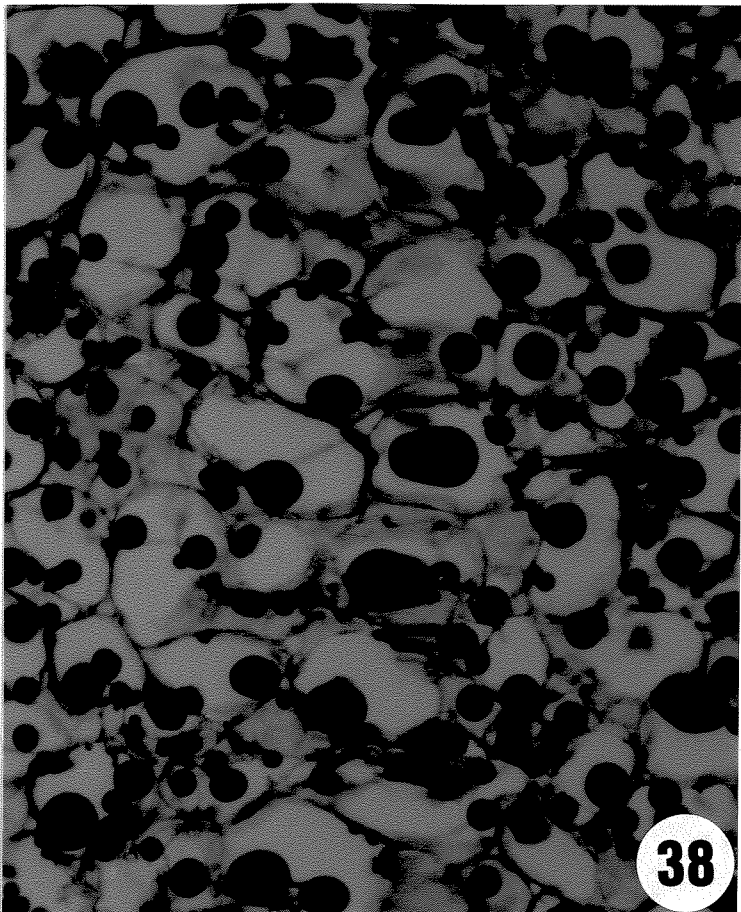
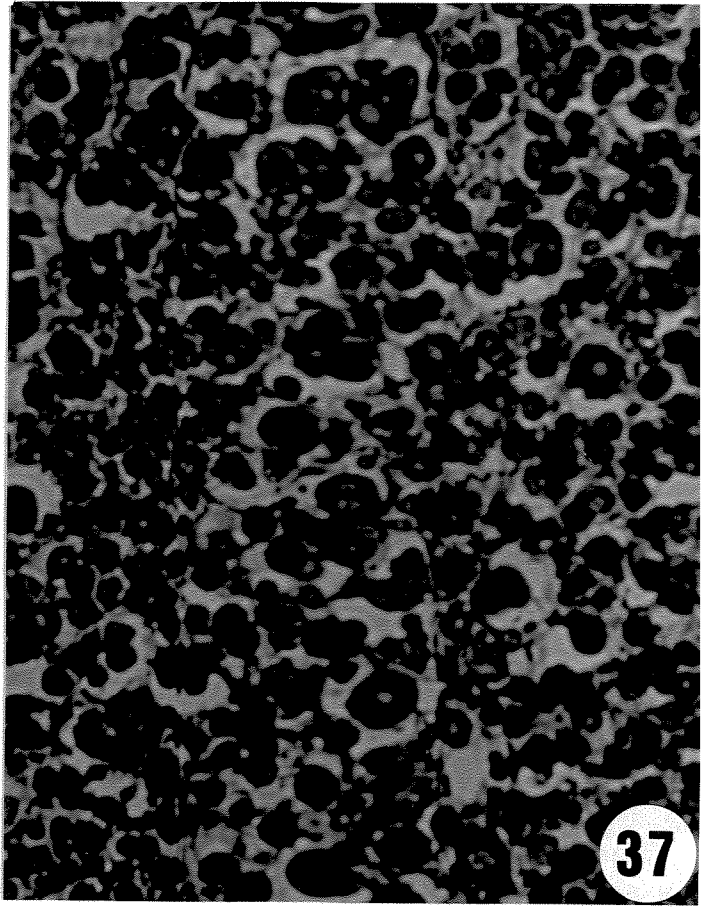
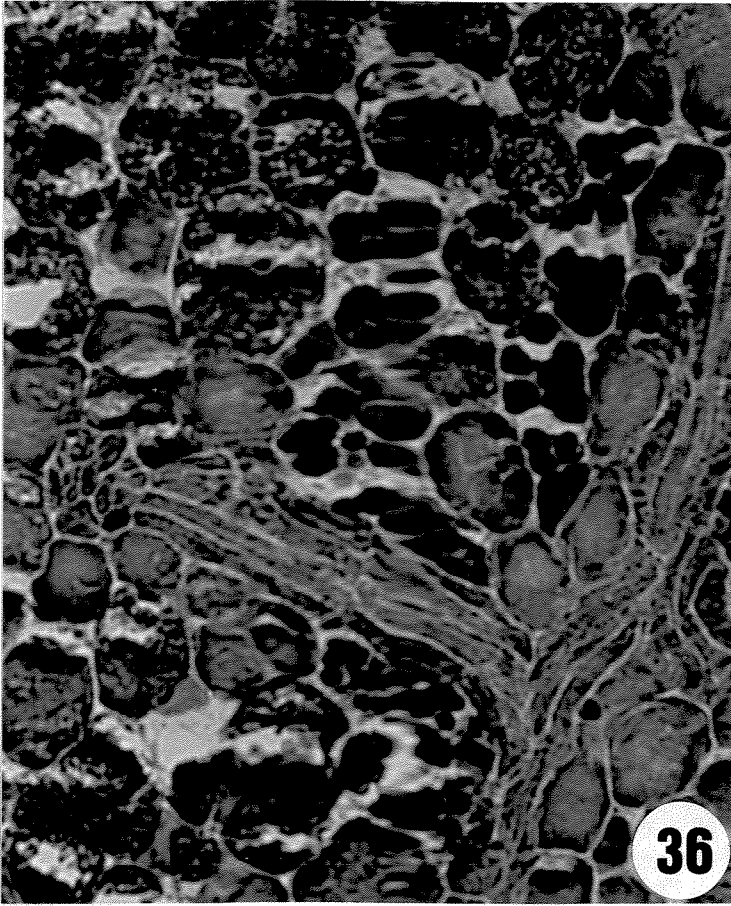
Nos eixos embrionários, a metacromasia das paredes celulares foi intensa desde E0 e não sofreu alterações evidentes até E4. No citoplasma o padrão observado foi semelhante àquele obtido nos cotilédones, mas as mudanças se processaram mais rapidamente e a redução do número de glóbulos corados foi mais drástica (Figuras 32-34).

7.2.2. Xylidine ponceau (XP) a pH 2,5

Nos cortes corados pelo XP a pH 2,5 o material citoplasmático globular das células do parênquima dos cotilédones foi intensa e homogeneamente corado em C0 (Figura 36), tornando-se mais descompactado com o avanço dos estádios (Figuras 37-39). O padrão morfológico desses grânulos se tornou cada vez mais regular e esférico, à medida que o desenvolvimento da plântula avançou. Assim, em C1 foram observados grânulos um pouco mais evidentes do que em C0 (Figura 37). O tamanho desses grânulos aumenta e sua quantidade diminui no interior das células, confirmando assim os resultados obtidos pelas colorações com AT.

Nos eixos embrionários também se observou a mesma variação do padrão morfológico encontrado nos cotilédones. Do mesmo modo, também foi observada uma maior velocidade na diminuição do número de glóbulos, fazendo com que

Fig.36-39:Cortes de cotilédones corados pelo xylidine ponceau a pH 2,5. Os corpos protéicos são bem corados pelo método, mesmo no interior de vasos do floema, em contraste com a menor coloração das paredes celulares. **Fig.36:** C0. **Fig.37:** C1. **Fig.38:** C3. **Fig.39:** C4, onde os glóbulos se apresentam maiores e em menor quantidade.



células de eixos embrionários de um determinado estágio, indicassem o padrão morfológico do estágio seguinte para as células cotiledonares (Figuras 40-43).

O tratamento pela pepsina, seguido de coloração pelo XP, removeu praticamente todo o conteúdo citoplasmático XP-positivo, restando apenas as paredes celulares fracamente coradas (Figura 44). A ação da tripsina foi menos drástica mas removeu grande parte do material corado pelo XP (Figura 45). Esse padrão foi idêntico para todos os estádios, tanto para cotilédones quanto para eixos embrionários.

7.2.3. Sudan-black (SB)

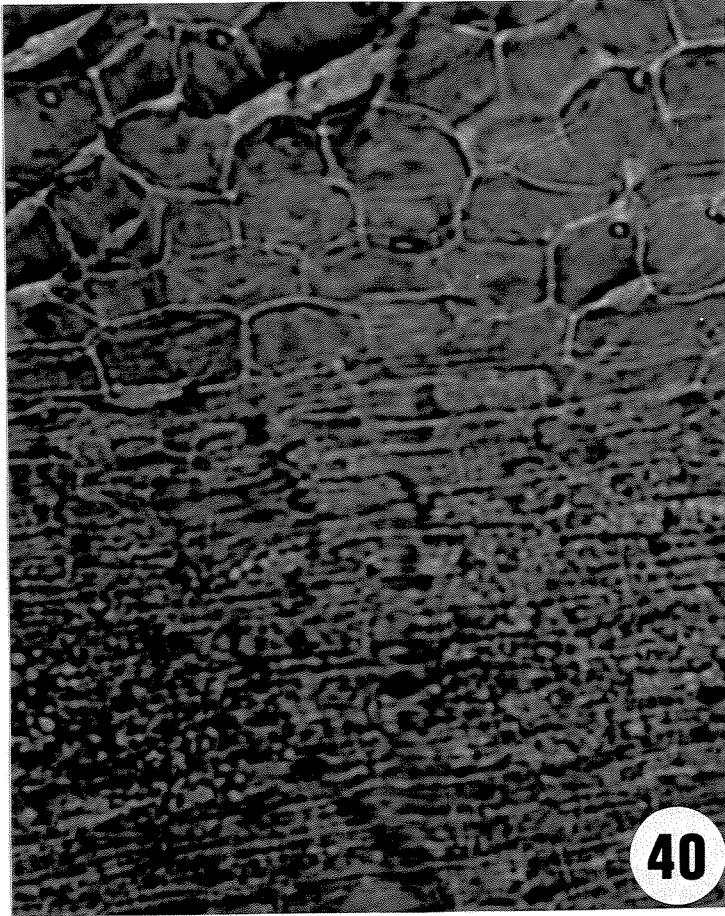
Os cortes corados pelo Sudan black revelaram uma grande quantidade de material hidrofóbico, principalmente nas células dos cotilédones de sementes quiescentes (Figura 46). Após 48 horas de embebição pôde ser notado que esse material diminuiu, revelando a preseça dos glóbulos corados pelo XP mas que não foram corados pelo Sudan black (Figura 47). A partir desse estágio, continuou havendo diminuição gradativa do material com afinidade ao corante e em C4 essa redução se tornou mais evidente (Figuras 48-49).

Nos eixos embrionários o comportamento foi semelhante, podendo ser notada uma redução gradativa do material hidrofóbico a partir de E0 até E4 (Figuras 50 e 51). As paredes celulares de cotilédones ou eixos embrionários em todos os estádios analisados não foram coradas pelo Sudan black (Figuras 46-51).

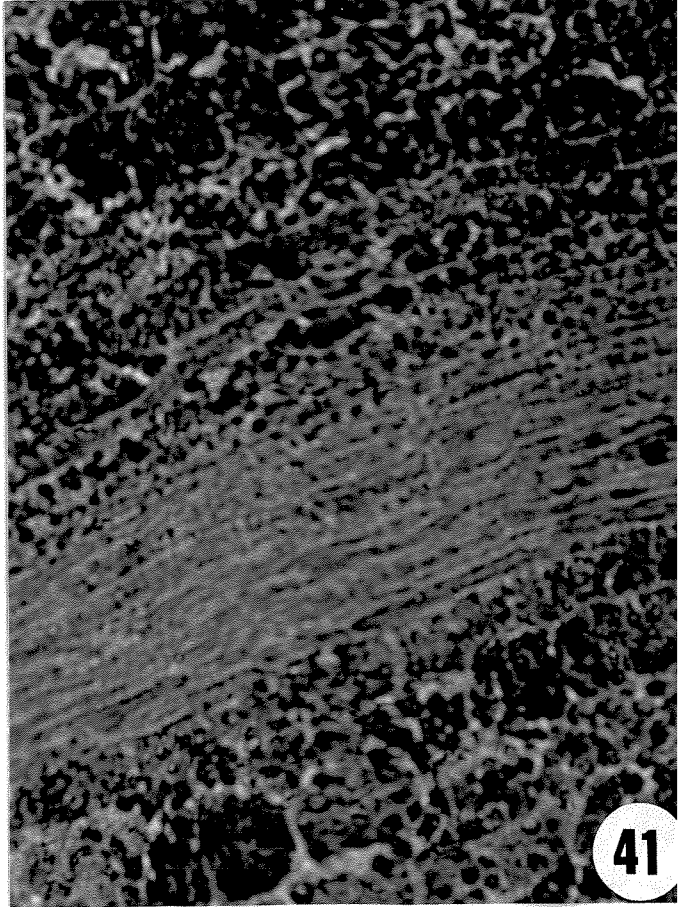
7.2.4. Método do PAS

O material tratado apenas pelo Reativo de Schiff não revelou nenhuma coloração (Figura 52). Entretanto, quando os mesmos foram previamente oxidados

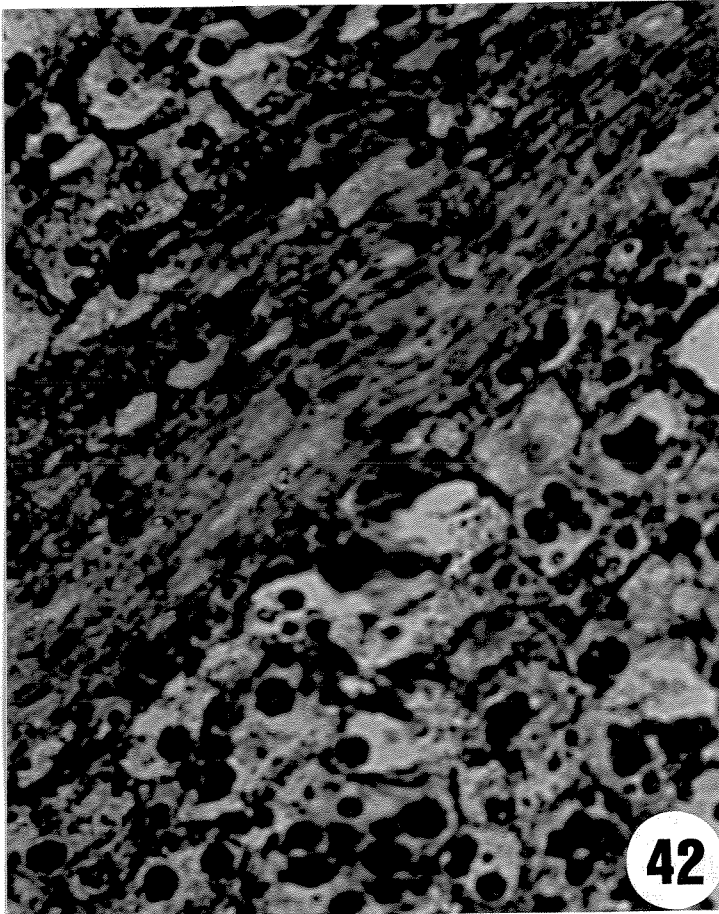
Fig.40-43: Cortes de eixos embrionários corados pelo xylidine ponceau a pH 2,5. Pode ser notada uma grande quantidade de material XP-positivo, com natureza globular. Aumento: 400 x. **Fig.40:** E0. **Fig.41:** E1. **Fig.42:** E2. **Fig.43:** E4.



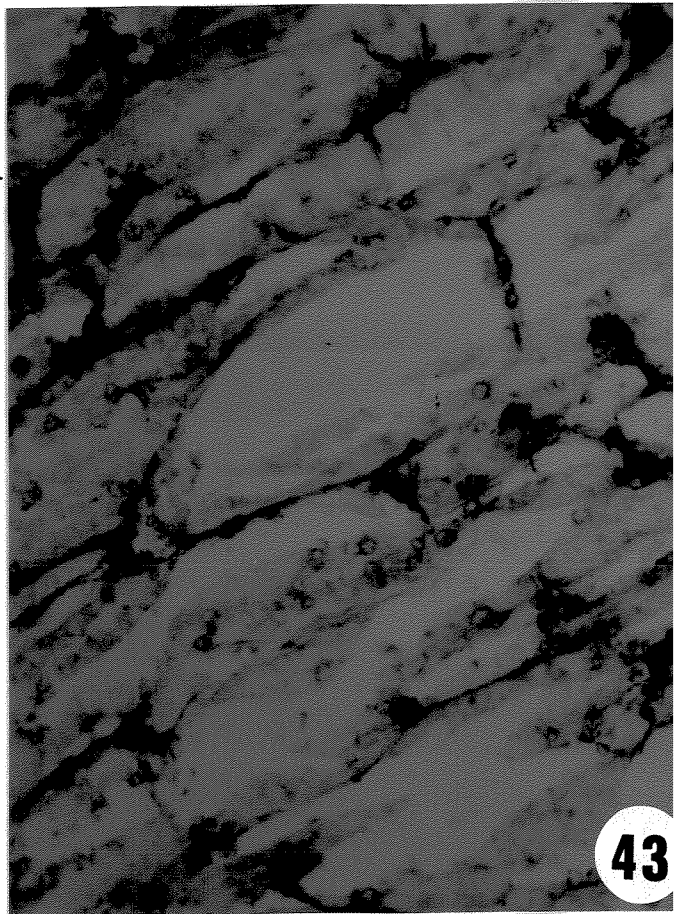
40



41



42



43

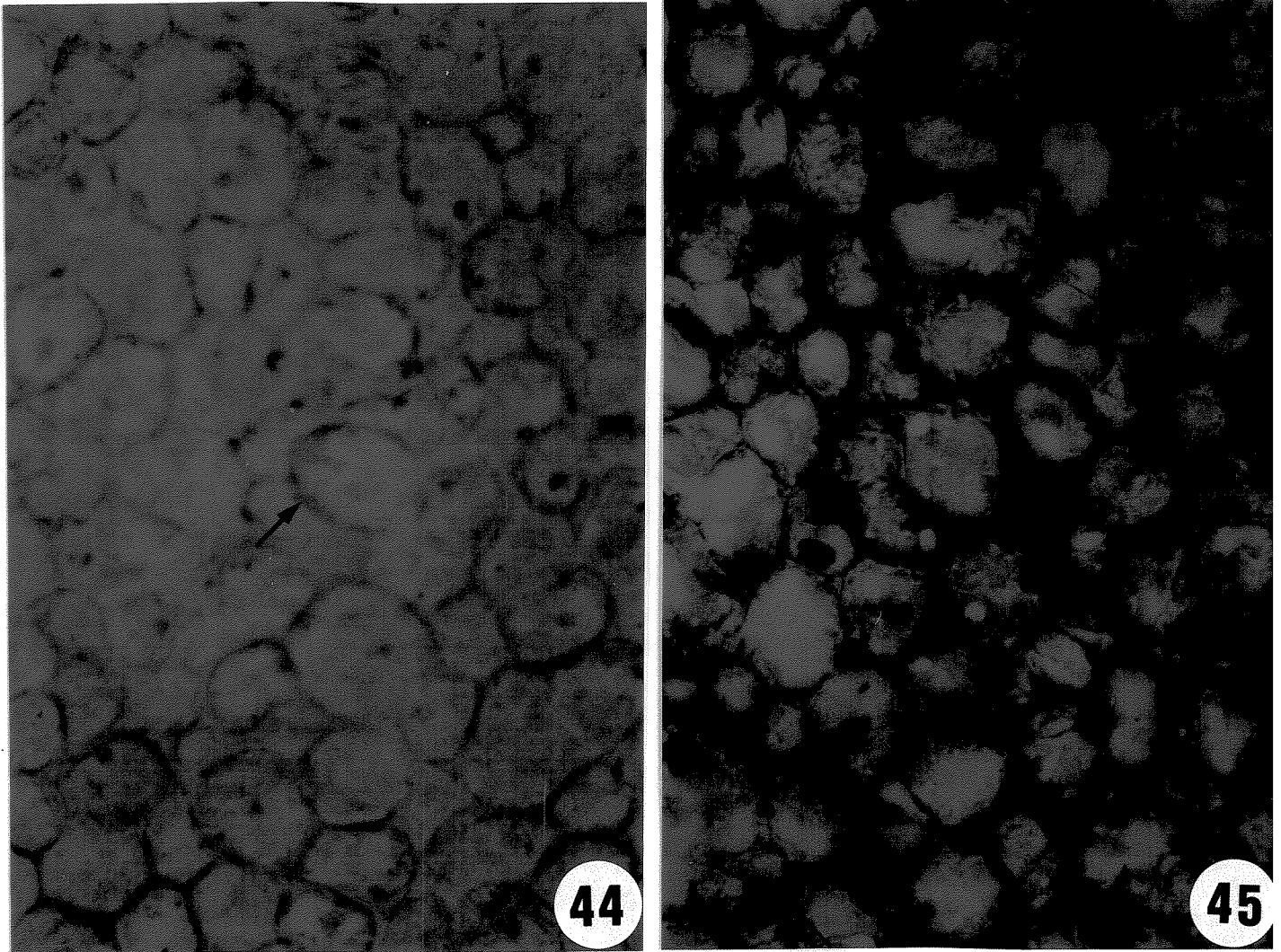
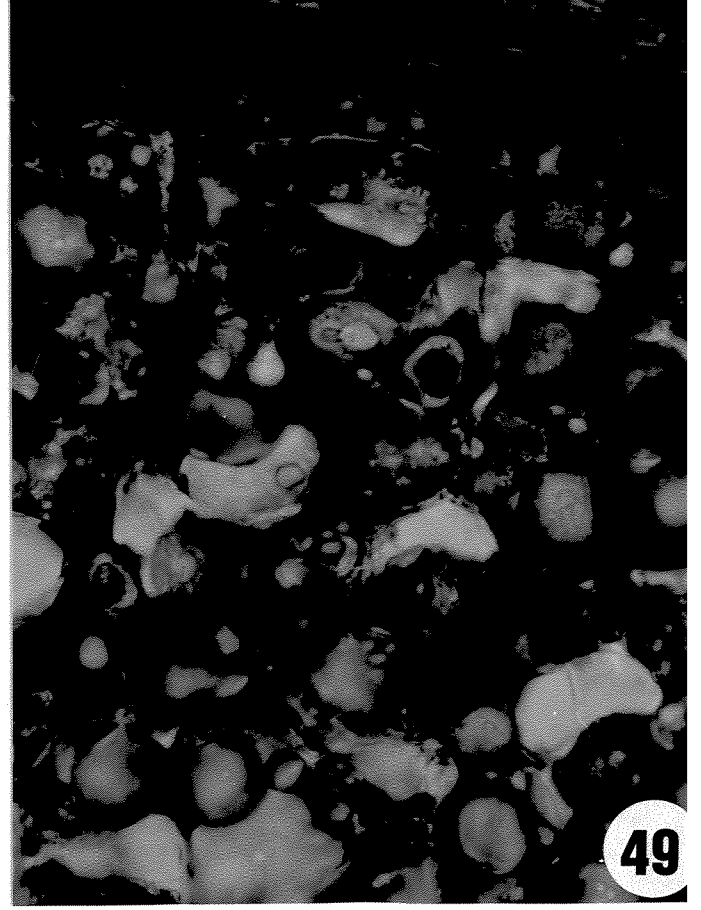
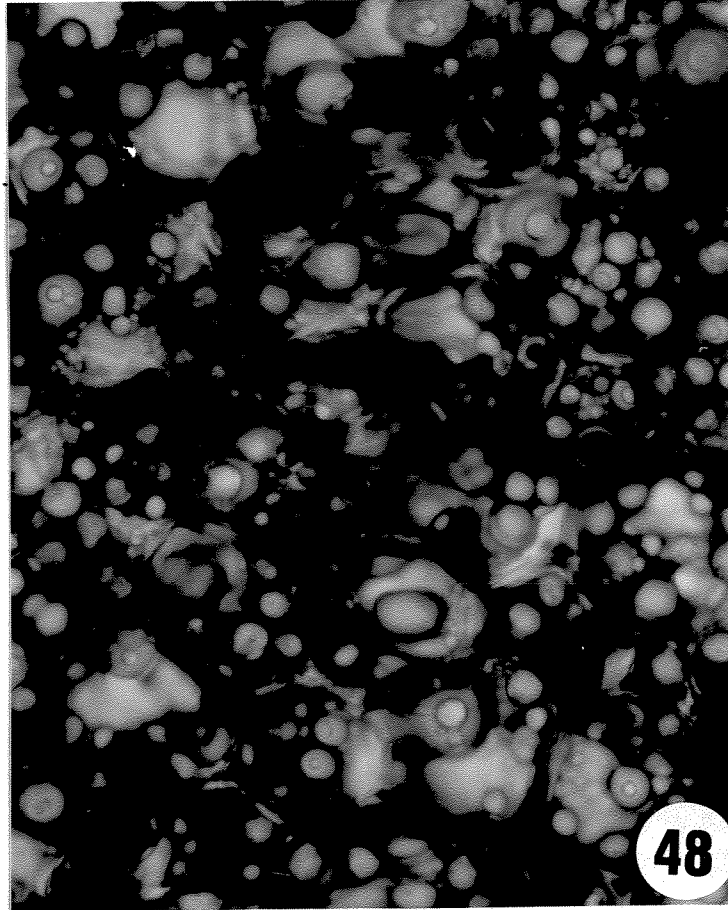
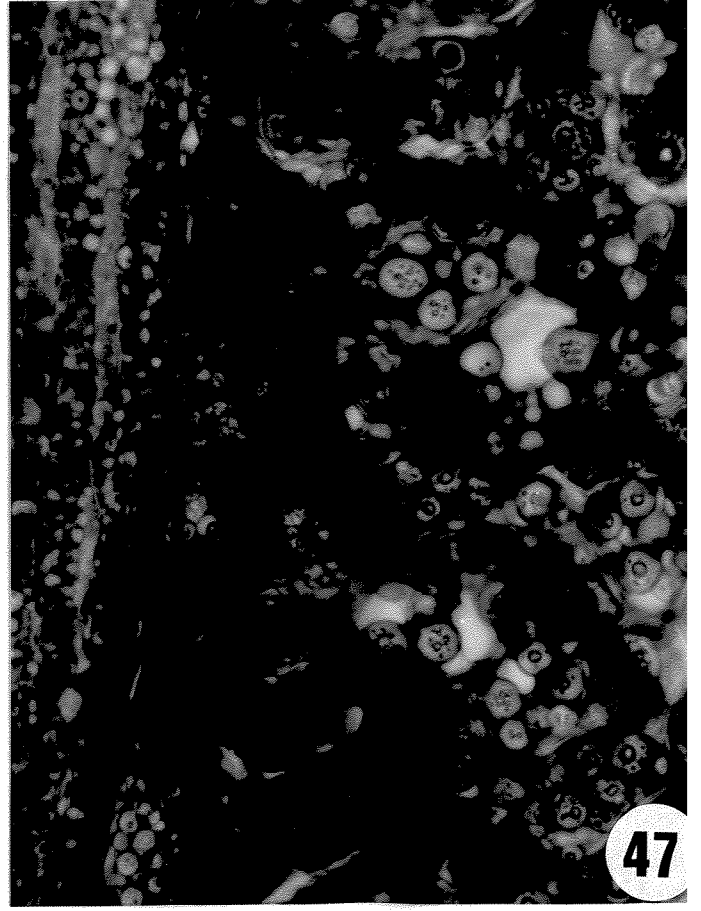
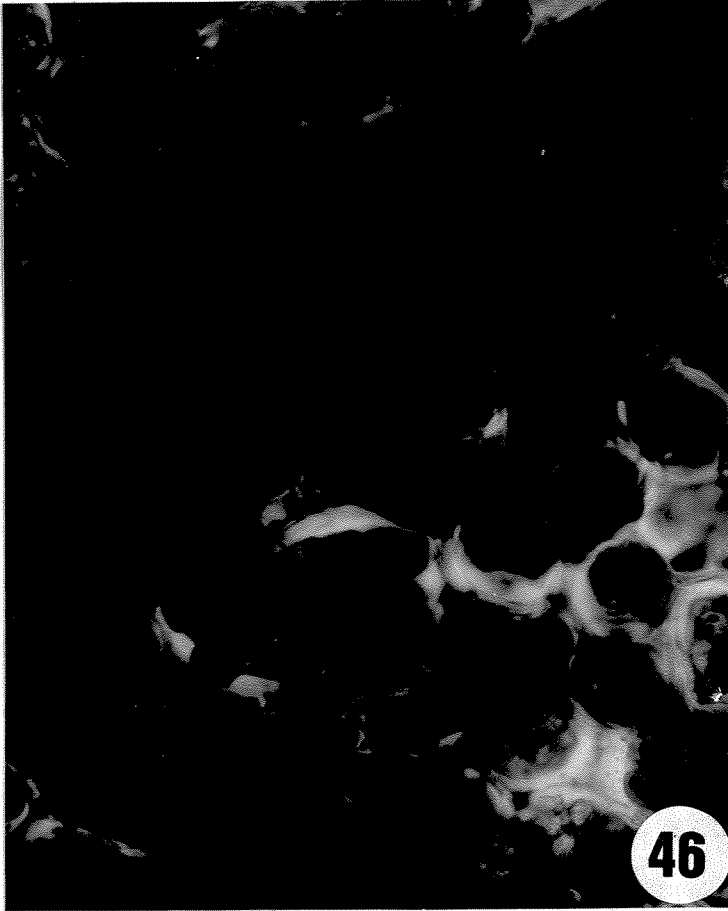


Fig.44-45: Cortes de cotilédones após digestão enzimática e coloração pelo xylydine ponceau a pH 2,5. Aumento: 400 X. **Fig.44:** Digestão pela pepsina. Praticamente todo o material citoplasmático foi removido, restando apenas uma fraca coloração nas paredes celulares (↑). **Fig.45:** Digestão pela tripsina. Nota-se uma menor remoção do material citoplasmático em relação ao corte anterior. As paredes celulares permanecem mais coradas e as proteínas nucleares (↑) parecem mais resistentes à extração por essa enzima.

Fig.46-49: Cortes de cotilédones corados pelo Sudan black. Nota-se a grande quantidade de material positivo ao corante. Em C0 (Fig.46), os lipídios recobrem todo o conteúdo citoplasmático, chegando a camuflar a presença das proteínas. A partir de C1 (Fig.47) podem ser vistos os corpos protéicos não corados, circundados de material fortemente SB-positivo. Fig.48: C2. Fig.49: C4.



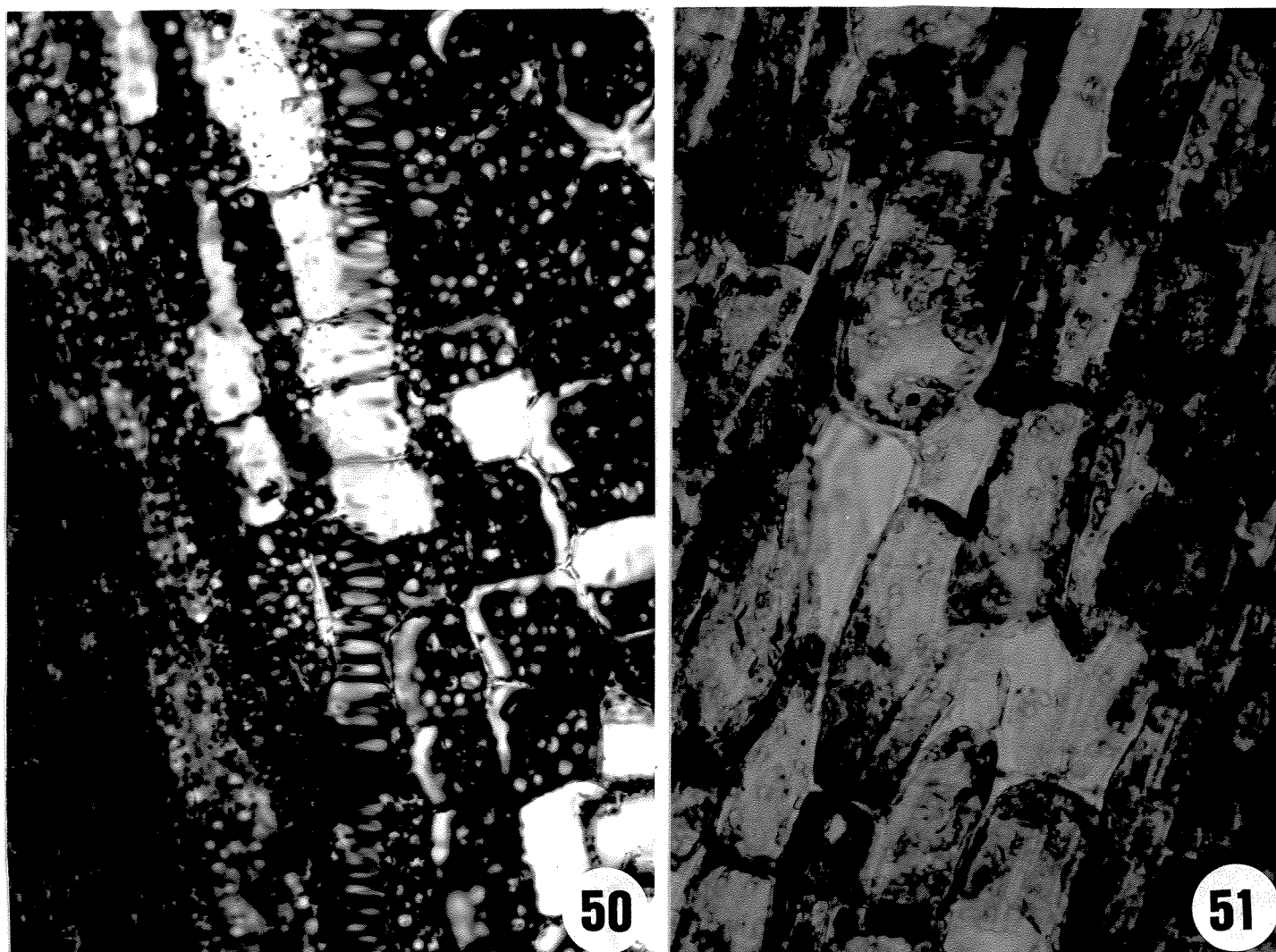


Fig.50-51: Cortes de eixos embrionários corados pelo Sudan black. Pode ser notado o grande conteúdo de material hidrofóbico presente nas células de forma geral. Aumento: 400 X. **Fig.50:** Eixo embrionário de semente quiescente. O material lipídico envolve os corpos protéicos presentes nessa estrutura. No interior dos vasos, houve uma reação fortemente positiva ao SB. **Fig.51:** Eixo hipocótilo radicular com 40mm de comprimento. Pode ser notada uma menor quantidade de material hidrofóbico quando comparado ao material de sementes quiescentes.

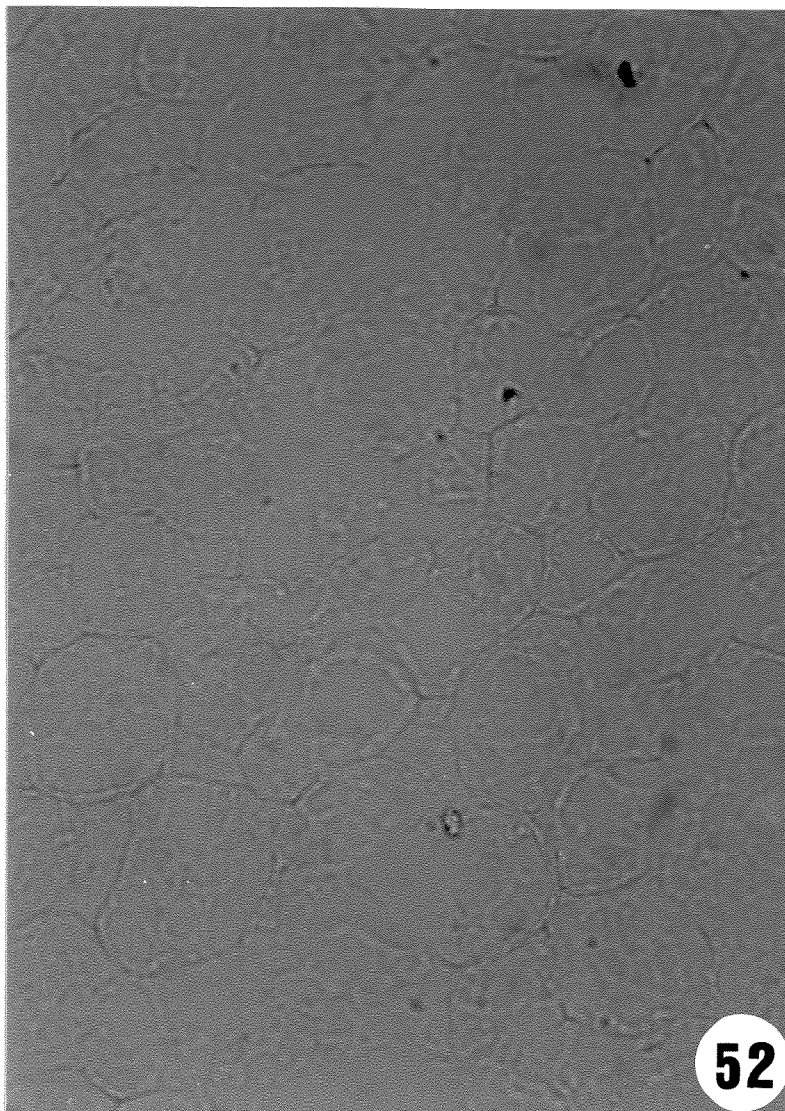


Fig.52: Controle do Método do P.A.S.. Corte de cotilédone submetido à coloração pelo Reativo de Schiff, sem prévia oxidação pelo ácido periódico. Nota-se que não há resposta positiva ao corante.

pelo ácido periódico (reação do PAS), as paredes celulares foram evidenciadas na cor magenta (Figuras 53-56). Em células cotiledonares de sementes em C0 (Figura 53), foram notados alguns grânulos PAS-positivos no interior das células. Esses grânulos aumentaram de tamanho e quantidade a partir de C1 e em C4 puderam ser observados em todas as células (Figura 54). Nos eixos embrionários o resultado foi inverso, sendo que em E0 puderam ser observados inúmeros grânulos PAS-positivos (Figura 55) que vão diminuindo em tamanho e quantidade até E4 (Figura 56).

7.2.5. Microscopia de polarização

Os cortes observados em microscópio de polarização mostraram a birrefringência das paredes celulares e dos grãos de amido. A quantidade de grãos birrefringentes em C0 (Figura 57) foi pequena e nos estádios subseqüentes foi notado o aparecimento de material granular e birrefringente em maior quantidade (Figura 58). Nos eixos embrionários o comportamento foi oposto pois as células do E0 apresentaram um conteúdo maior de material granular birrefringente (Figura 59) que vai diminuindo até o estágio E4 (Figura 60).

8. Determinação do conteúdo de lipídios e açúcares solúveis

- Sementes de Brasília

8.1 Conteúdo de lipídios

Sementes quiescentes provenientes de Brasília, apresentaram um alto teor de lipídios totais. Verificou-se que essa reserva representa quase 60% da matéria seca do eixo embrionário e 40% do cotilédone, para os experimentos realizados a partir do

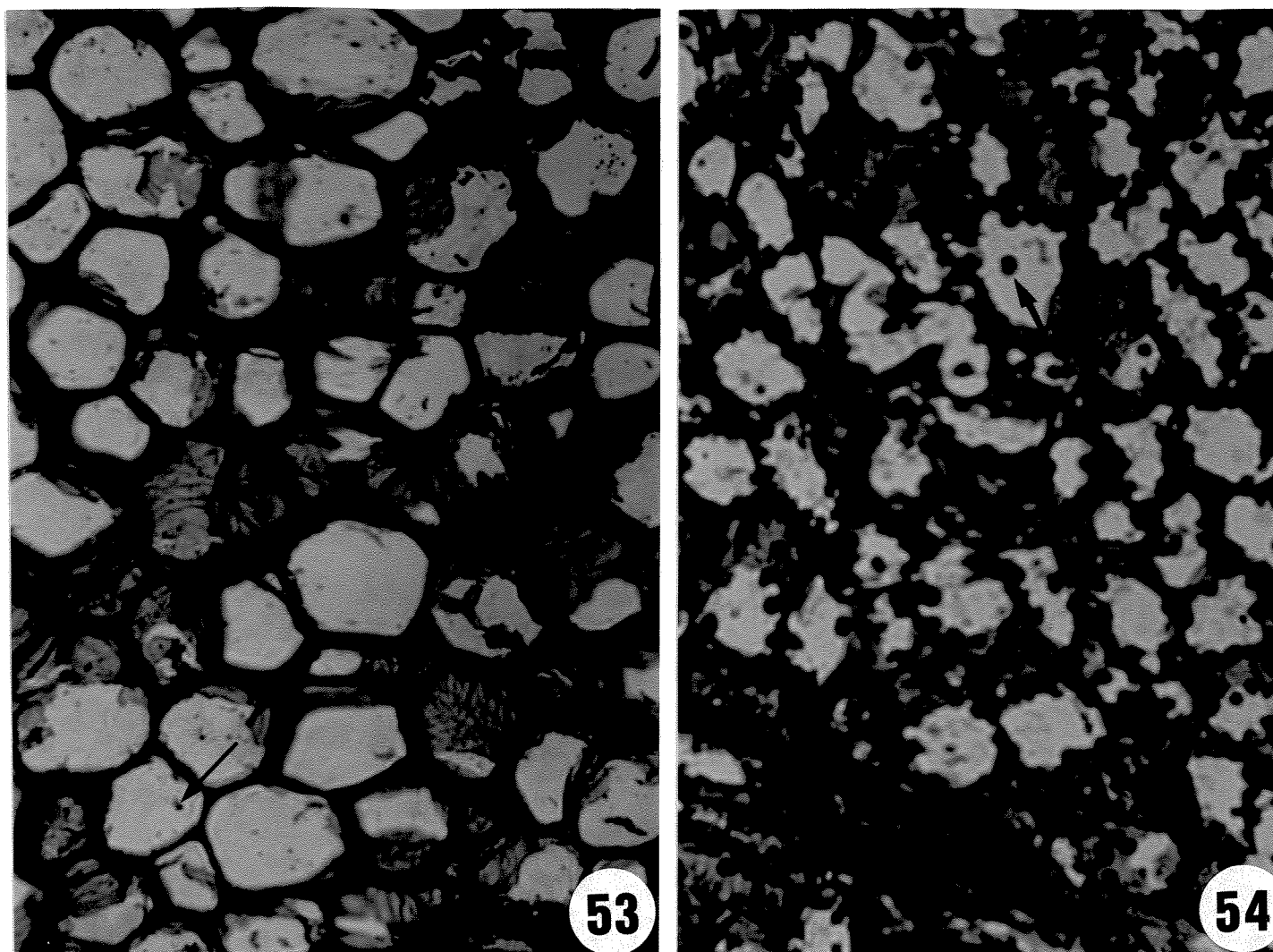


Fig.53-54: Cortes de cotilédones submetidos à Reação do P.A.S. Pode ser notada a coloração das paredes celulares e dos grãos de amido. **Fig.53:** Cotilédone de semente quiescente (C0). Poucos grãos de amido de pequeno tamanho, estão presentes no interior das células cotiledonares (↑). **Fig.54:** Cotilédone de semente em C4 onde podem ser notados inúmeros grãos de amido maiores do que em C0 e bem corados pelo método (↑).

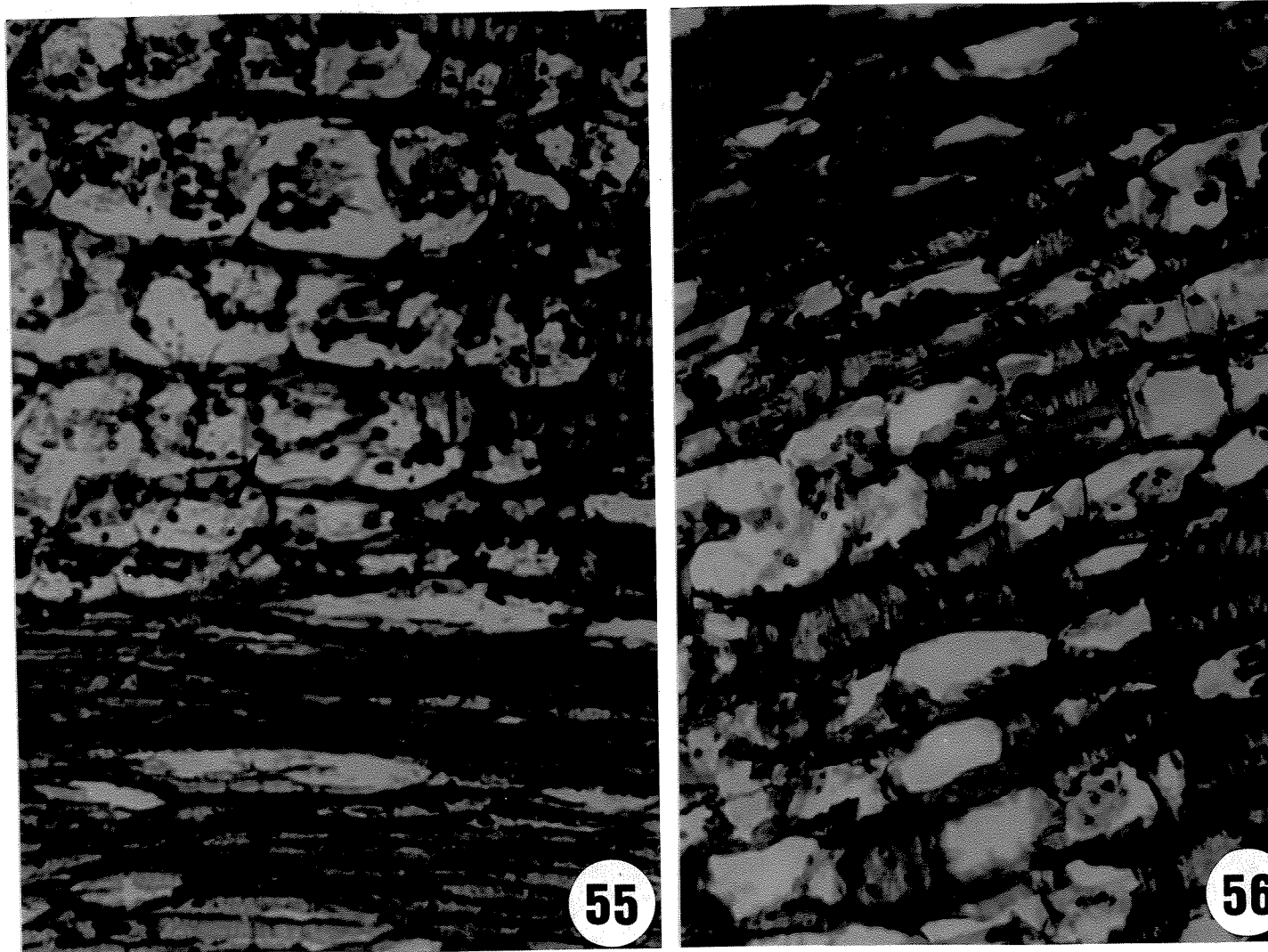


Fig.55-56: Cortes de eixos embrionários submetidos à Reação do P.A.S. Podem ser notadas as paredes celulares e os grãos de amido corados pelo Reativo de Schiff. Aumento: 400 X. **Fig.55:** Eixo embrionário em E0 (semente quiescente). Os grãos de amido apresentam-se em quantidade distribuídos pelas células do parênquima dessas estruturas (↑). **Fig.56:** Eixo embrionário em E4. Pode ser observada uma menor quantidade de grãos de amido (↑).



Fig.57-58: Cortes de cotilédones observados ao microscópio de polarização, com analisador e polarizador cruzados. Aumento: 400 X. **Fig.57:** Cotilédones em C0. Há uma pequena quantidade de grãos birrefringentes presentes nas células cotiledonares neste estágio. **Fig.58:** Cotilédones em C4. Nota-se um aumento na quantidade de grânulos birrefringentes com a característica forma em cruz de malta (†).

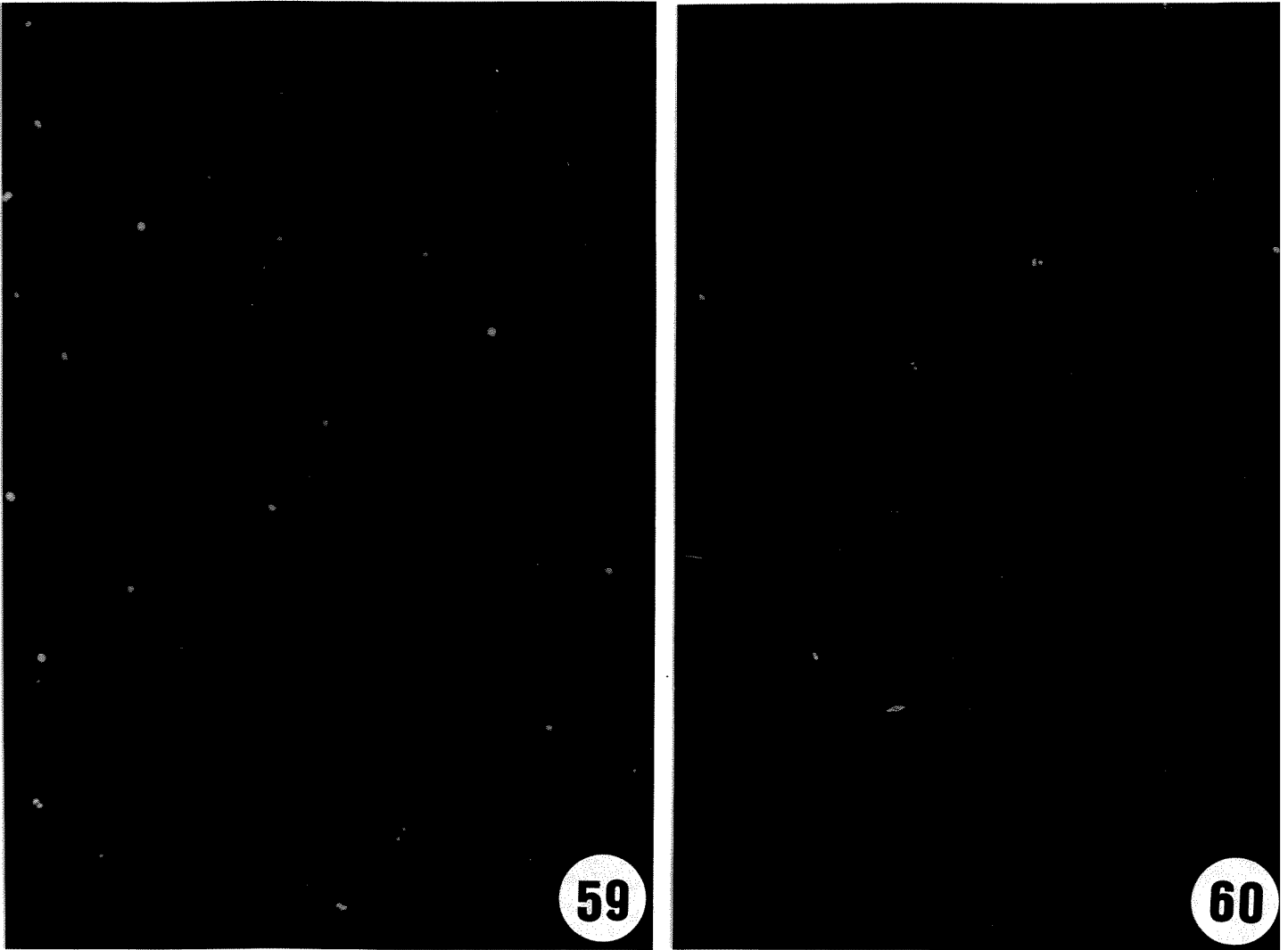


Fig.59-60: Cortes de eixos embrionários observados em microscópio de polarização, com analisador e polarizador cruzados. Aumento: 400 X. **Fig.71:** Eixos embrionários em E0. Pode ser notada uma grande quantidade de grãos birrefringentes com a forma característica de cruz de malta. **Fig.72:** Eixos embrionários em E4. Uma pequena quantidade de grânulos é ainda notada, mas muito menor do que em E0.

processamento de material fresco, foram obtidos os valores de 37% e 21% respectivamente (Tabela 7).

8.2 Conteúdo de açúcares solúveis em etanol

A maior parte das reservas de carboidratos solúveis em etanol das sementes analisadas é constituída de açúcares redutores. Quando a extração foi realizada a partir do material fresco, foram obtidos cerca de 100-110 mg/g, de açúcares totais em cotilédones ou eixos embrionários. Desse total, 75,6 mg/g nos eixos embrionários e 70,2 mg/g nos cotilédones eram açúcares redutores (Tabela 7). Quando a extração partiu do material seco, a eficiência do método foi a mesma daquela obtida para o material fresco nos cotilédones, obtendo-se valores ao redor de 96 mg/g de açúcares totais e 70 mg/g de açúcares redutores. Nos eixos embrionários, a extração e dosagem, a partir da massa seca, de açúcares totais foi de apenas 51,3 mg/g e 43,6 mg/g para os açúcares redutores (Tabela 7). Portanto, a eficiência da extração parece ter sido maior a partir do material fresco pelo menos nos eixos embrionários.

9. Determinação do conteúdo de açúcares, proteínas e lipídios

- Sementes de Itirapina

9.1. Conteúdo de lipídios totais

As sementes quiescentes (S0) de *D. miscolobium* provenientes de Itirapina apresentaram, como as de Brasília, um alto conteúdo de lipídios totais tanto no eixo embrionário quanto nos cotilédones. Nos eixos embrionários (E), foram obtidos valores da ordem de 35% da matéria fresca e 39% da matéria seca. Para os

Tabela 7 - Determinação do conteúdo de lipídios, açúcar total e açúcar redutor em eixo embrionário e cotilédones de sementes com massa padronizada quiescentes de *Dalbergia miscolobium*. Sementes procedentes de Brasília - DF. Os dados representam a média de 3 repetições. Os valores entre parênteses correspondem aos coeficientes de variação.

Extraído da massa seca (mg/g de massa seca)						
Órgão	lipídios	(cv %)	açúcar total	(cv %)	açúcar redutor	(cv %)
eixo	591,33	(2,60)	51,27	(31,72)	43,55	(17,80)
cotilédones	396,67	(4,50)	95,93	(7,03)	69,74	(16,90)

Extraído da massa fresca (mg/g de massa fresca)						
Órgão	lipídios	(cv %)	açúcar total	(cv %)	açúcar redutor	(cv %)
eixo	368,29	(20,40)	110,68	(7,70)	75,61	(7,50)
cotilédones	211,76	(14,47)	101,99	(4,20)	70,20	(21,20)

cotilédones (C), esses valores foram de 30% e 32% com relação à matéria fresca e seca, respectivamente (Tabela 8).

A partir de 48 horas (E1), devido ao processo de embebição, os valores relativos à massa fresca sofreram uma redução drástica, mantendo-se sem diferenças significativas até E2 (protrusão da radícula). A seguir, ocorreu uma nova redução quando do alongamento do eixo hipocótilo-radicular (E3 e E4), que apresentaram valores ao redor de 50 mg/g de matéria fresca (Tabela 8). Com relação à matéria seca, os valores obtidos para os eixos embrionários de sementes quiescentes não apresentaram diferenças significativas até E2. A partir desse estágio, verificou-se uma redução no conteúdo lipídico relativo, que passou a apresentar valores ao redor de 25% da matéria seca em E4 (Tabela 8).

Nos cotilédones observou-se o mesmo comportamento quando considerada a matéria fresca, com uma forte redução entre C0 e C1. Entretanto, após esse estágio, os resultados se mantiveram constantes até C4 (Tabela 8). Com relação à matéria seca, os conteúdos de lipídio não se alteraram significativamente até C3. Apenas no último estágio analisado, os valores obtidos foram significativamente menores, correspondendo a 23% da matéria seca (Tabela 8).

9.2. Composição de ácidos graxos

A composição dos ácidos graxos feita por GLC revelou a presença significativa dos ácidos linoléico, linolênico, esteárico+oléico e palmítico nos eixos embrionários (Tabela 9). A ocorrência desses ácidos foi detectada em todos os estádios analisados e notou-se um aumento aparente no conteúdo de ácido palmítico a partir de E0 até E4.

Tabela 8 - Determinação do conteúdo de lipídios totais em eixo embrionário e cotilédones de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium* por gravimetria, em diferentes estádios de desenvolvimento. Sementes procedentes de Itirapina - SP. Os dados representam a média de 9 repetições. Extrações feitas a partir de matéria fresca.

Expresso em mg/g de massa fresca					
Órgão	Estádios				
	0	1	2	3	4
eixo	342,81 a	158,72 b	89,41 bc	59,37 c	48,31 c
cotilédones	298,96 a	122,12 b	118,84 b	108,90 b	86,06 b

Expresso em mg/g de massa seca					
Órgão	Estádios				
	0	1	2	3	4
eixo	392,51 a	396,72 a	447,06 a	296,83 b	241,56 b
cotilédones	322,50 a	330,06 a	323,88 a	294,32 a	232,59 b

Valores acompanhados da mesma letra não apresentam diferenças significativas em nível de $P = 0,05$ (Tukey).

Tabela 9 - Composição relativa de ácidos graxos totais em eixos embrionários e cotilédones de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium* por GLC. Sementes procedentes de Itirapina - SP. Dados obtidos a partir de 2 repetições dos cromatogramas.

Eixos embrionários (E)					
Composição de ácidos graxos (%)	Estádios				
	E0	E1	E2	E3	E4
ác. láurico	–	–	1,23	0,98	–
ác. mirístico	–	–	0,46	0,59	0,21
ác. palmítico	7,50	10,60	12,75	14,60	21,40
ác. esteárico + oleico	6,90	12,23	11,72	12,64	10,33
ác. linoleico	42,06	64,64	56,74	52,03	38,90
ác. linolênico	40,82	12,53	13,79	16,69	29,14
ác. araquídico	–	–	1,51	–	–

Cotilédones (C)					
Composição de ácidos graxos (%)	Estádios				
	C0	C1	C2	C3	C4
ác. láurico	–	0,40	0,43	0,24	0,31
ác. mirístico	–	0,19	0,26	0,14	0,23
ác. palmítico	11,77	12,86	12,82	12,39	11,50
ác. esteárico + oleico	14,92	12,84	17,09	11,73	13,08
ác. linoleico	69,16	71,69	61,66	70,07	69,80
ác. linolênico	–	–	1,71	–	–
ác. araquídico	–	0,36	1,37	1,62	0,83
ác. decosahexanóico	–	–	1,97	1,39	1,60

Em cotilédones de sementes quiescentes, foram detectadas quantidades mensuráveis de ácido palmítico, esteárico-oléico e linoléico. Destes, o ácido linoléico representou 69% da composição lipídica total do órgão. Durante a germinação, apesar da diminuição do conteúdo lipídico, a proporção desses ácidos praticamente não se alterou nos cotilédones. Tanto em C0 quanto em C4 não foi detectada a presença de ácido linolênico (Tabela 9).

9.3. Conteúdo de proteínas

As dosagens de proteínas em todos os estádios analisados encontram-se descritas na Tabela 10. Os cotilédones de sementes quiescentes apresentaram uma quantidade de proteínas em torno de 15% de sua massa fresca. Esse valor, diminuiu em C1 para cerca de 9%, mantendo-se inalterado até C4 (Tabela 10).

Com relação à matéria seca, foram obtidos valores da ordem de 16% de proteínas para os cotilédones de sementes quiescentes. Esse valor sofre um aumento significativo em C1, mantendo-se sem diferenças significativas até C4. Pode-se entretanto verificar, uma tendência à diminuição dessa reserva a partir de C1 (Tabela 10).

9.4. Conteúdo de amido

As determinações do conteúdo de amido, revelaram uma diminuição desse composto entre C0 e C1. A partir desse estádio, os valores permanecem inalterados, sofrendo um aumento significativo a partir de C3, culminando com valores em média iguais a 17,3 mg de amido/grama de tecido fresco em C4 (Tabela 10).

Tabela 10 - Determinação do conteúdo de proteínas, amido e açúcares solúveis em cotilédones de sementes com massa padronizada de *Dalbergia miscolobium* procedentes de Itirapina - SP. Dados correspondem à média de 9 repetições. Extrações feitas a partir de matéria seca.

mg/g de massa fresca						
Estádios	Proteínas		Amido		Açúcares livres	
C0	148,80	a	21,90	a	73,40	a
C1	93,20	b	13,00	bc	24,60	b
C2	87,40	b	11,00	c	25,60	b
C3	87,90	b	14,60	cd	19,80	bc
C4	86,70	b	17,30	d	15,30	c

mg/g de massa seca						
Estádios	Proteínas		Amido		Açúcares livres	
C0	160,00	a	23,50	a	78,90	a
C1	251,90	b	35,20	bc	66,60	ab
C2	236,40	b	29,70	b	69,20	ab
C3	237,50	b	39,40	c	53,60	bc
C4	234,30	b	46,80	d	41,40	c

Valores acompanhados da mesma letra não apresentam diferenças significativas em nível de $P = 0,05$ (Tukey).

O conteúdo de amido em relação à massa seca, foi igual a 23,5 mg/g nos cotilédones de sementes quiescentes. Esse valor aumentou, mantendo-se constante nos estádios C1-3, tendo em seguida ocorrido novo aumento em C4 que apresentou valores próximos a 5% (Tabela 10).

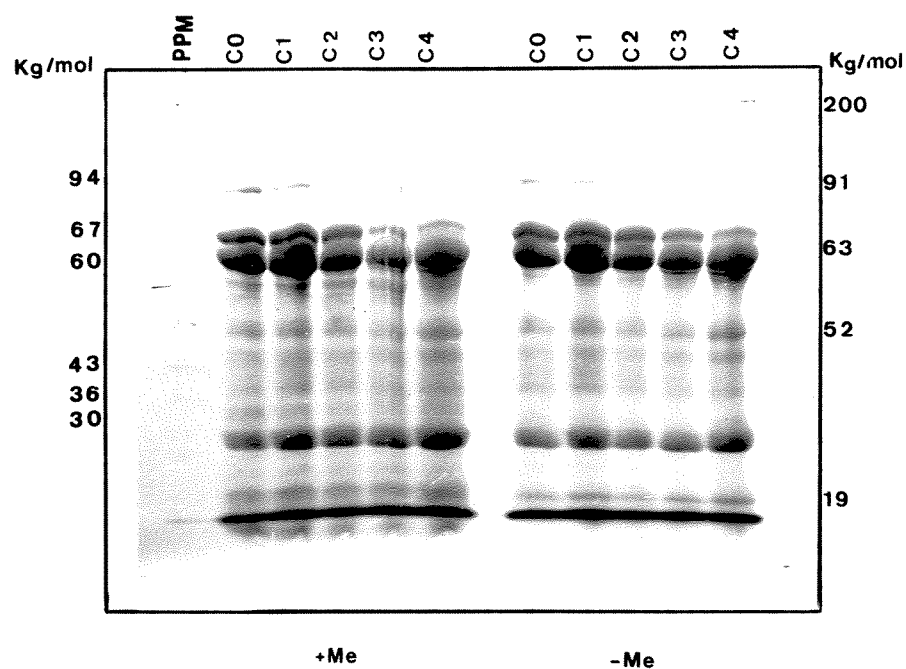
9.5. Conteúdo de açúcares solúveis

O conteúdo de açúcares solúveis sofreu uma redução entre C0 e C4 tanto quando considerada a matéria fresca quanto seca (Tabela 10). No primeiro caso, além da redução drástica entre C0 e C1, pode ser observada uma diminuição desses açúcares a partir de C3. Com relação à matéria seca, os valores apresentaram-se praticamente constantes até C3, tendo sido detectada uma redução significativa em C4 quando esses compostos apresentaram praticamente a metade dos valores obtidos nos cotilédones das sementes quiescentes (Tabela 10).

10. Eletroforese

As amostras analisadas em SDS-PAGE na presença ou ausência de 2-Mercaptoetanol (2-Me) apresentaram poucas diferenças. Nas amostras sem 2-Me foi possível verificar a presença de material protéico com massa molecular aparente (Mr) acima de 200 Kg/mol, que não conseguiram penetrar no gel. No entanto, ocorreu o aparecimento de várias proteínas nas faixas entre 94 e 67 Kg/mol e 60 e 36 Kg/mol. Na ausência ou presença de 2-Me detectaram-se proteínas com Mr entre 60 e 52 Kg/mol. Proteínas com 91, 71, 63, 52, 24.5 e 19 Kg/mol apareceram com e sem 2-Me. Analisando os estádios, proteínas com 91, 87 e 80 Kg/mol ficaram mais

evidentes nos estádios 0, 1 e 2. Isso não ocorreu entretanto para as proteínas com 71 e 63 Kg/mol que apresentaram bandas bem evidentes em todos os estádios (Fig.61).



61

Fig.61: SDS-PAGE (10% de poliacrilamida) das amostras de C0 a C4 tratadas com e sem 2-Mercaptoetanol. Condições: 25mA durante 4 horas. Coloração: Coomassie Blue. Padrão de peso molecular: 94000 (fosforilase b), 67000 (albumina bovina), 60000 (sub-unidades da catalase), 43000 (ovalbumina), 36000 (sub-unidade de lactato desidrogenase) e 30000 (anidrase carbônica).

Discussão

1. Aspectos fisiológicos da germinação e crescimento inicial

Uma das grandes problemáticas em se trabalhar com espécies selvagens, é a dificuldade encontrada para a comprovação estatística dos dados obtidos, devido à grande variação dos mesmos. Quase todos os trabalhos realizados com as espécies de cerrado apontam esse problema (Arasaki, 1988; Godoy & Felipe, 1992a; Sasaki, 1991). Teoricamente, altos graus de variabilidade seriam essenciais para garantir a sobrevivência e perpetuação de uma população (Allard, 1965). Segundo o modelo "balanceado" de estrutura genética em populações, não existe um tipo único de alelo selvagem e sim um "pool" genético na população, distribuído dentro da maioria dos alelos em frequências moderadas. Assim, a combinação dos mesmos genes de maneira diferente, associada às condições ambientais, poderiam conduzir diferentes respostas fenotípicas nos indivíduos dentro de uma população e conseqüentemente, uma grande variabilidade genética nas populações naturais (Dobzhansky et al., 1977; Solbrig, 1980).

Arasaki (1988), em seu estudo sobre o crescimento inicial de *Kielmeyera coriacea*, encontrou coeficientes de variação de até 47,39% para altura, de até 63,52% para massa fresca e de até 83,59% para massa seca nas medidas para raiz e parte aérea. Essas variações segundo o autor poderiam ser explicadas tanto pela variabilidade genética como por plasticidade fenotípica. Tal problema só poderia ser contornado diante da utilização de um número grande de amostras o que muitas vezes torna impraticável a determinação pretendida. Ainda segundo o autor, os valores altos dos coeficientes encontrados seriam devidos também às grandes

variações ambientais que ocorrem dentro dos cerrados. Esta variabilidade genética é considerada uma estratégia utilizada pelas populações para garantir a sobrevivência da espécie e torna-se um problema considerável quando se procura estudar processos fisiológicos dentro de populações naturais.

No presente estudo com *D. miscolobium*, pode-se verificar a ocorrência dessa variabilidade na medida em que as determinações de massa fresca e massa seca iniciais apresentaram grandes variações. Isso ocorreu tanto para as sementes provenientes de Brasília, quanto para aquelas provenientes de Itirapina.

A comparação entre sementes de diferentes procedências no presente trabalho, foi possível devido a termos encontrado em determinada fase do mesmo, maiores dificuldades para a obtenção de material de Brasília-DF, não só pela diminuição da produção de sementes no período, mas também porque o cerrado de Itirapina, sendo em São Paulo, facilitou a obtenção de material para a continuidade dos estudos. Assim sendo, as análises feitas com as sementes procedentes de Brasília-DF, nos serviram de base para as investigações citoquímicas e bioquímicas posteriormente feitas com as sementes de Itirapina-SP.

Os fisiologistas que trabalham com sementes, definem germinação como um evento que tem início com a embebição e termina quando a radícula alonga ou emerge através do tegumento (Bewley & Black, 1985; Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989).

Uma semente pode, mesmo sendo viável, não germinar ou crescer devido a vários fatores. Estes podem ser de caráter tanto interno quanto externo. Uma condição interna por exemplo, é a maturidade morfológica do embrião que o torna capaz de germinar. A germinação de sementes de plantas de espécies selvagens (não cultivadas) é freqüentemente limitada por essa ou alguma outra condição interna, enquanto que, nas chamadas espécies domésticas ou cultivadas, a limitação se restringe, muito mais à ausência de umidade e/ou temperatura inadequada. A distinção entre essas duas situações se faz através da denominação das sementes em

dormentes (primeiro caso) e quiescentes (segundo caso). Assim, sementes quiescentes são aquelas que não germinam quando da ausência das condições normalmente requeridas e sementes dormentes, aquelas que não germinam devido tanto a condições internas, quanto a exigências de condições externas específicas (Salisbury & Ross, 1992).

Morfologicamente, a germinação é a transformação de um embrião em uma plântula. Fisiologicamente, a germinação é a retomada do metabolismo e crescimento. Bioquimicamente, a germinação é a diferenciação seqüencial de vias sintéticas e oxidativas. Essencialmente, a germinação é o retorno do eixo embrionário de um estado temporariamente suspenso durante a quiescência ou dormência envolvendo eventos anatômicos ou morfológicos, genéticos, metabólicos e hormonais (Jann & Amen, 1977).

Nos nossos experimentos de germinação verificamos que *Dalbergia miscolobium* nãoapresenta qualquer tipo de dormência e apresenta um alto poder de germinação, o que revela que as condições de germinação utilizadas neste trabalho, foram adequadas para essa espécie. Isso corrobora a opinião de Ferri (1960) de que o poder germinativo de plantas do cerrado é evidente na natureza e altíssimo, em laboratório, chegando até a 100% em certas amostras. Além disso, também estão de acordo com os resultados obtidos para a mesma espécie, e nas mesmas condições, em trabalhos anteriores (Arasaki e Felipe, 1987; Sasaki e Felipe, 1992).

O processo de embebição da semente é o primeiro passo para que ocorra a germinação. Na maioria das sementes ele apresenta três fases. A primeira, se caracteriza pela rápida absorção da água e depende principalmente das condições ambientais e da composição química da semente; na segunda não ocorre aumento na massa fresca pois a semente está em equilíbrio osmótico com o meio; na terceira fase se dá a absorção metabólica da água que coincide com a protrusão da radícula (Bewley & Black, 1985).

Quanto à embebição, verificou-se que a absorção inicial de água nessa espécie compreende as primeiras 5-6 horas, tanto para as sementes de Brasília-DF como para as de Itirapina-SP. Após esse período, houve uma estabilização que durou cerca de 36 a 48 horas, quando no caso das sementes de Brasília-DF já havia ocorrido o início da protrusão radicular. Esses resultados confirmaram aqueles obtidos por Arasaki & Felipe (1987) para sementes desta espécie e com a mesma procedência. No entanto, com as sementes de Itirapina observou-se que, apesar das sementes já estarem completamente embebidas, a germinação só ocorreu por volta do quarto dia de embebição. Verificou-se com isso que ambas as sementes, desde que em condições favoráveis, não apresentaram nenhuma restrição ao processo de embebição, sendo relativamente mais rápido o comportamento germinativo das sementes de Brasília-DF. Possivelmente essa diferença no padrão de germinação se deva, em alguns casos, à necessidade de um tempo maior nas sementes da duração da terceira fase da embebição quando se tem a absorção metabólica da água. Isto pode estar condicionado a alguma exigência ou perfil de atividade metabólica adquirido devido às condições ambientais durante a maturação da semente, e/ou de alguma estratégia após dispersão do fruto para garantir a sobrevivência da espécie. Uma hipótese interessante decorrente do presente estudo é que esse comportamento pode estar relacionado à quantidade de lipídios presentes na semente. Sementes provenientes de Brasília apresentam um conteúdo maior dessa reserva, o que pode significar a necessidade de uma menor quantidade de água metabolicamente absorvida para ativar as vias metabólicas necessárias para a germinação.

O tamanho e a forma das sementes em geral, são extremamente variáveis. Eles dependem da forma do ovário, das condições sob as quais a "planta mãe" cresceu durante a formação da semente e obviamente da espécie em questão. Outros fatores que determinam o tamanho e a forma das sementes são o tamanho do embrião, a quantidade de endosperma presente e do quanto outros tecidos participam da estrutura da semente. A variabilidade na forma existe dentro de uma mesma

espécie e é referida como polimorfismo. Uma característica de sementes polimórficas é que elas diferem não apenas na forma ou na cor, mas também em seu comportamento na germinação ou dormência (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989).

A determinação da massa de sementes quiescentes de *D. miscolobium* de ambas as procedências e suas respectivas curvas de distribuição revelaram uma grande faixa de variação para este parâmetro. Diferenças se verificaram no sentido de que as sementes de Brasília-DF apresentaram, de maneira geral, valores menores de massa fresca (média ao redor de 85 mg), ao passo que nas sementes de Itirapina-SP este valor foi maior (116 mg). Sementes da mesma espécie mas provenientes do cerrado de Piraçununga-SP, apresentaram valores de massa fresca em torno de 120 mg (Mayworm, 1994), indicando então um padrão de massa médio diferente para a espécie, dependendo de sua procedência.

Um elemento importante da estratégia reprodutiva de uma planta ou espécie, consiste na partição entre a produção de muitas sementes pequenas, que dependeria das exigências para a dispersão, ou poucas sementes grandes, que estaria condicionada aos requerimentos para o estabelecimento da plântula. Uma das mais efetivas adaptações para o sucesso no estabelecimento das plântulas de uma espécie, seria possuir uma semente grande que a proveria com maiores quantidades de compostos de reserva, armazenados nos seus tecidos. Muitos estudos demonstram que plântulas originadas de sementes grandes, seguramente mantêm uma certa vantagem sobre as plântulas de sementes menores, principalmente em condições desfavoráveis (Fenner, 1985).

Com a finalidade de se evitar um possível efeito da quantidade de reservas e do aspecto (cor), devido à grande variação que foi detectada nas sementes de *D. miscolobium*, estabeleceu-se um padrão de massa e cor para as mesmas. Pelo estudo de germinação realizado, verificou-se que não houve influência da massa ou cor na germinação das sementes de Brasília-DF ou de Itirapina-SP. A característica da semente ser clara ou escura é comum entre as várias espécies do cerrado e em

algumas delas estaria associada a ocorrência de dormência por impermeabilidade na casca (Felippe, 1990; Godoy e Felippe, 1992b). Portanto, a padronização, limitou-se a estabelecer uma faixa de massa na qual foi centrada a seleção de sementes para o estudo do metabolismo das reservas.

Pelos resultados obtidos, foi estabelecida uma faixa de massa que abrangesse o maior número de sementes por amostragem, o que facilitou a obtenção de material suficiente para o estudo. Com a padronização da massa do eixo embrionário, verificou-se que ocorre uma pequena variação, e que os resultados foram semelhantes para os dois lotes de sementes, significando que independentemente da origem e do tamanho dos cotilédones, foi possível estabelecer-se um padrão médio de massa para os embriões, ao redor de 2,6 mg.

Portanto, as variações no conteúdo de reservas da semente estão, provavelmente, na dependência do tamanho dos cotilédones. Assim sendo, para a faixa de massa definida, as variações encontradas seriam as variações de massa dos cotilédones, que ficariam restritas ao padrão estabelecido. Além disso, a padronização da massa do eixo embrionário visou também o estudo do seu modelo de crescimento.

Em experimentos realizados em algumas espécies como cevada, ervilha e feijão, foi possível estabelecer-se teoricamente um modelo de crescimento bifásico do eixo embrionário, com base nas alterações na massa seca, massa fresca e comprimento desta estrutura (Brown, 1972; Paulilo, 1980).

Para a cevada, a primeira fase da germinação ocupa as 48 horas iniciais, onde não ocorre aumento na massa seca do eixo, mas onde a massa fresca aumenta exponencialmente. A taxa de aceleração para a massa fresca na segunda fase seria um pouco maior que na primeira. Para a ervilha, nas primeiras 24 horas de embebição não existe alteração aparente na massa seca, mas após esse período ela aumenta rápida e exponencialmente. O comprimento do eixo aumenta exponencialmente nas duas fases, porém a taxa de aceleração é maior durante a

segunda. Em ambos os casos, a primeira fase é completada antes que a translocação de nutrientes para o eixo se inicie. Assim, pareceria claro que as diferenças no desenvolvimento do eixo seriam uma consequência de alterações nas condições ambientais. Foi sugerido que a aceleração verificada na segunda fase é devida a uma aceleração no suprimento de nutrientes a partir do tecido de reserva (Brown, 1972). Recentemente, foi observado o crescimento do embrião em termos de massa seca, durante as primeiras 48 horas de embebição em sementes de feijão. Verificou-se que nas primeiras 20 horas não houve aumento de massa seca do embrião. Após esse período, foi observada uma mudança marcante no crescimento do mesmo, que teve sua massa seca aumentada exponencialmente. Durante esse tempo os cotilédones apresentaram apenas uma ligeira diminuição na massa, indicando que a hidrólise das reservas ainda estava se iniciando (Paulilo, 1980).

Os estudos com *D. miscolobium* mostraram que apesar de também ser uma leguminosa, esta espécie não apresenta esse padrão de crescimento para seu eixo embrionário, pelo menos no mesmo período, tanto no material proveniente de Brasília-DF, quanto no de Itirapina-SP. No material procedente de Brasília-DF, foram verificadas alterações na massa fresca. Porém, o aumento observado não foi acompanhado pelo aumento de massa seca até as 72 horas de embebição. Aumentos significativos verificados na massa fresca até esse período provavelmente foram devidos ao simples alongamento celular acarretado pela entrada de água.

Segundo Jann & Amen (1977), estudos sobre as alterações na germinação em embriões de sementes quiescentes de dicotiledôneas, revelaram que as células do eixo embrionário, durante as primeiras horas de embebição, assemelham-se às células de embriões imaturos em desenvolvimento mais do que às de plântulas em crescimento ativo.

A iniciação da divisão celular do embrião em sementes quiescentes em germinação é variável. A divisão celular algumas vezes começa antes da emergência da radícula, como por exemplo, em *Phaseolus vulgaris*, enquanto que em outras

espécies, como por exemplo *Raphanus sativa*, o alongamento celular é suficiente para que a radícula rompa a casca da semente, começando apenas mais tarde a divisão celular. Em *Fraxinus ornus* a divisão celular do embrião, alongamento e toda a diferenciação acompanham a germinação e crescimento em tão estreito intervalo, que é difícil determinar sua contribuição independente (Jann & Amen, 1977). Resultados semelhantes foram observados para *Pinus thumbergii*, *Pinus lambertiana*, *Zea mays* e cevada (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989).

Em nossos estudos com as sementes de Brasília-DF, somente após 72 horas de embebição, foi possível observar o aumento da massa seca do eixo embrionário, acompanhando o aumento de massa fresca, tanto na luz quanto no escuro. Esse fato não foi acompanhado pela diminuição da massa seca dos cotilédones até o 15º dia de germinação na luz e até o 12º dia de germinação no escuro. Portanto, não foi possível associar o início das alterações de massa seca do eixo com o início da mobilização de reservas de nutrientes dos cotilédones, pelo menos até o período citado. Possivelmente, pequenas alterações na massa seca dos cotilédones possam não ter sido detectadas quando do início do aumento da massa seca do eixo, devido às grandes diferenças proporcionais de massa entre estes dois órgãos. Pequenos incrementos na massa seca do eixo seriam mais significativos do que pequenas diminuições na massa seca dos cotilédones.

Quanto à fotossíntese, verificou-se que a sua interferência na variação de massa do embrião é pequena, ou quase nenhuma, visto que os resultados na luz e escuro não mostraram diferenças marcantes entre os dois tratamentos, pois os incrementos de massa seca ocorreram praticamente com os mesmos intervalos (3 dias) a partir de seis dias de embebição e até o 15º dia. Logo, até 6 dias de embebição, os aumentos de massa fresca de eixo e cotilédones, são devidos principalmente à absorção de água e ao alongamento celular. No entanto, poderiam estar ocorrendo alterações metabólicas intrínsecas ao próprio eixo, sem que pudessem ser detectadas alterações na sua massa seca.

Os resultados obtidos com as sementes de Itirapina-SP, mostraram no período de 0 a 12 dias, um maior número de incrementos de massa fresca para o eixo embrionário e com menores tempos de embebição. Os aumentos na massa seca ocorreram acompanhando a massa fresca também a partir do 6º dia de embebição, ou seja, dois dias após a germinação. Isso ocorreu, sem ter sido no entanto, acompanhado de diminuição na massa seca dos cotilédones, o que no mesmo período e condições também se verificou com o material procedente de Brasília. Isso poderia demonstrar uma certa autonomia inicial do eixo em relação aos cotilédones, em termos do consumo de suas reservas nos primeiros dias de embebição. No entanto, existe a possibilidade das diferenças proporcionais nas massas não permitirem detecções quantitativas notáveis, uma vez que, sementes de Itirapina-SP apresentaram massa cotiledonar 50 vezes maior em média, do que a massa do eixo embrionário e nas de Brasília-DF, cerca de 40 vezes.

Embora exista variação de espécie para espécie quanto ao comportamento dos cotilédones durante o desenvolvimento, parece comum às espécies arbóreas do cerrado manterem seus cotilédones por um longo período, chegando até vários meses após a germinação. Isso pode sugerir uma dependência maior das plântulas dessas espécies em relação a esses órgãos, principalmente no período de seu estabelecimento (Melhem, 1975; Godoy & Felipe, 1992a; Paulilo & Felipe, 1994). Segundo Sasaki & Felipe (1992) em estudo feito com *D. miscolobium*, mais do que órgãos fotossintetizantes, os cotilédones nesta espécie são importantes órgãos de reserva que mantêm essa função até a queda. Entretanto, eles parecem não ser vitais para as plântulas após a idade de 4 dias (embebição em placa), já que elas sobrevivem, apesar de quase não acumularem matéria seca, quando os cotilédones são totalmente removidos nesta idade. Por outro lado, vários trabalhos com leguminosas cultivadas, como feijão e soja, têm demonstrado que os cotilédones são importantes fontes de reserva, pela redução no crescimento do eixo quando da remoção dos mesmos nessas plântulas (Pereira, 1981; Carelli & Magalhães, 1981).

Portanto, a relativa autonomia que parece apresentar o eixo embrionário de *D. miscolobium*, em relação à sua fonte de reservas, indicaria mais uma vez o controvertido papel dos cotilédones como única fonte de reservas para o crescimento inicial do eixo, durante a germinação. Assim, o estudo da mobilização e identificação das principais reservas, durante a germinação nessa espécie, se deu em sua fase inicial, ou seja, no período em que o eixo ainda não apresentava mudanças na massa seca e no período subsequente, quando havia um aumento em sua massa seca, sem contudo haver perdas detectáveis de massa pelos cotilédones.

Quando da realização das detecções citoquímicas com o material proveniente de Brasília-DF, foram estabelecidos tempos de embebição para a obtenção das amostras e já nessas primeiras observações, pôde-se verificar que, em muitos casos, os padrões morfológicos não apresentavam diferenças que permitissem distinguir tecidos com diferentes idades ou tempos de embebição, mesmo já havendo a protrusão da radícula. No material procedente de Itirapina-SP, pôde-se constatar mais uma vez que, apesar da padronização das sementes, os indivíduos nos diferentes tempos de embebição estabelecidos apresentavam eixo hipocótilo-radicular com tamanhos diferentes, mas tempos de embebição iguais. Isso provavelmente devido a variações na velocidade de germinação, como também a diferenças na velocidade de crescimento entre as sementes do mesmo lote, apesar da germinação ter tido início por volta do 40º dia de embebição. Além disso, as caracterizações citoquímicas, como aconteceu com o material de Brasília-DF, não permitiam correlacionar precisamente um padrão morfológico para determinado tempo de embebição, pois, o mesmo tempo de embebição apresentava padrões morfológicos diferentes ou ainda amostras com tempos de embebição diferentes o mesmo padrão morfológico. Essas observações, nos levaram à conclusão, de que o padrão morfológico demonstrou ser relativamente independente do tempo de embebição, apresentando diferenças nos materiais de reserva, já a partir de 48 horas de embebição.

Diante disso, resolveu-se abandonar o tempo de embebição como parâmetro de idade, adotando-se o estágio de crescimento do eixo hipocótilo-radicular. Logo após, foram feitas caracterizações citoquímicas preliminares e diante dos resultados foram estabelecidos cinco estádios: semente quiescente (estádio S0), semente com 48 horas de embebição (estádio S1), protrusão da radícula (estádio S2), eixo hipocótilo-radicular com até 20mm (estádio S3) e eixo hipocótilo-radicular com até 50mm (estádio S4). Feita a seleção, deu-se início então às análises citoquímicas e bioquímicas dos estádios.

2. Aspectos morfológicos e bioquímicos

A metodologia empregada no presente trabalho para a caracterização microscópica dos eixos embrionários e cotilédones, se baseia na interação entre as moléculas dos corantes com um dado substrato biológico e portanto, é dependente apenas da estrutura molecular do substrato, não sendo importante a sua origem (Vidal, 1987). Além disso, são poucos os trabalhos encontrados na literatura que utilizam a análise microscópica com um objetivo mais fisiológico e, quando isso acontece, o maior enfoque é dado aos aspectos bioquímicos do processo. (Tombs, 1967; Catsimpoolas et al., 1968; Ashcroff & Murray, 1979; Vidal & Pimentel, 1985).

A fixação dos tecidos para a sua observação microscópica é uma etapa extremamente importante, uma vez que um fixador inadequado pode originar resultados alterados ou até mesmo errôneos. O uso de solução tamponada para a fixação, impede, principalmente em sementes, que o fitato presente possa alterar o pH do meio e assim danificar estruturas importantes a serem visualizadas e distorça os resultados obtidos. Paraformaldeído e Glutaraldeído são fixadores extremamente utilizados pois formam, junto ao material protéico, pontes de metileno que

estabilizam as estruturas a serem preservadas. Entretanto, para métodos em que a presença de radicais aldeídicos exógenos pudesse ser um problema, como o método do PAS por exemplo, esse fixador foi evitado, perdendo-se assim um pouco de eficiência na preservação dos tecidos, mas evitando-se a obtenção de resultados errôneos (Lison, 1963).

No presente trabalho, a utilização de hematoxilina-eosina possibilitou uma caracterização morfológica geral de cotilédones e eixos embrionários de sementes de *D. miscolobium*, provenientes de Brasília-DF ou de Itirapina-SP. Por esse método, foi possível verificar a morfologia geral dos materiais analisados, com paredes celulares, núcleos e nucléolos fortemente corados pela hematoxilina, normalmente usada para a detecção dessas estruturas (Lison, 1963). Do mesmo modo, o conteúdo citoplasmático globular, inclusive nas células do floema, foi evidenciado pela eosina, corante ácido normalmente usado para visualizar o citoplasma (Lillie, 1969). Esses corantes não têm caráter citoquímico uma vez que não existe uma relação estequiométrica entre eles e o substrato corado (Lison, 1963).

2.1. Paredes celulares

A celulose forma o material básico das paredes celulares nas plantas superiores, sendo um dos seus principais constituintes juntamente com os xiloglicanos e as substâncias pécticas (Fry, 1988).

Em termos citoquímicos, as paredes celulares podem ser evidenciadas pela utilização do método do PAS. Esse método se baseia na oxidação dos grupos hidroxila de carbonos vicinais pelo ácido periódico. A reação se processa rapidamente, formando dois grupamentos aldeídicos nas hidroxilas dos açúcares (Pearse, 1961).

Após a oxidação, adiciona-se o reativo de Schiff. Esse reativo é preparado a

partir da fucsina básica, que é um corante magenta. A adição de radicais sulfito em meio ácido (pH 2-3), destrói o grupo cromofórico inicial, tornando a solução cor de palha ou até incolor, segundo a qualidade do corante. Essa solução tem afinidade por radicais carbonila, formados pela oxidação dos grupos hidroxila, aos quais as moléculas formadas se ligam de forma covalente, restabelecendo o grupo cromofórico do corante, ou seja, a cor magenta (Mello e Vidal, 1978; Cortelazzo et al., 1983; Vidal, 1987). De todo o modo, é feito sempre um controle em paralelo que não é oxidado pelo ácido periódico e cujo resultado, normalmente negativo, mostra os grupos carbonila já presentes nos tecidos.

Dessa maneira, os radicais carbonila formados pela oxidação promovida pelo ácido periódico reagem e dão a cor característica do método. Ele é usado geralmente para a detecção de glicanas neutras e, no caso específico de vegetais, para a identificação de celulose, hemicelulose e amido. Este método foi utilizado apenas no material procedente de Itirapina, e em todos os estádios analisados não foram detectadas alterações no aspecto das paredes das células de eixos embrionários ou de cotilédones. Portanto, celulosas e hemicelulosas não sofrem modificações que possam ser visualizadas microscopicamente por esse procedimento, durante os processos de mobilização e crescimento, ao menos no período de estudo estabelecido.

As paredes celulares de todos os materiais analisados apresentaram-se birrefringentes, quando observadas sob luz polarizada, com analisador e polarizador cruzados. A ocorrência de birrefringência de cor branca de 1ª ordem apresentada pelas paredes celulares, revela uma alta organização molecular dessa estrutura, devido à disposição ordenada de seus biopolímeros formadores, com destaque para a celulose (Frey-Wissling e Muhlethaler, 1965)

A presença de radicais aniônicos nas substâncias pécticas, faz com que as paredes celulares sejam coradas em tom arroxeadado pelo AT a pH 4,0. O azul de toluidina é um corante básico, portador do radical NH_3^+ , ligando-se portanto a

grupos aniônicos, destacando-se grupos fosfato, carboxila e sulfato. A pH 4,0, poucos radicais carboxila presentes nas proteínas dos tecidos encontram-se na forma aniônica. Entretanto, os radicais fosfato, presentes nos ácidos nucléicos e os radicais sulfato e carboxila presentes em polissacarídeos ácidos são corados (Lison, 1963; Pearse, 1961; Vidal, 1977).

Um aumento na disponibilidade de radicais aniônicos convenientemente próximos possibilita, em nível celular, a interação entre as moléculas planares do AT. Isso faz com que a energia necessária para a excitação dos elétrons pertencentes aos grupos cromofóricos dessas moléculas seja maior, diminuindo assim o pico de absorção de 625 nm, para comprimentos de ondas menores, que podem atingir 550 nm ou menos. Esse fenômeno, denominado de metacromasia, é comum a inúmeros corantes básicos e pode revelar, mesmo sem a utilização de medidas absorciométricas, um aumento na disponibilidade de radicais aniônicos em diferentes estágios fisiológicos de um mesmo tecido, ou de tecidos diferentes. Essa constatação pode ser feita pela simples visualização da cor obtida, que em função dessas interações, passa do verde, onde basicamente só existem moléculas isoladas e distantes umas das outras, para o azul, azul-arroxeadado e róseo, conseqüência do empilhamento das moléculas do AT (Vidal, 1987). A cor verde pode receber o nome de ortocromática, segundo alguns autores, em oposição à róseo-arroxeadada, que seria metacromática (Lison, 1963).

O processo de alongamento celular é altamente complexo e controlado por hormônios vegetais como as auxinas, giberelinas e citocininas. Fatores como o transporte de água, diferença de potencial osmótico e de turgescência e extensibilidade da parede celular também controlam o alongamento celular. Segundo a "teoria ácida" do crescimento celular (Hall et al., 1984), é necessário um abaixamento do pH, provocado a princípio pela influência de auxinas, o que causaria um afrouxamento da parede celular através do rompimento de certas ligações químicas entre os polímeros presentes nessa estrutura. Este evento poderia favorecer

a liberação de radicais aniônicos próximos, aumentando assim a metacromasia da coloração pelo AT. Essa característica já foi anteriormente descrita e pode ser demonstrada "in situ" através da coloração pelo AT a pH 4,0, em paredes de células rizoidais de esporos de *Cyathea delgadii* durante o desenvolvimento do gametófito (Randi, 1987) e em paredes celulares de cotilédones de soja através de medições do índice metacromático das paredes (Cortelazzo, 1995).

A metacromasia poderia então ser associada a atividades metabólicas e/ou fisiológicas, como a mobilização e o transporte de reservas durante a germinação. Em cotilédones de *D. miscolobium*, procedentes de Brasília-DF, a metacromasia observada na parede celular denotou uma grande disponibilidade de radicais aniônicos nessas estruturas, devido a presença de substâncias pécticas, o que possibilita um empilhamento das moléculas do corante resultando na coloração arroxeada dessa estrutura. Nos tempos e regiões analisados, não foi nitidamente visualizado um aumento da metacromasia nessas estruturas. Entretanto, para os cortes de eixos embrionários observados, a metacromasia das paredes foi maior do que as das células dos cotilédones.

No material proveniente de Itirapina, a ocorrência de metacromasia nas paredes celulares denota também, uma grande disponibilidade de radicais aniônicos nessas estruturas. Nos cotilédones o aumento da metacromasia observado com o decorrer dos sucessivos estádios do desenvolvimento comprova uma maior disponibilidade desses radicais durante o período analisado. Essa possível liberação de radicais e/ou aumento da quantidade de pectatos, demonstra a ocorrência de alterações na polarizabilidade da parede celular. Essas alterações estariam associadas às atividades de mobilização, uma vez que isso poderia facilitar o transporte de reservas de célula para célula até os feixes de floema dos cotilédones, que apresentaram inclusive as suas paredes mais metacromáticas do que as das células do parênquima. Resultados semelhantes foram obtidos em células parenquiáticas de cotilédones de soja, onde o índice metacromático (A_{555}/A_{625})

triplicou nas primeiras 144h de embebição. Simultaneamente foi observada nessa espécie, uma diminuição na ordem molecular das paredes celulares o que poderia reforçar a idéia de que estejam ocorrendo alterações que venham facilitar o transporte de célula a célula (Cortelazzo, 1995). Nos eixos embrionários de *D. miscolobium* a metacromasia já foi intensa desde a semente quiescente, o que pode indicar um estágio mais avançado desses processos em relação aos cotilédones. Nesse caso as alterações observadas podem estar relacionadas não só à mobilização de reservas mas também às atividades de crescimento. Valores de massa fresca e massa seca, para o mesmo período estudado podem sustentar essas observações, uma vez que aumentos significativos foram detectados.

O aumento da metacromasia nos eixos embrionários pode significar que neles, existe uma maior disponibilidade de grupamentos negativos disponíveis nas pectinas, seja pela maior quantidade das mesmas nessas paredes celulares, seja por uma maior disponibilidade desses grupamentos. Normalmente os pectatos são polímeros altamente metilados (Kauss e Hassid, 1967); uma hipótese atraente seria a de que, com a ação da enzima pectina-metilesterase localizada nas paredes celulares, mais grupos negativos seriam expostos e isso de uma certa forma fragilizaria a malha de pectatos da parede, tornando-a mais susceptível ao alongamento (Carpita e Gibeaut, 1993; Cortelazzo, 1995).

Paredes celulares jovens são ricas em pectinas e há pouca celulose. Também contêm uma glicoproteína rica em hidroxiprolina. Atualmente sabe-se que um dos maiores constituintes protéicos das paredes celulares são as extensinas, caracterizadas pela sequência repetitiva do pentapeptídeo Ser(Hyp)₄. Essas glicoproteínas também são ricas em lisina o que lhes confere um ponto isoelétrico (pI) próximo a 10 (Showalter, 1993). Devido à presença desse constituinte, paredes celulares podem apresentar reações positivas a corantes catiônicos como XP (xylydine ponceau). Entretanto, paredes celulares de cotilédones e eixos embrionários de *D. Miscolobium* apresentaram-se fracamente coradas, indicando a

presença de pouco material protéico. Além disso, existe a possibilidade de que a maior parte dos radicais amino das lisinas, poderiam estar interagindo com as substâncias pécticas presentes (Keller, 1993). Vários outros materiais vegetais revelaram o mesmo comportamento quando da utilização desse método, como feijão jacatupé, guandu, mucuna, lab-lab e soja (Vidal e Pimentel, 1985; Cortelazzo e Vidal, 1991; Seno, 1993).

2.2. Material lipídico

Os lipídios são virtualmente sintetizados em todos os tecidos das plantas, sendo que observa-se atividade de síntese, principalmente de triacilgliceróis, nas sementes em maturação e atividade de degradação em sementes durante a germinação. A maioria dos estudos sobre a biossíntese de lipídios são realizados com material foliar e, curiosamente, durante o processo de germinação. São relativamente poucos os estudos realizados durante a formação e desenvolvimento de sementes. Bioquimicamente, os lipídios podem ser utilizados como compostos de reserva (presentes nos corpos lipídicos), como componentes estruturais nas membranas celulares e como intermediários biossintéticos (Slabas et al., 1988). As sementes, portanto, podem ser os órgãos mais ricos em lipídios, que estariam armazenados nos cotilédones ou no endosperma e teriam um papel de reserva para o embrião (Esau, 1986).

Em sementes de oleaginosas como repolho, girassol e papoula, as proteínas e lipídios representam respectivamente 20% e 40% estando os carboidratos presentes em menor proporção (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989).

Os resultados preliminares das determinações de lipídios e carboidratos solúveis em sementes quiescentes sem casca, de *D. miscolobium* procedentes de Brasília-DF, revelaram que o conteúdo de lipídios variava de 20% a 40% da massa

fresca e seca, respectivamente. A maior parte dessa reserva foi detectada nos cotilédones, porém proporcionalmente o eixo apresentou uma grande quantidade de lipídios em relação a sua massa. Portanto, pelos resultados obtidos pudemos concluir que *D. miscolobium* é uma leguminosa com semente oleaginosa.

Não são encontrados facilmente, dados sobre a composição lipídica do eixo ou embrião. A maioria dos trabalhos concentra-se no conteúdo total da semente ou do órgão de reserva e na influência do embrião ou eixo na mobilização a partir desses órgãos de reserva (Marcus e Felly, 1964; Scala et al., 1969; Muto e Beevers, 1974; Marriot e Northcote, 1975; Bewley e Black, 1978; Paulilo, 1980). Entretanto, o presente trabalho sugere que as reservas lipídicas do eixo poderiam desempenhar um papel importante no início da germinação das sementes oleaginosas de *D. miscolobium*.

Os resultados obtidos nas detecções "in situ", através da coloração pelo Sudan black, confirmaram as análises prévias realizadas com as sementes de Brasília-DF, apontando também um alto teor de lipídios nas sementes quiescentes de *D. miscolobium* procedentes de Itirapina-SP, revelando que os lipídios estão presentes em grandes quantidades nessa espécie. A redução gradativa dos lipídios de reserva nos estádios mais avançados, demonstrou a sua mobilização durante o período estudado, principalmente no eixo embrionário. Essa grande quantidade lipídica, devido à espessura dos cortes, forma uma massa única, que camufla o conteúdo protéico, também elevado nessa espécie. Nas regiões cotiledonares próximas a vasos, pôde-se distinguir nitidamente a presença de material hidrofóbico circundando o material protéico globular, mesmo no interior de vasos. A partir de 48 horas de embebição notou-se uma diminuição do material corado, o que possibilitou distinguir os glóbulos protéicos, evidenciados através de outros métodos citoquímicos como o XP. Assim, no decorrer dos estádios, puderam ser distinguidos com maior nitidez, os glóbulos protéicos circundados por material de natureza hidrofóbica.

Por essas características pode-se concluir que as sementes de *D. miscolobium* apresentam além de lipídios, uma grande quantidade de proteínas. Isso corrobora os dados de que as oleaginosas apresentam uma quantidade apreciável de proteínas, além de poucos carboidratos de reserva como é o caso de girassol e soja por exemplo (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989).

Sementes de leguminosas como soja e amendoim são amplamente conhecidas e utilizadas como oleaginosas. Apesar desses excepcionais exemplos, sementes de leguminosas geralmente apresentam pouco conteúdo de lipídios. Entre as diversas espécies estudadas, a maior parte revelou conteúdo de lipídios ao redor de 5,5%. Com algumas exceções, as sementes de leguminosas com baixo teor de óleo (menos que 2,7%), acumulam mais amido. Em contrapartida, o aumento no teor de lipídios acompanha a diminuição do conteúdo de amido. Dessa forma uma grande parte das sementes com baixos teores de amido apresenta altos teores de lipídios e proteínas (Wolff e Kwolek, 1971).

Muitas sementes maduras apresentam alta concentração de lipídios, os quais durante o processo de germinação fornecem para o embrião, subsídios energéticos na forma de ATP e carbono, através dos processos de hidrólise dos ésteres de triglicerídios e de sua β -oxidação. Assim, análises feitas ao longo desses processos indicam uma variação não só no teor de lipídios mas também na composição de ácidos graxos do material de reserva da semente (Mayer e Poljakoff Mayber, 1989; Huang e Grunwold, 1990; Pomeroy et al., 1991).

A maioria das espécies vegetais apresenta predomínio do ácido oléico ou do ácido linoléico, mas algumas famílias, se caracterizam pelo acúmulo de outros ácidos graxos. Com a diversidade de distribuição de ácidos graxos entre as espécies, as vezes é possível distinguir famílias próximas, através dessa característica química. Em nível de gênero, a distribuição de ácidos graxos pode fornecer contribuições taxonômicas importantíssimas (Wolff e Kwolek, 1971; Mayworm, 1994).

As sementes provenientes de Brasília-DF apresentaram um conteúdo lipídico significativamente maior do que aquelas provenientes de Itirapina-SP, com valores de quase 60% para os eixos embrionários contra 40% dessa última. Nos cotilédones essa diferença foi menor, com 40% e 32% respectivamente. Desse conteúdo, no caso das sementes de Itirapina-SP, 42% (eixos) e 70% (cotilédones) se constituiu de ácido linoléico, sendo que apenas nos eixos embrionários foi detectada a presença de ácido linolênico com valores próximos a 41%. Identificou-se ainda nas duas estruturas, a presença dos ácidos palmítico (7,5% e 12%, respectivamente), e dos ácidos esteárico+oléico com 7% nos eixos embrionários e 15% nos cotilédones.

Estudos realizados por Mayworm (1994) apresentam os teores e a composição de ácidos graxos dos lipídios das sementes de 28 espécies de 21 famílias de plantas do cerrado de Piraçununga-SP. Entre elas, da família Fabaceae foram estudadas duas espécies, sendo uma delas *D. miscolobium*, que apresentou teor de lipídios ao redor de 22,9%, valor um pouco menor que os encontrados em nosso estudo com sementes das plantas do cerrado de Itirapina-SP e Brasília-DF. Apesar disso esta espécie foi incluída entre as que mereciam destaque no teor lipídico, ou seja, as que apresentavam um conteúdo na faixa de 17% a 25%, o mesmo intervalo observado para as diversas variedades de soja comercialmente utilizadas. Sob esse prisma destaca-se a diferença do teor lipídico encontrado no presente trabalho nas sementes coletadas em Brasília-DF e Itirapina-SP.

Quanto à composição de ácidos graxos das espécies analisadas por Mayworm (1994), os lipídios das sementes de maneira geral, apresentavam maiores teores dos ácidos palmítico, oléico e linoléico, o que não difere muito dos nossos resultados. Cabe ainda salientar que, como no nosso estudo, não foi detectada por esse autor, a ocorrência de ácido linolênico nas sementes de *D. miscolobium*. Pode-se admitir que em termos proporcionais, a alta porcentagem desse ácido determinada em nosso trabalho nos eixos embrionários, embora alta para a massa dessa estrutura, não afeta significativamente a quantidade para a semente como um todo, uma vez que sua

massa é determinada pela massa dos cotilédones, nos quais não se detectou a presença desse ácido graxo.

Dados citados no trabalho de tese de Mayworm (1994), ainda nos permitem a comparação com outras duas espécies do mesmo gênero: *Dalbergia melanoxylon* e *D. paniculata*. De maneira geral, as três espécies apresentam o mesmo perfil no que diz respeito à presença dos ácidos palmítico, linoléico e linolênico, sendo que *D. melanoxylon* apresenta os maiores teores de ácido linoléico (49,8%) como as de nosso estudo, diferindo portanto de *D. paniculata* que apresentou um valor de 22,5% para este ácido. *D. paniculata*, no entanto, apresenta uma alta porcentagem de ácido oléico (48,2%), o que não foi verificado para as outras duas espécies. Quanto aos teores de lipídios, tanto *D. melanoxylum* quanto *D. paniculata*, mostraram valores menores e ao redor de 13,4% e 7,4% respectivamente. Talvez as diferenças encontradas se devam a particularidades dos respectivos habitats, uma vez que sementes de leguminosas de regiões de clima tropical tendem a ser mais oleaginosas do que as de clima temperado ou mesmo sub-tropical. Algumas vezes as diferenças na composição de ácidos graxos dentro do mesmo gênero e igualmente dentro das espécies, podem ser atribuídas mais a efeitos ambientais do que a fatores genéticos (Wolff e Kwolek, 1971), o que reforçaria a hipótese levantada de que em Brasília-DF, uma maior temperatura e uma menor umidade relativa do ar em relação a Itirapina-SP, poderiam ser os fatores determinantes para um maior acúmulo de lipídios como material de reserva nas sementes de *D. miscolobium*.

2.3. Material protéico

As proteínas são estocadas nas sementes em organelas típicas denominadas corpos protéicos, que podem ser encontrados em tecidos haplóides, diplóides ou triplóides e são envolvidos por uma membrana simples. Em algumas plantas, eles

exibem inclusões (globóides ou cristalóides), mas em endospermas de gramíneas e cotilédones de leguminosas isso normalmente não ocorre. São formados principalmente por proteínas e ácido fítico, mas também estão presentes enzimas hidrolíticas (proteases e fitases), cátions e ácido ribonucléico. Outros constituintes, tais como carboidratos (exceto amido) e lipídios aparecem em pequenas quantidades. Na literatura, muitos termos são usados para designar essas organelas, tais como, grãos de aleurona, proteoplastos e outros, sendo corpos protéicos a denominação preferida, pois este termo seria mais genérico e não implicaria na sua precisa localização ou na origem específica de seu material de reserva (Pernollet, 1978).

O material protéico foi detectado "in situ", pelo XP, que é um corante ácido. Suas moléculas possuem dois grupos sulfato que se encontram desprotonados a partir de pH próximo a 1,0. Tem sido usado para a caracterização de cátions totais, presentes nos tecidos (Vidal, 1987). A pH 2,5 os radicais amino das proteínas, em geral, encontram-se protonados e reagem com o XP através de ligações eletrostáticas, o que possibilita sua visualização (Cortelazzo e Vidal, 1991).

Com o emprego desse método, pôde ser confirmado o padrão globular das estruturas presentes nas células e vasos de cotilédones e eixos embrionários, obtidos com hematoxilina-eosina.

A partir dos resultados das colorações com XP pode-se afirmar que os constituintes dos corpos globulares têm natureza protéica, dado que pode ser confirmado a partir da utilização de enzimas proteolíticas para a digestão do material. A esse respeito, a maior eficiência da digestão pela pepsina pode ser devida à maior gama de ligações peptídicas hidrolisadas por esta enzima, que agiria nas porções amina de fenilalanina, triptofano e tirosina, em contraste com a ação da tripsina, que quebra as porções carboxila da arginina e lisina (Lehninger et al., 1993). Resultados contrários foram obtidos em soja por Cortelazzo e Vidal (1991), mostrando assim que nessas sementes, há uma maior riqueza dos amino ácidos

hidrolizados pela tripsina. O aparente desarranjo do padrão globular na região adjacente a vasos, e a presença de corpos globulares no interior dos mesmos, podem sugerir que essas estruturas sofrem uma certa desagregação e/ou modificações estruturais, que estão possivelmente relacionadas com o seu transporte do cotilédone para o interior dos eixos embrionários, o que está de acordo com o que foi observado para *Glycine max* durante a germinação (Cortelazzo e Vidal, 1991).

Sabe-se que proteínas neutras ou básicas praticamente não se coram pelo AT a pH 4,0. Portanto, a ortocromasia apresentada pelos corpos protéicos quando do uso deste corante a pH 4,0 revela a natureza ácida desse material, possivelmente devido à presença de ácido glutâmico e ácido aspártico, como constituintes da molécula, o que permite a ligação do corante de forma espaçada, resultando a cor esverdeada detectada (Vidal, 1977). Em cotilédones de soja durante a germinação, o ponto isoelétrico aparente das proteínas presentes nos corpos protéicos, foi igual a 4,2 (Cortelazzo e Vidal, 1989), reforçando assim essa hipótese.

O eixo embrionário contém todos os componentes necessários para a síntese protéica, incluindo um nível extremamente alto de ribossomos. Porém, a ausência de polirribossomos em extratos de material seco, indica que a síntese não ocorre de maneira considerável até a embebição do eixo. Dois processos são importantes para o rápido aumento no conteúdo de proteínas: a ligação dos ribossomos com o RNAm e a formação de grandes quantidades de ATP. A análise da síntese de RNA em embriões de trigo, soja e rabanete em germinação, demonstrou que a síntese teria início entre a primeira e a quinta hora de embebição, e que o processo se aceleraria consideravelmente nos estágios finais da segunda fase da germinação (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989).

No caso do material de Brasília-DF, não foi possível para o período de embebição analisado, detectar visualmente modificações quantitativas que permitam conclusões mais definitivas sobre o transporte e mobilização de proteínas de reserva nos órgãos observados. Entretanto, foi possível nas células de eixos embrionários, a

visualização de núcleos e nucléolos bem corados indicando uma alta síntese de RNA ribossomal, com conseqüente acúmulo de ácidos nucléicos (RNA) no citoplasma e síntese protéica. Esses fatos apontaram para a necessidade de um estudo mais detalhado, incluindo a utilização de tempos maiores de embebição das sementes e de métodos de quantificação das substâncias ou estruturas detectadas.

As alterações sofridas pelo material protéico das sementes provenientes de Itirapina-SP e corado pelo AT e XP indicam que no período analisado, durante o decorrer dos estádios, houve metabolização dessa reserva no cotilédone, uma vez que se observaram alterações no padrão morfológico dos corpos protéicos, que, com o avanço dos estádios, assumiram um padrão mais regular e esférico, sugerindo uma fusão dos mesmos. A utilização desses métodos possibilitou também a verificação de diferenças no conteúdo protéico entre células presentes na região central do cotilédone e aquelas localizadas mais próximas ao tegumento das sementes. As primeiras apresentaram-se com um aspecto globular, o que poderia indicar que a mobilização se inicia nessa região do cotilédone, que apresenta corpos protéicos já agrupados em glóbulos maiores e em menor número (Pernollet, 1982). Esse fato pôde então ser confirmado durante o acompanhamento "in situ" do material protéico no decorrer dos estádios, uma vez que as diminuições em seu conteúdo são primeiramente notadas nas regiões centrais dos cotilédones.

Nos eixos embrionários, os dois métodos revelaram um alto conteúdo protéico, ocupando todo o espaço celular em E0. Isso indica a estocagem de material protéico também no eixo embrionário, que com a germinação seria transportado para as partes da plântula em crescimento, levando a uma menor quantidade de material corado nas radículas após a germinação. Além disso, as observações demonstraram que houve fusão dos corpos protéicos durante a metabolização, pois os mesmos se tornam maiores e com formato mais definido, diminuindo em número. Essa diminuição continuou com o avançar dos estádios e foi mais rápida nos eixos embrionários, quando comparada àquela verificada nos cotilédones, sugerindo que

as atividades metabólicas se iniciam primeiro nesta estrutura. Dessa forma, as células de eixos embrionários de um determinado estágio, indicavam o padrão morfológico do estágio seguinte para as células cotiledonares.

A degradação e fusão dos corpos protéicos já foi observada em sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Senna reticulata* submetidas ao envelhecimento acelerado com altas temperaturas e umidade relativa (Begnami, 1991).

Na verdade, as detecções "in situ" dos corpos protéicos, são instantâneos de momentos fisiológicos do processo contínuo de germinação e crescimento. Inicialmente, um alto teor protéico se encontra estocado nas células distantes do sistema vascular. Nas células adjacentes a vasos, o teor protéico é semelhante ao das células do sistema vascular que por sua vez é semelhante ao conteúdo existente no embrião, como se essas células, tivessem, durante a maturação da semente, atingido um grau máximo de estocagem de proteínas. Com o início do processo de germinação, a ativação e hidratação do material enzimático (fase 1 da respiração) faz com que, gradativamente o conteúdo de proteínas se altere (Bewley e Black, 1985; Cortelazzo e Vidal, 1991).

As dosagens de materiais protéicos mostraram haver, nos cotilédones, um conteúdo inicial (C0) ao redor de 16% que aumenta em C1 para 25%, mantendo-se contudo sem alterações nos estádios subsequentes. Assim, as alterações detectadas no tecido se devem, provavelmente, apenas ao rearranjo e maior solubilização do material protéico para a mobilização, precedida ou não de hidrólise. No eixo, a mobilização ocorreu primeiro, o que estaria de acordo com a possibilidade do embrião agir como sua própria fonte de consumo, com relativa independência do cotilédone ou órgão de reserva (Oaks, 1965; Yomo e Varner, 1973). Segundo Sasaki e Felipe (1992), as plântulas de *D. miscolobium* permanecem com os cotilédones por pelo menos dois meses e meio, sugerindo uma grande dependência das plântulas em relação a estes órgãos, durante o desenvolvimento inicial. Porém, os cotilédones não parecem ser vitais para as plântulas após quatro dias de

embebição, já que elas sobrevivem, apesar de quase não acumularem matéria, quando os cotilédones são removidos nesta idade.

As globulinas e albuminas, bem como um pequeno grupo característico de proteínas denominado lectinas, são as principais proteínas em leguminosas. As globulinas são as proteínas mais abundantes e são subdivididas em leguminas e vicilinas. Leguminas apresentam em geral Mr entre 300 e 400 kg/mol. São formadas normalmente por seis sub-unidades ácidas (entre 27 e 37 kg/mol) e seis básicas (entre 20 e 24 kg/mol). Possuem menos de 1% de açúcares, na sua maioria neutros. São ricas em ácido aspártico-asparagina, ácido glutâmico-glutamina e arginina. Vicilinas são mais semelhantes entre as diversas espécies e contêm proporcionalmente mais carboidratos que as leguminas. Suas sub-unidades apresentam em geral Mr entre 20 e 35 Kg/mol (Derbyshire et al., 1976). Durante a embebição da semente, os RNAm residuais das proteínas de reserva são degradados. Um novo conjunto de RNAm é necessário para a germinação, incluindo os RNAm das enzimas proteolíticas que vão atuar nesse processo. As principais enzimas envolvidas na hidrólise das proteínas de reserva são as exopeptidases e endopeptidases. Pela ação das endopeptidases, são expostas seqüências carboxi-terminais nas quais agem as exopeptidases quebrando os amino ácidos terminais das cadeias polipeptídicas (Bewley & Greenwood, 1990). Na germinação, o crescimento do embrião depende do suprimento de amino ácidos para a sua síntese protéica, sendo que as proteínas de reserva são as principais fontes de amino ácidos.

Não foi possível utilizar neste trabalho a análise do material protéico, por métodos convencionais para vegetais. As amostras não puderam ser analisadas em SDS-PAGE pois estavam dissolvidas em NaOH 0,1 M o que interferiu no padrão eletroforético das proteínas da amostra. Desse modo optou-se pela utilização do próprio tampão que solubiliza as amostras para a eletroforese. Neste tampão, como descrito em materiais e métodos, foi possível obter melhor resultado após incubação

e fervura. A análise em SDS-PAGE mostrou que muitas proteínas se solubilizaram no mesmo.

Os resultados obtidos em SDS-PAGE revelaram que na semente quiescente de *D. miscolobium* ocorre o aparecimento de um padrão de proteínas semelhantes na presença ou ausência do 2-Me como composto redutor. Em sementes de outras leguminosas como Lab lab e Mucuna, proteínas com 68 e 60 Kg/mol estão presentes (Seno et al., 1995). Assim, nas amostras analisadas neste trabalho ficou demonstrado que estas proteínas estão presentes, e parecem ser características para leguminosas. Essas proteínas permaneceram nos estádios de germinação estudados (C1 a C4). Um padrão semelhante de proteínas foi encontrado em *P. vulgaris*, espécie da mesma sub-família que *D. miscolobium* (Begnami, 1991; Martin, 1994). No entanto, o Mr foi diferente, sendo que nessa espécie varia de 50 a 45 Kg/mol. Uma proteína com 24,5 Kg/mol, presente com e sem mercaptoetanol em *D. miscolobium*, não parece corresponder a uma das subunidades da legumina onde só apareceu na presença do agente redutor. No entanto, duas outras proteínas com 38 e 28,5 Kg/mol podem representar subunidades ácidas de leguminas que estão presentes apenas na presença do redutor. Por outro lado, nas amostras sem redutor, muito material protéico permaneceu sem entrar no gel confirmando a presença das proteínas com Mr acima de 200 Kg/mol.

Outra classe de globulinas presentes em leguminosas são as vicilinas. No entanto, nas amostras deste trabalho não pôde ser identificada nenhuma subunidade desta proteína na presença de 2-Me. A presença de uma proteína com 57 Kg/mol na ausência do redutor e em estágio avançado da germinação (C4) poderia sugerir uma proteína com pontes S-S e o aparecimento de novas proteínas para o crescimento e desenvolvimento da plântula. Os dados apresentados mostram o padrão de algumas proteínas presentes nos estádios iniciais do desenvolvimento de *D. miscolobium*. Entretanto, uma purificação e uma caracterização destas proteínas deverão ser

realizadas, a fim de que seja estabelecido um padrão mais completo do conteúdo protéico para essa espécie.

2.4. Carboidratos

As principais reservas de carboidratos são o amido, oligo e polissacarídeos das paredes celulares e açúcares solúveis. Amido é a principal forma de reserva de polissacarídeos presente em cereais como trigo ou milho. O amido após sua hidrólise, atua como fonte de glicose, em sementes durante a germinação. As sementes geralmente contêm amilose e amilopectina organizadas em grãos de amido, sendo que a ação da α -amilase se inicia pela amilopectina resultando no final da hidrólise em uma mistura de dextrinas-limite, maltose e glicose. Em leguminosas como a ervilha, a hidrólise do amido envolve um aumento no conteúdo de suas enzimas hidrolíticas, que já pode ser detectado no 2º dia de embebição da semente. Em sementes de feijão durante a germinação, a atividade hidrolítica se torna alta nos cotilédones e decai no eixo embrionário (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989).

Sementes endospermicas de leguminosas, não apresentam o amido como principal reserva polissacarídica. Nelas, os galactomananos e xiloglicanos são os polissacarídeos de reserva mais importantes, encontrados no endosperma e nos cotilédones respectivamente, como componentes da parede celular. Em sementes de *Trigonella foenum-grecum*, a mobilização de galactomananos e da maior parte das reservas insolúveis do endosperma é um fenômeno estritamente pós-germinativo. A hidrólise dos galactomananos, pelas enzimas hidrolíticas (α -galactosidase e β -mananase, por exemplo) resulta em galactose e manose, que são translocadas para o embrião e aparentemente, uma parte destes monossacarídeos seria temporariamente transformada em amido ou sacarose (Meier e Reid, 1982; Bewley et al., 1993).

Muitas das enzimas envolvidas na hidrólise e interconversão dos carboidratos tornam-se ativas durante a germinação. A maior parte delas é sintetizada de novo, e as outras por ativação ou liberação (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989).

Através do método do PAS, além da parede celular, pode-se também evidenciar a presença de grãos de amido e outros polissacarídeos neutros, uma vez que o ácido periódico oxida hidroxilas de carbonos vicinais, rompendo a ligação entre os mesmos, e produzindo dois radicais carbonila no local (Pearse, 1961). Esses radicais, se ligarão ao reativo de Schiff através de ligações covalentes (Mello e Vidal, 1978). Como controle desse método, o material é tratado pelo reativo de Schiff sem oxidação prévia pelo ácido periódico, demonstrando assim, que a ação desse ácido é a responsável pela formação dos radicais carbonila que se ligam ao reativo de Schiff.

Os resultados citoquímicos e bioquímicos do presente trabalho demonstraram uma pequena quantidade de amido na espécie estudada. Além disso, o método do PAS evidenciou a presença dessa reserva na semente quiescente, principalmente nos eixos embrionários.

Outro fator que comprovou a composição química dos grânulos PAS-positivos foi a sua análise em microscopia de polarização. Sabe-se que esse material de reserva é estocado de forma que as diversas moléculas de amilose e amilopectina se disponham circularmente a partir de um centro de nucleação. Essa disposição faz com que esses grânulos sejam birrefringentes e apresentem um aspecto característico em cruz de malta, sempre observado nesse tipo de reserva (Cortelazzo, 1992).

Os resultados das determinações de carboidratos solúveis em etanol, em sementes quiescentes de *D. miscolobium* procedentes de Brasília-DF, revelaram um conteúdo ao redor de 10% da massa fresca ou seca, tanto para eixos embrionários quanto para cotilédones, sendo que desse total, cerca de 72% eram de açúcares redutores. Isso pôde ser também verificado nas sementes de Itirapina-SP, onde o conteúdo de açúcares solúveis em metanol-água, nos cotilédones de sementes

quiescentes, foi de 7,6%. Esses resultados corroboram aqueles obtidos por Buckeridge e Dietrich (1990), para a mesma espécie, que apresentou níveis de açúcares solúveis menores do que 10%. A diminuição do conteúdo de amido nos eixos embrionários poderia estar relacionada à sua degradação para a produção de glicose como fonte de energia para as diversas reações metabólicas em curso durante o desenvolvimento do eixo hipocótilo-radicular e também como fonte de glicose para a biossíntese de celulose. Esses eventos seriam também supridos pela degradação dos lipídios presentes em quantidade nessas estruturas nas sementes quiescentes e que, durante o processo de germinação e desenvolvimento inicial da plântula, seriam oxidados.

As determinações do conteúdo de amido nos cotilédones, mostrou que de fato, em estádios mais avançados de crescimento, houve um aumento significativo dessa reserva, que de 2% na semente quiescente chegou aos 5% da massa seca nesse órgão em C4. Do mesmo modo, o método do PAS e a microscopia de polarização revelaram, estranhamente, um aumento na quantidade dessa reserva nos cotilédones. Isso poderia ser explicado pela ocorrência de alguma atividade fotossintética, uma vez que os cotilédones se encontravam verdes em C3-4. Segundo Sasaki e Felipe (1992), os cotilédones de *D. miscolobium*, parecem ser importantes órgãos de reserva com alto conteúdo de amido e alguma taxa fotossintética, pelo menos até os vinte dias de idade, quando então começa a maior expansão foliar. Outra possibilidade seria a degradação do material lipídico que pode ser metabolizado a carboidratos, numa série de reações que envolvem a β -oxidação e o ciclo do glioxilato, que produzem succinato nos glioxissomos. Isso possibilita um posterior acúmulo de malato, ativando a neoglicogênese (Berkaloff et al., 1981; Alberts et al., 1994). A diminuição no conteúdo de lipídios durante o período, reforçaria essa hipótese.

CONCLUSÕES

01. Sementes de *D. miscolobium* provenientes de Brasília-DF germinam mais rápido do que as sementes procedentes de Itirapina-SP, apesar de apresentarem o mesmo período de embebição.
02. As análises citoquímicas revelaram que não existe uma relação nítida entre o período de embebição e o padrão morfológico das reservas presentes nas sementes, justificando assim a escolha de estádios de crescimento do eixo hipocótilo-radicular como padrão de análise.
03. Com o decorrer dos sucessivos estádios, há um aumento na disponibilidade de radicais aniônicos das paredes das células dos cotilédones e eixos embrionários, o que demonstra a ocorrência de alterações na polarizabilidade da parede celular, com conseqüente aumento na metacromasia.
04. *D. miscolobium*, é uma leguminosa com semente oleaginosa, com proporcionalmente maior conteúdo dessa reserva nos eixos embrionários. Isso sugere, que as reservas lipídicas do eixo podem desempenhar um papel importante no início da germinação de sementes dessa espécie. A redução gradativa dos lipídios de reserva nos estádios mais avançados, demonstra a sua mobilização, durante o período estudado, principalmente no eixo embrionário.
05. A composição de ácidos graxos, das sementes dessa espécie apresentam maiores teores dos ácidos palmítico, oléico e linoléico, não sendo detectada a

ocorrência de ácido linolênico, que é uma característica comum nos lipídios de reserva.

06. As sementes de *D. miscolobium* apresentam, além de lipídios, uma grande quantidade de proteínas, detectadas pelo xylidine ponceau. Isso foi confirmado a partir da digestão do material por enzimas hidrolíticas. A maior eficiência da digestão foi pela pepsina o que corrobora a natureza ácida do material demonstrada pelo azul de toluidina.
07. Com o decorrer da germinação verifica-se a fusão dos corpos protéicos, que é mais rápida nos eixos, o que sugere que as atividades metabólicas se iniciam primeiro nesta estrutura. Dessa forma, as células de eixos embrionários de um determinado estágio indicam o padrão morfológico do estágio seguinte para as células cotiledonares.
08. A análise em SDS-PAGE mostra que muitas proteínas presentes nessa espécie se solubilizam no tampão de aplicação das amostras para a eletroforese. Com destaque para a proteína com massa molecular relativa de 63Kg/mol.
09. As sementes de *D. miscolobium*, apresentam baixo conteúdo de carboidratos solúveis e de amido. A diminuição aparente dos grãos de amido presentes no eixo embrionário sugere sua utilização como fonte de energia para o desenvolvimento deste órgão e também como fonte de glicose para a biossíntese de celulose.
10. O aumento do conteúdo e do número de grãos de amido nos cotilédones, no decorrer dos estádios, pode ser explicado tanto pela ocorrência de alguma

atividade fotossintética, quanto pela degradação do material lipídico nos glioxissomos com posterior ocorrência da neoglicogênese.

RESUMO

O presente trabalho, foi realizado com sementes de *D. miscolobium*, uma espécie arbórea dos cerrados, de importância econômica como madeira e conhecida como cabiuna do cerrado. Como objetivos principais teve: verificar aspectos fisiológicos da germinação das sementes dessa espécie, determinar o padrão de crescimento para o eixo embrionário, detectar as alterações nos conteúdos das principais reservas da semente e sua mobilização e estabelecer parâmetros que permitissem analisar o padrão de desenvolvimento e crescimento da plântula, na fase inicial da germinação. Para atingir esses objetivos foram feitas determinações de massa fresca e massa seca de eixos e cotilédones, caracterizações e detecções citoquímicas e quantificações bioquímicas.

Os resultados demonstraram o alto poder germinativo das sementes dessa espécie independentemente da procedência, tamanho ou cor de suas sementes. Entretanto, apesar da padronização das sementes, verificou-se uma variação considerável na velocidade de germinação e crescimento, que pode ser ilustrada pelas determinações de massa, indicando a grande variabilidade que se pode encontrar em estudos com espécies selvagens. Por isso, procurou-se caracterizar citoquimicamente um padrão morfológico de crescimento e desenvolvimento que permitisse uma visualização mais clara destes processos. Foi possível observar diferenças no padrão morfológico dos compostos de reserva, já a partir de 48 horas de embebição, seguindo-se um período variável de tempo sem modificações muito evidentes, até a protrusão da radícula. Selecionaram-se assim, 7 estádios de crescimento com base no comprimento do eixo hipocótilo-radicular. Nesse material não foram verificadas diferenças citoquímicas marcantes até 20 mm de

comprimento, o mesmo ocorrendo no intervalo de 20 e 50 mm. Dessa forma, dos 7 estádios inicialmente estabelecidos foram selecionados 5, a saber: sementes quiescentes (E0); sementes com 48 horas de embebição (E1); protrusão da radícula (E2); eixo hipocótilo-radicular até 20 mm (E3) e 50 mm (E4).

Nos diferentes métodos de coloração utilizados no estudo citoquímico, pode-se observar em E0, a uniformidade do conteúdo citoplasmático, com um aspecto globular e agregado. A partir de 48 horas de embebição (E1) já pôde ser observada uma separação dos glóbulos citoplasmáticos principalmente nas células da região central dos cotilédones. Essa desagregação se acentuou nos estádios E2 e E3 e no estádio E4 esses glóbulos se apresentaram maiores, em menor quantidade, com um formato circular bem definido. À diferença dos cotilédones esse processo nos eixos embrionários foi mais rápido. A natureza protéica do material no interior desses corpos foi demonstrada por métodos específicos, evidenciando-se a natureza hidrofóbica de seu envoltório. As paredes celulares em geral mostraram aumento da disponibilidade de radicais aniônicos no decorrer dos estádios.

Juntamente com as determinações citoquímicas pôde-se constatar bioquimicamente a presença de um grande quantidade de reserva lipídica nos cotilédones e principalmente nos eixos em E0, havendo redução deste conteúdo em estádios mais avançados. A composição dos ácidos graxos revelou a presença significativa dos ácidos linoléico, linolênico, esteárico+oléico e palmítico. Nos cotilédones a determinação do conteúdo protéico mostrou teores em torno de 15% de sua massa fresca e seca. As sementes dessa espécie podem então ser classificadas como oleaginosas, com um conteúdo proteico razoável e pouca quantidade de carboidratos solúveis e amido.

Bibliografia

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. e WATSON, J.D., 1994. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing, Inc. New York and London.
- ALLARD, R.W., 1965. Genetic systems associates with colonizing ability in predominantly self-pollinating species. In: Baker, H.G. e Stebbins (eds.). **The Genetics of Colonizing Species**. New York, Academic Press, p. 50-76.
- ARASAKI, F.R., 1988. Relação entre parte aérea e sistema radicular de *Kielmeyera coriacea*. Tese de Mestrado. Unicamp - Campinas - SP.
- ARASAKI, F.R. e FELIPPE, G.M., 1987. Germinação de *Dalbergia violacea*, uma espécie dos cerrados. **Revta. Brasil. Biol.**, 47:457-63.
- ARASAKI, F.R. e FELIPPE, G.M., 1990. Crescimento inicial de *Kielmeyera coriacea*. **Ciênc. Cult.** 42: 716-20.
- ARASAKI, F.R. e FELIPPE, G.M., 1991. Crescimento inicial e conteúdo de açúcares solúveis em *Kielmeyera coriacea* Mart. **Hoehnea**, 18: 171-77.
- ARENS, K., 1963. As plantas lenhosas dos campos cerrados como flora adaptada às deficiências minerais do solo. In: Ferri, M.G. ed. **Simpósio sobre o cerrado**. São Paulo, Ed. E. Blucher e EDUSP, p. 249-265.
- ASHCROFF, N.G. e MURRAY, D.R., 1979. The dual functions of the cotyledons of *Acacia iteaphylla* F. Muell (Mimosidae). **Aust. J. Bot.**, 27: 343-52.
- BANKS, W. e MUIR, D.D., 1980. Structure and chemistry of the starch granule. In: J.D. ed. **Carbohydrates: Structure and function**. London, Preiss, Academic Press. p. 321-29.
- BAUMGARTNER, B.; TOKUYASU, K.T. e CHRISPPEELS, M.J., 1978. Localization of vicilin peptidohydrolase in the cotyledons of mung bean seedlings by immunofluorescence microscopy. **J. Cell Biol.**, 79: 10-9.
- BEEVERS, H., 1969. Glyoxysomes of castor bean endosperm and their relation to gluconeogenesis. **Ann. N. A. Acad. Sci.**, 168:313-24.

- BEGNAMI, C.N., 1991. Alterações celulares durante o envelhecimento em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. e *Senna reticulata* (Willdenow) Irwin e Barneby. Tese de mestrado. Unicamp - Campinas - SP.
- BELTRÃO, J.D., 1963. Uma nova teoria que tenta elucidar a origem do cerrado. In: **Anais V Congresso Nacional de Botânica**. Goiânia, (S.B.B., ed.). p. 375-93.
- BERKALLOF, A.; BOURGUET, J.; FAVARD, P.; FAVARD, N. e LACROIX, J.C., 1981. **Biologie et physiologie cellulaires III: Chloroplastes, peroxysomes, division cellulaire**. Paris, Herman. p. 89-106.
- BEWLEY, J.D. e BLACK, M., 1978. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. Berlim, Springer - Verlag.
- BEWLEY, J.D. e BLACK, M., 1985. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. New York, Plenum Press.
- BEWLEY, J.D. e GREENWOOD, J.S., 1990. Protein storage and utilization in seeds. In: David T.D. and David H.T. eds. **Plant physiology, biochemistry and molecular biology**. Essex-England, Longman Scientific & Technical. p. 456-469.
- BEWLEY J.D.; LEUNG D.W.M.; MACISAAC, S.; GRANT, J.S.R. e XU, N., 1993. Transient starch accumulation in the cotyledons of fenugreek seeds during galactomannan mobilization from the endosperm. **Plant Physiol. Biochem.**, **31**: 483-490.
- BLIGH, E.G. e DYER, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, **37**: 911-7.
- BRADFORD, K.J., 1990. A water relations analysis of seed germination rates. **Plant Physiol.**, **94**: 843-49.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-54.
- BROWN, R., 1972. Germination. In: Steward F.C. ed. **Plant Physiology**. Vol. VI. London, Academic Press. p. 33-48.
- BUCKERIDGE, M.S. e DIETRICH, S.M.C., 1990. Galactomannans from Brazilian legume seeds. **Revta. brasil. Bot.** **13**: 109-12

- CAMARGO, A.P., 1963. Clima do cerrado. In: Ferri, M.G. ed. **III Simpósio sobre o cerrado**. São Paulo, Ed. E. Blucher e EDUSP. p. 26-43.
- CARELLI, M.L.C. e MAGALHÃES, A.C. 1981. Efeito da remoção dos cotilédones no desenvolvimento das plântulas e na atividade da redutase de nitrato em soja (*Glycine max* L. Merr.). **Revta brasil. Bot.** 4: 43-47.
- CATSIMPOOLAS, N., CAMPBELL, T.C. e MEYER, E.W., 1968. Immunochemical study of changes in reserve proteins of germinating soybeans seeds. **Plant Physiol.** 43: 799-805.
- CARPITA, N.C. e GIBEAUT, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.**, 3: 1-30.
- CHRISPEELS, M.J. e VARNER, J.E., 1967. Gibberellic acid-enhanced synthesis and release of α -amilase and ribonuclease by barley aleurone layers. **Plant Physiol.**, 42: 398-406.
- CORTELAZZO, A.L., 1992. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. **Revta. brasil. Bot.**, 15: 157-62.
- CORTELAZZO, A.L., 1995. Metachromasy and macromolecular orientation in the cell walls of soybean during germination. **Can. J. Bot.**, submetido.
- CORTELAZZO, A.L. e VIDAL, B.C., 1989. Determination of the apparent isoelectric point of the protein bodies of *Glycine max*. **Cytologia**, 54: 635-9.
- CORTELAZZO, A.L. e VIDAL, B.C., 1991. Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination. **Revta. brasil. Bot.**, 14: 27-33.
- CORTELAZZO, A.L.; VIDAL, B.C. e MELLO, M.L.S., 1983. Basic fuchsin and the Schiff-aldehyde reaction. I. Spectral absorption characteristics in solution. **Acta Histochem.**, 73: 121-33.
- COUTINHO, L.M., 1990. O cerrado e a ecologia do fogo. **Ciênc. Hoje**, 12: 22-30.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J. e BOULTER, D., 1976. Legumin and vicilin storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry**, 15: 3-24.

- DOBZHANSKY, T.; AYALA, F.G.; STEBBINS, G.I. e VALENTINE, J.W., 1977. **Evolution**. São Francisco, W.H. Freeman..
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. e SMITH, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, **28**: 350-56.
- DYAS, L. e GOAD, L.J., 1994. The occurrence of free and esterified sterols in the oil bodies isolated from maize seed scutella and a celery cell suspension culture. **Plant Physiol. Biochem.**, **32**: 799-805.
- EITEN, G., 1972. The cerrado vegetation of Brazil. **Bot. Rev.**, **38**: 201-341.
- EITEN, G., 1977. Delimitação do conceito de cerrado. **Archos. Jard. Bot., Rio de Janeiro**, **21**: 125-134.
- ESAU, K., 1986. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo, Ed. Edgard Blucher.
- FELIPPE, G.M., 1984. Germinação de *Zornia reticulata*, uma espécie dos cerrados. **Anais Congr. SBSP**, **4**: 7-13.
- FELIPPE, G.M., 1990. *Qualea grandiflora*: the seed and its germination. **Revta. brasil. Bot.**, **13**: 33-37.
- FELIPPE, G.M. e DALE, J.E., 1990. The effects of phosphate supply on growth of plants from Brazilian cerrado: experiments with seedlings of annual weed, *Bidens gardneri* Baker (Compositae) and tree, *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). **Oecology**, **82**: 81-86.
- FELIPPE, G.M. e SILVA, J.C.S., 1984. Estudos de germinação em espécies do cerrado. **Revta brasil. Bot.** **7**: 157-63.
- FENNER, M., 1985. **Seed Ecology**. New York, Chapman and Hall.
- FERREIRA, A.G., DIETRICH, S.M.C. e HANDRO, N., 1979. Changes in the metabolism of *Araucaria angustifolia* during the early phases of germination and growth. **Revta brasil. Bot.**, **7**: 67-71.
- FERRI, M.G., 1960. Nota preliminar sobre a vegetação do cerrado do cerrado em Campo do Mourão (Paraná). **Bol. Fac. Filos. Ciênc. Univ. S. Paulo**, **247 Botânica** **17**: 109-115.

- FERRI, M.G., 1969. **Plantas do Brasil - Espécies do cerrado**. São Paulo, Ed. Edgar Blucher. p. 176-77.
- FERRI, M.G., 1975. Os cerrados de Minas Gerais. **Ciênc. Cult.**, 27: 1217-20.
- FERRI, M.G., 1977. Ecologia dos cerrados. In: Ferri, M.G. ed. **IV Simpósio sobre o cerrado**. Belo Horizonte e São Paulo, Itatiaia Editora Ltda. e EDUSP. p. 15-36.
- FERRI, M.G., 1983. Os cerrados, um grupo de formas de vegetação semelhante às savanas. **Revta Biol.**, 12: 491-500.
- FOLCH, J.; LEES, M. e STANLEY, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, 226: 487-509.
- FREITAS, F.G. e SILVEIRA, C.O., 1977. Principais solos sob vegetação de cerrado e sua aptidão agrícola. In: Ferri, M.G. ed. **IV Simpósio sobre o cerrado: bases sobre a utilização agropecuária**. São Paulo e Belo Horizonte, Ed. Itatiaia Ltda. e EDUSP.
- FREY-WISSLING, A. e MUHLETHALER, J., 1965. Cell Wall. In: **Ultrastructural plant cytology with an introduction to molecular biology**. Amsterdam, Elsevier. p. 275-328.
- FRY, S.C., 1988. The structure and function of xyloglycan. **J. Exptl. Bot.**, 40: 1-11.
- GIBBS, P.E.; LEITÃO FILHO, H.F. e SHEPHERD, G., 1983. Floristic composition and community structure in an area of cerrado in SE Brazil. **Flora**, 173: 433-49.
- GODOY, S.M.A. de, e FELIPPE, G.M., 1992(a). Crescimento inicial de *Qualea cordata*, uma árvore dos cerrados. **Revta brasil. Bot.**, 15: 23-30.
- GODOY, S.M.A. de, e FELIPPE, G.M. 1992(b). *Qualea cordata*: a semente e sua germinação. **Revta brasil Bot.**, 15: 17-21.
- GOODLAND, R., 1971. Oligotrofismo e alumínio no cerrado. Ferri, M.G. ed. In: **III Simpósio sobre o cerrado**. São Paulo, EDUSP. p. 44-60.
- GOODLAND, R. e POLLARD, R., 1973. The Brazilian cerrado vegetation: a fertility gradient. **The Journal of Ecology**, 61: 219-24.

- HALL, J.L., FLOWERS, T.J. e ROBERTS R.M., 1984. Cell Walls. In: **Plant cell structure and metabolism**. London Longman. p. 430-72.
- HALMER, P., 1985. The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds. **Physiol. Vég.**, **23**: 107-25.
- HARIDASAN, M., 1982. Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. **Plant and Soil**, **65**: 265-73.
- HARIDASAN, M.; PAVIANI, T.I. e SCHIAVIANI, I., 1986. Localization of aluminum-accumulating species. **Plant and Soil**, **94**: 435-37.
- HARRIS, N.; CHRISPEELS, M.J. e BOULTER, D., 1975. Biochemical and histochemical studies on protease activity and reserve protein metabolism in the cotyledons of germinating cowpea (*Vigna unguiculata*). **J. Exp. Bot.**, **26**: 544-54.
- HARTMAN, L. e LAGO, R.C.A., 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Prat.**, **22**: 475-94.
- HERINGER, E.P.; BARROSO, G.M.; RIZZO, J.A. e RIZZINI C.T., 1977. A flora do cerrado. In: Ferri, M.G. ed. **IV Simpósio sobre o cerrado**. São Paulo, EDUSP. p. 211-32.
- HUANG, A.H.C., 1985. Lipid bodies. In: Linskens, H.F. e Jackson, J.F. eds. **Modern methods of plant analysis, New series, I: Cell components**. Berlin, Springer-Verlag, p. 145-51.
- HUANG, A.H.C., 1992. Oil bodies and oleosins in seeds. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, **43**: 177-200.
- HUANG, L-S. e GRUNWOLD, C. 1990. Lipid and fatty acid changes during germination of alfafa seeds. **Phytochemistry** **29**: 1441-5.
- HUTTON, D. e STUMPF, P.K., 1971. Fat metabolism in higher plants. LXII. The pathway of ricinoleic acid catabolism in the germinating castor bean (*Ricinus communis*, L.) and pea (*Pisum sativum*, L.). **Arch. Biochem. Biophys.**, **142**: 48-50.
- JACKS, T.J.; HENSARLING, T.P.; NEUCERE, J.N.; YATSU, L.Y. e BARKER, R.H., 1990. Isolation and physicochemical characterization of the half-unit membranes of oilseed lipid bodies. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **67**: 353-61.

- JANN R.C. e AMEN, R.D. 1977. In: Khan, A.A. ed. **The physiology and Biochemistry of seed dormancy and germination**. Elsevier, North-Holland Biomedical Press. p. 7-28.
- JOLY, C.A. e FELIPPE, G.M., 1979. Dormência das sementes de *Rapanea guianensis* Aubl. **Revta brasil. Bot.**, 2: 1-6.
- KAUSS, H. e HASSID, W.Z., 1967. Enzymic introduction of the methyl ester groups of pectin. **J. Biol. Chem.**, 242: 3449-53.
- KELLER, B. 1993. Structural cell wall proteins. **Plant Physiol.**, 101: 1127-30.
- KIERMAN, J.A., 1981. **Histological e histochemical methods. Theory e practice**. London, Pergamon, 344 p.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON D.L. e COX,, M.M., 1993. **Principles of Biochemistry**. New York, Worth Publishers,.
- LABOURIAU, L.G.; VALIO, I.M.F. e HERINGER, E.P., 1964. Sobre o sistema reprodutivo de plantas dos cerrados. I **Anais Acad. bras. Ciênc.**, 36: 449-64.
- LABOURIAU, L.G.; VALIO, I.F.M.; LABOURIAU, M.L.S. e HANDRO, W., 1963. Nota sobre a germinação de sementes de plantas de cerrados em condições naturais. **Revta bras. Biol.**, 23: 227-37.
- LEUNG, D.W.M.; BEWLEY, J.D. e REID, J.S.G., 1981. Mobilization of the major stored reserves in the embryo of fenugreek (*Trigonella feerum-graecum* L., Leguminosae), and correlated activities. **Planta** 153: 95-100.
- LILLIE R.D., 1954. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. New York,, Blakiston.
- LILLIE, R.D., 1969. **Biological Stains**. Baltimore, The Willians & Wilkins Company.
- LISON, L., 1963. **Histochemie et citochemie animales**. Paris, Gauthier-Villars. 396 p.
- LOPES, A.S. e COX, F.R., 1977. Cerrado vegetation in Brazil: an edaphic gradient. **Agron. Journ.**, 69: 828-31.
- LOTT, J.N.A., 1980. Protein bodies. In: Tolbert, N.E. ed. **The plant cell**. New York, Academic, p. 589-623.

- LOWE, L.B. e RIES, S. K., 1973. Endosperm protein of wheat seed as a determinant of seedling growth. *Plant Physiol.*, **51**: 57-60.
- MAIA, V., 1979. *Técnica histológica*. São Paulo, Atheneu Editora São Paulo Ltda.
- MALAVOLTA, E.; SARRUGE, J.R. e BITTENCOURT, V.C., 1977. Toxidez de alumínio e de manganês. In: Ferri, M.G. ed. *IV Simpósio sobre o cerrado*. Belo Horizonte e São Paulo, Ed. Itatiaia Ltda. e EDUSP. p. 275-301.
- MANTOVANI, W. e MARTINS, F.R., 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Mogi Guaçu, Estado de São Paulo. *Revta brasil. Bot.*, 101-112.
- MARCUS, A. e FEELY, J. 1964. Isocitrio lyase formation in the dissected peanut cotyledon. *Biochim. Biophys. Acta*, **89**: 170-71.
- MARRIOT, K.M. e NORTHCOTE, D.H. 1975. The breakdown of lipide reserves in the endosperm of germinating castor bean. *Biochem. J.* **148**: 139-144.
- MARTIN, C.C.G., 1994. Identificação e caracterização de globulina albumina e lectina, e análise destas durante a formação e germinação da semente de três variedades de *Phaseolus vulgaris*. *Tese de Mestrado*. Unicamp - Campinas - S.P.
- MAYER, A.M. e POLJAKOFF-MAYBER A., 1989. *The germination of seeds*. New York, McMillan, Pergamon Press.
- MAYER, A.M. e SHAIN, Y., 1974. Control of seed germination. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **25**: 167-93.
- MAYWORM, M.A.S., 1994. Ácidos graxos de sementes de plantas do cerrado. *Tese de Mestrado*. USP - São Paulo - S.P.
- McCREAD, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V. e OWENS, H.S., 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. *Anal. Chem.*, **22**: 1156-58.
- McFADDEN, A.K., 1963. Effect of seed source on comparative test results in barley. *Can. J. Plant Sci.*, **43**: 295-300.
- MEDEIROS, R.A. de e HARIDASAN, M., 1985. Seasonal variations in the foliar concentrations of nutrients in some aluminum accumulating and non-accumulating species of the cerrado region of central Brazil. *Plant Soil*, **88**: 433-36.

- MEIER, H. e REID, J.S.G., 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: Loewus, F.A. e Tanner W., ed. **Plant carbohydrates I. Intracellular carbohydrates**. Berlin, Springer Verlag.
- MELHEM, T.S., 1975. Fisiologia da germinação das sementes de *Dipterix alata* Vog. (Leguminosae-Lotoideae). **Hoehnea**, 5: 59-90.
- MELLO, M.L.S. e VIDAL, B.C., 1978. A reação de Feulgen. **Ciênc. Cult.**, 30: 665-76.
- MUNTZ, K.; BASSUNER, R.; LICHTENENFELD, C.; SCHOLZ, G. e WEBER, E., 1985. Proteolytic cleavage of storage proteins during embriogenesis and germination of legume seeds. **Physiol. Vég.**, 23: 75-94.
- MURPHY, D.J. e CUMMINS I., 1989. Purification and immunogold localization of the major oil-body membrane protein of oilseed rape. **Plant Sci.**, 60: 47-54.
- MUTO, S. e BEEVERS H., 1974. Lypase activity in castor bean endosperm during germination. **Plant Physiol.**, 54: 23-28.
- OAKS, A. 1965. The regulation of nitrogen loss from mayze endosperm. **Can. J. Bot.**, 43: 1077-82.
- PAULILO, M.T.S., 1980. Efeito do ácido giberélico e 6-benziladenina na utilização das reservas da semente de *Phaseolus vulgaris* L. cv carioca. Tese de Mestrado. Unicamp - Campinas - S.P.
- PAULILO, M.T.S. e FELIPPE G.M., 1994. Contribuição dos cotilédones e partição de matéria durante o crescimento de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). **Revta brasil. Bot.**, 17: 87-91.
- PAULILO, M.T.S.; FELIPPE, G.M. e DALE, J.E., 1993. Crescimento inicial de *Qualea grandiflora*. **Revta brasil. Bot.**, 16: 37-46.
- PATE, J.S., 1975. Pea. In: Evans, L.T. ed. **Crop physiology**. Cambridge, University Press. p. 191-224.
- PEARSE, A.G.E., 1961. **Histochemistry: theoretical and applied**. London, J. & A. Churchil Ltd. 2 ed. 998 p.
- PEREIRA, M.F.A., 1981. Regulation of seedling development in *Phaseolus vulgaris* L. by the cotyledons and primary leaves. **Revta brasil. Bot.**, 4: 39-42.

- PERNOLLET, J.C. 1978. Proteins bodies of seeds: ultrastructure biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry*, 17: 1473-80.
- PERNOLLET, J.C. 1982. Les corpuscules proteiques des graines, stade transitoire de vacuoles specialisees. *Physiol. Veg.* 20: 259-76.
- PERNOLLET, J.C. e MOSSÉ, J., 1983. Structure and location of legume and cereal seed storage proteins. In: Dausant, J.; Mossé, J. e Vaughan, V. ed. *Seed proteins*. London, Academic. p. 155-91.
- POGGIANI, F., 1971. Estudo do crescimento e da atividade da AIA-oxidase em algumas espécies do cerrado. In: Ferri, M.G. ed. *III Simpósio sobre o cerrado*. São Paulo, Ed. Edgar Blucher e EDUSP. p. 26-43.
- POLICARD, A.; BESSIS, A. e LOCQUIM, M., 1957. *Traité de microscopie: instruments et techniques*. Paris, Masson et Cie.
- POMEROY, M.K.; KRAMER, J.K.G.; HUNT, D.J. e KELLER, W.A., 1991. Fatty acid changes during development of zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 81: 447-54.
- RANDI, A.M., 1987. Aspectos fotomorfogênicos, bioquímicos e citoquímicos durante a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. Tese de Doutorado. Unicamp - Campinas - S.P.
- RANZANI, G., 1971. Solos do cerrado do Brasil. In: Ferri, M.G. ed. *III Simpósio sobre o cerrado*. São Paulo, Ed. E. Blucher e EDUSP. p. 26-43.
- RAIWITSCHER, F.; FERRI, M.G. e RACHID, M., 1943. Profundidade dos solos e vegetação em campos cerrados do Brasil meridional. *An. Acad. brasil. Ciênc.*, 15: 267-94.
- REIS, A.C.S., 1971. Climatologia dos cerrados. In: Ferri, M.G. ed. *III Simpósio sobre o cerrado*. São Paulo, Ed. E. Blucher e EDUSP. p. 15-25.
- RIBEIRO, J.F.; SILVA, J.C.S. e AZEVEDO, L.G. de, 1982. Estrutura e composição florística em tipos fisionômicos dos cerrados e sua interação com alguns parâmetros do solo. In: *Anais XXXII Congresso Nacional de Botânica*. Teresina.(S.B.B., ed.). p. 181-98.
- RIZZINI, C.T., 1965. Experimental studies on seedlings development. *Ann. Missouri Bot. Garden*, 52: 410-26.

- RIZZINI, C.T., 1971. **Plantas do Brasil: árvores e madeiras úteis do Brasil.** São Paulo, E. Blucher e EDUSP, p. 26-43.
- RIZZINI, C.T. e HERINGER, E.P., 1962. Studies on the underground organs of trees and shrubs from some southern Brazilian Savannas. **Anais Acad. bras. Ciênc., 34: 235-47.**
- ROBINSON, S.P. e WALKER, D.A., 1981. Photosynthetic carbon reduction cycle. In: Hatch, M.D. e Boardman, N.K., eds. **The Biochemistry of Plants. Photosynthesis.** p. 194-234.
- SALISBURY, F.B. e ROSS, C.W., 1992. **Plant physiology.** Belmont, Wadsworth Publishing Company. 540 p.
- SASSAKI, R.M. 1991. Desenvolvimento inicial de *Dalbergia miscolobium*. Tese de Mestrado. Unicamp - Campinas - S.P.
- SASSAKI, R.M. e FELIPPE G.M., 1992. Remoção dos cotilédones e desenvolvimento inicial de *Dalbergia miscolobium*. **Revta brasil. Bot., 15: 5-16.**
- SASSAKI, R.M. e FELIPPE, G.M., 1995. Sistema reprodutivo de *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae). **Resumos do XLVI Congresso Nacional de Botânica.** Ribeirão Preto, São Paulo, p. 243.
- SCALA, J.; PATRICK, C. e MACBETH, G., 1969. Gibberelic and castor bean fructose 1-6 diphosphatases. **Phytochem., 8: 37-44.**
- SCOTT Jr., T.A. e MELVIN, E.H., 1953. Determination of dextran with anthrone. **Anal. Chem., 25: 1656-61.**
- SENO, M.S., 1993. Composição e morfologia de feijão Guandu, Lab Lab e Mucuna. Tese de Mestrado. Unicamp - Campinas - S.P.
- SENO, M.S.; GOMES, L. e CORTELAZZO. A.L., 1995. Caracterização do material de reserva em feijão Guandu, Lab Lab e Mucuna. **Bragantia, submetido.**
- SHANON, J.C., 1968. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. **Res. Bull., 842: 1-8.**
- SHOWALTER, .M., 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. **Plant cell, 5: 9-23.**

- SLABAS, A.R.; DAVIES, C.; HELLYER, A.; MACKINTOSH, R.W.; SHELDEN, P.; HARDIE, D.G.; KEKWICK, R.G.O. e SAFFORD, R., 1988. Molecular Structure of fatty acid synthetizing enzymes from developing seeds of oil seed rape. In: Pinfield, N.J. e Stobart, A.K. ed. **Plant lipids: targets for manipulation**. London, British Plant Growth Regulator Group. p. 1-9.
- SMITH, D.L., 1974. A histological and histochemical study of the cotyledons of *Phaseolus vulgaris*, L. during germination. **Protoplasma**, 79: 41-57.
- SNEDECOR, G.N., 1962. **Statistical Methods**. The Iowa State University Press, Ames. 534 p.
- SOLBRIG, O.T., 1980. Genetics Structure of Plant Populations. In: O.T., Solbrig ed. **Demography and Evolution in Plant Population**. Berkley, Univ. of California Press.
- SOMOGYI, M.A., 1945. A new reagent for the determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, 160: 61-68.
- SPRAGG, S.P. e YEMM, E.W., 1959. Respiratory mechanisms and the changes of glutathione and ascorbic acid in germinating peas. **J. Exp. Bot.**, 10: 409-25.
- STOBART, A.K.; STYMNE, S. e HOGLAND, S., 1986. Safflower microsomes catalyse oil accumulation in vitro: a model system. **Planta**, 169: 33-7.
- TOMBS, M.P., 1967. Protein bodies of the soybean. **Plant Physiol.**, 42: 797-813.
- TZEN, J.T.C.; CAO, Y.Z.; LAURENT, P.; RATNAYAKE, C. e HUANG, A.H.C., 1993. Lipids, proteins and structure of seed oil bodies from diverser species. **Plant Physiol.**, 101: 267-76.
- VAN DER WILDEN, W.; HERMAN, E.M. e CHRISPEELS, M.J., 1980. Protein bodies as autophagic organelles. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 77: 428-32.
- VAN ONCKELEN, H.A.; CAUBERGS, R. e DE GREEF, J.A., 1977. Effect of light treatment and endogenous growth hormones on alfa and beta amylase activities in cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Cell Physiol.**, 18: 1029-40.
- VIDAL B.C., 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondrial ossification. **Cell. Mol. Biol.**, 22: 45-64.

- VIDAL,, B.C., 1987. Métodos em biologia celular. In: Vidal, B.C. e Mello M.L.S. ed. **Biologia Celular**. Rio de Janeiro. Atheneu. p. 5-39.
- VIDAL, B.C. e PIMENTEL, E.R., 1985. Caracterização bioquímica, topoquímica e estrutural dos corpos protéicos do feijão macuco ou jacatupé (*Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. **Revta brasil. Bot.**, **8**: 223-9.
- YOMO, H. e SRINIVASAN, K., 1973. Protein breakdown and formation of protease in attached and detached cotyledons of *Phaseolus vulgaris*, L. **Plant Physiol.**, **52**: 671-3.
- YOMO, H. e VARNER, J.E., 1973. Control of the formation of amylases and proteases in the cotyledons of germinating peas. **Plant Physiol.**, **51**: 708-13.
- YOO, B.Y. e CHRISPEELS, M.J., 1980. The origin of protein bodies in developing soybean cotyledons: a proposal. **Protoplasma**, **103**: 201-04.
- WANG, S.; LIN Y. e HUANG, A.H.C., 1984. Lipase activities in the scutella of maize lines having diverse lipid content. **Plant Physiol.**, **76**: 837-39.
- WOLFF, I.A. e KWOLEK, W.F., 1971. Lipids of the leguminosae. In: Harborne, J.B. Boulter, D. e Turner, B.L. ed. **Chemotaxonomy of the leguminosae**. London, London Academic. p. 231-55.
- ZINGALES, B., 1984. Analysis of protein by sodium dodecyl-sulfatepolyacrilamide gel electrophoresis. In: Morel, C.M. ed. **Genes and antigens of parasites**. Rio de Janeiro, UNDP/World Bank/WHO/Fiocruz, pp: 357-63.