

**ÉMERSON COUTO DA ROCHA**

**FENOLOGIA E INFLUÊNCIA DO ALAGAMENTO NOS ASPECTOS  
FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE SEMENTES DE *Gymnanthes klotzschiana*  
MÜLL.ARG.**

Tese de conclusão apresentada ao Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Produção Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Magda de Oliveira

**Lages, SC  
2017**

COUTO DA ROCHA, ÉMERSON  
FENOLOGIA E INFLUÊNCIA DO ALAGAMENTO NOS  
ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE SEMENTES DE *Gymnanthes klotzschiana* MÜLL.ARG. / ÉMERSON COUTO DA ROCHA. - Lages, 2017.  
129 p.

Orientadora: Luciana Magda de Oliveira  
Co-orientador: Cristiano André Steffens  
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-  
Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2017.

1. Fenologia. 2. Germinação. 3. Alagamento. 4. Hipoxia. I. Magda de  
Oliveira, Luciana. II. André  
Steffens, Cristiano. Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-  
Graduação em Produção Vegetal. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo autor, com auxílio  
do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

## **ÉMERSON COUTO DA ROCHA**

### **FENOLOGIA E INFLUÊNCIA DO ALAGAMENTO NOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE SEMENTES DE *Gymnanthes klotzschiana* MÜLL.ARG.**

Tese de conclusão apresentada ao Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Produção Vegetal.

#### **Banca Examinadora**

Orientadora:

(Dra. Luciana Magda de Oliveira)  
UDESC

Membros:

(Dra. Andressa Vasconcelos Flôres)  
UFSC

(Dra. Heloisa Oliveira dos Santos)  
UFLA

(Dr. Anderson Cleiton José)  
UFLA

(Dr. Marcio Carlos Navroski)  
UDESC

Lages, 31/07/2017.



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado saúde e esperança para sempre buscar conhecimento para tentar contribuir um pouco para nossa sociedade.

Aos meus pais, Dourival Couto da Rocha e Delurdes Couto da Rocha, que nunca medirão esforços para oferecer a melhor educação e os valores da vida, para sempre buscar os meus objetivos de forma honesta.

À minha noiva Giovana Biezus, pelo amor e companheirismo, os quais foram fundamentais para meu crescimento profissional e humano.

Ao meu irmão Ederson Couto da Rocha, que sempre me apoiou e teve grande importância nesta minha formação acadêmica e no meu caráter.

À professora Luciana Magda de Oliveira, pelos ensinamentos repassados desde a graduação até o doutorado, bem como aos demais educadores que contribuíram para meu conhecimento e desenvolvimento intelectual.

A Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal pela oportunidade em desenvolver meu trabalho de pesquisa.

A FAPESC pela concessão da bolsa de doutorado.

A Universidade Federal de Lavras - UFLA, em especial a professora Heliosa Oliveira dos Santos, do Departamento de Agronomia, pelo grande apoio no desenvolvimento deste trabalho e seriedade.

Aos meus colegas de laboratório e de campo que me ajudaram a desenvolver o projeto de pesquisa, em especial: Romell Ribeiro Alves Dias, Patricia Liesch, Katiane Bagatini, Carolina Delgado Bittencourt e Louise Zago.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra estiveram presentes na minha vida, para seguir nesta caminhada de sucesso.



“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)



## RESUMO

O branquinho (*Gymnanthes klotzschiana*), pertencente ao Bioma Mata Atlântica, ocorrendo naturalmente em solos úmidos. Neste trabalho foi analisada a fenologia e suas relações com fatores climáticos. Aspectos fisiológicos e bioquímicos em sementes dessa espécie também foram avaliados, com o objetivo de verificar o efeito do alagamento na germinação e no vigor, bem como na disponibilidade das reservas e na atividade de enzimas da respiração e ao efeito antioxidante ao longo do processo germinativo. Para isso foram colhidas sementes em duas áreas e submetidas a tratamentos de hipoxia. A área 1 de coleta possui efeito periódico do alagamento natural e a área 2 sem esse efeito. Para fenologia foram selecionados 10 indivíduos por área e avaliado: queda e brotamento de folhas, floração e produção de frutos imaturos e maduros. Em cada evento fenológico foi determinado o índice de atividade e intensidade, a sincronia no período e a correlação com fatores climáticos. Para a avaliação da qualidade, inicialmente as sementes de ambas as áreas foram submetidas: a um dia (T2), três dias (T3), cinco dias (T4), dez dias (T5) e 20 dias sob hipoxia (T6), além da testemunha (T1). Em seguida foram avaliados, curva de embebição, germinação, vigor, enzimas álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT); assim como, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA, proteínas solúveis totais, açúcares solúveis totais, amido total e lipídios totais. A espécie foi caracterizada como semidecídua. A floração e a frutificação foram anuais. Todos os tratamentos apresentaram três fases de germinação. As sementes da área 1 demonstraram os maiores valores de germinação e vigor. Apenas o T1 e o T2 não diferiram entre as áreas, sendo que a máxima germinação foi no T2 para área 1 que alcançou 90%. Houve aumento no teor de proteínas durante toda a germinação. A quantidade de açúcares solúveis e de amido aumentaram no primeiro momento e no início da fase III diminuíram. O teor de lipídios na fase III da germinação aumentou para o T3, T4, T5 e T6. O aumento do estresse pelo alagamento diminuiu a expressão da enzima ADH nas sementes da área 2, no entanto a MDH foi similar em ambas. A SOD apresentou um padrão similar nestas áreas e nos tratamentos avaliados, contudo a CAT foi expressa apenas no último ponto da curva nas sementes da área 2. Por fim, os índices de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA foram mais elevados durante a germinação nas sementes da área 2. Esses resultados indicam que a *G. klotzschiana* prefere solos encharcados para se desenvolver e se reproduzir. No início da germinação, as sementes de branquinho utilizam como fonte de energia e no metabolismo outros carboidratos e não os açúcares solúveis previamente disponíveis e o amido. Na fase III, açúcares solúveis e o amido são as principais fontes para a formação de uma nova plântula. As sementes da área 1 são mais adaptadas a hipoxia, pois utilizam o piruvato de maneira mais eficiente e foram mais efetivas no controle das EROs.

**Palavras Chaves:** Fenofases. Estresse ambiental. Germinação. Hipoxia.



## ABSTRACT

The branquinho (*Gymnanthes klotzschiana*), belonging to the Atlantic Forest Biome, occurring naturally in moist soils. In this work the phenology and its relations with climatic factors were analyzed. Physiological and biochemical aspects of seeds of this species were also evaluated, in order to verify the effect of flooding on germination and vigor, as well as the availability of reserves and the activity of respiratory enzymes and the antioxidant effect throughout the germination process. For this, seeds were harvested in two areas and submitted to hypoxia treatments. Collection area 1 has periodic effect of natural flooding and area 2 without this effect. For phenology, 10 individuals were selected per area and evaluated: leaf fall and budding, flowering and production of immature and mature fruits. In each phenological event, the index of activity and intensity, the synchrony in the period and the correlation with climatic factors were determined. In order to evaluate the quality, the seeds of both areas were initially submitted to one day (T2), three days (T3), five days (T4), ten days (T5) and 20 days under hypoxia (T6). Of the control (T1). The following variables were evaluated: imbibition curve, germination, vigor, enzymes alcohol dehydrogenase (ADH), malate dehydrogenase (MDH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT); As well as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA, total soluble proteins, total soluble sugars, total starch and total lipids. The species was characterized as semi-deciduous. Flowering and fruiting were annual. All treatments presented three stages of germination. The seeds of area 1 showed the highest values of germination and vigor. Only T1 and T2 did not differ between areas, and the maximum germination was in T2 for area 1, which reached 90%. There was an increase in protein content throughout the germination. The amount of soluble sugars and starch increased at the first moment and at the beginning of phase III decreased. Lipid content in stage III germination increased for T3, T4, T5 and T6. Increased flood stress decreased the expression of the ADH enzyme in the seeds of area 2, but the MDH was similar in both. SOD presented a similar pattern in these areas and in the evaluated treatments, however the CAT was only expressed at the last point of the curve in the seeds of area 2. Finally, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA indexes were higher during germination in the seeds of area 2. These results indicate that *G. klotzschiana* prefers soggy soils to develop and reproduce. At the beginning of germination, the seeds of branquinho use as energy source and metabolism other carbohydrates and not the previously available soluble sugars and starch. In phase III, solubles sugars and starch are the main sources for the formation of a new seedling. The seeds of area 1 are more adapted to hypoxia, because they use pyruvate more efficiently and were more effective in controlling ROS.

**Keywords:** Phenophases. Environmental stress. Germination. Hypoxia.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Disposição das folhas e morfologia dos frutos de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> . A: ramo com a disposição das folhas e frutos; B: aspecto extremo do fruto; C: ápice; D: representação do fruto; E: detalhe da coca; F: abertura da coca a partir do ápice; G: divisão da coca liberando a semente).....	24
Figura 2 – Ilustração do tronco (A), das folhas e inflorescência (B), fruto imaturo (C) e fruto maduro (D) de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> .....	24
Figura 3 – Morfologia das sementes de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> . A: vista ventral; B: corte longitudinal a face ventral; C: corte perpendicular a face ventral; m: micrópila; cr: carúncula; h: hilo; rf: rafe; cl: calaza; t: testa; tg: tégumem; ed: endosperma; eb: embrião; hr: eixo hipocótilo-radícula; ct: cotilédones .....	25
Figura 4 - Associação de dados climáticos com fenológicos em <i>Gymnanthes klotzschiana</i> para a área 1 (Lages - SC) por meio de dois métodos de análise .....	40
Figura 5 - Associação de dados climáticos com fenológicos em <i>Gymnanthes klotzschiana</i> para a área 2 (Capão Alto – SC) por meio de dois métodos de análise.....	44
Figura 6 - Curvas de embebição durante a germinação de sementes de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> coletadas da área 1 (Lages – SC) e na área 2 (Capão Alto - SC), quando submetidas a diferentes períodos de alagamento .....	60
Figura 7 - Disponibilidade de proteínas solúveis totais durante a germinação de sementes <i>Gymnanthes klotzschiana</i> , submetidas a diferentes períodos de alagamento.....	67
Figura 8 - Disponibilidade de açúcares solúveis totais durante a germinação de sementes <i>Gymnanthes klotzschiana</i> , submetidas a diferentes períodos de alagamento.....	69
Figura 9 - Mobilização de amido durante a germinação de sementes <i>Gymnanthes klotzschiana</i> , submetidas a diferentes períodos de alagamento.....	71
Figura 10 - Disponibilidade de lipídios totais durante a germinação de sementes <i>Gymnanthes klotzschiana</i> , submetidas a diferentes períodos de alagamento.....	73
Figura 11 - Expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> coletadas em Lages, SC (área 1) e Capão Alto (área 2), quando submetidas ao efeito de diferentes períodos de estresse pelo alagamento em quatro pontos da curva de embebição .....	85
Figura 12 - Índices quantitativos da enzima álcool desidrogenase (ADH) durante a germinação de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes .....	86

Figura 13 - Expressão da enzima malato desidrogenase (MDH) em sementes de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> coletadas em Lages, SC (área 1) e Capão Alto (área 2), quando submetidas ao efeito de diferentes períodos de estresse pelo alagamento em quatro pontos da curva de embebição .....	89
Figura 14 - Índices quantitativos da enzima malato desidrogenase (MDH) durante a germinação de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes.....	90
Figura 15 – Expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> coletadas em Lages, SC (área 1) e Capão Alto (área 2), quando submetidas ao efeito de diferentes períodos de estresse pelo alagamento em quatro pontos da curva de embebição .....	94
Figura 16 - Expressão da enzima catalase (CAT) em sementes de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> coletadas em Lages, SC (área 1) e Capão Alto (área 2), quando submetidas ao efeito de diferentes períodos de estresse pelo alagamento em quatro pontos da curva de embebição ....	95
Figura 17 - Índices quantitativos da enzima superóxido dismutase (SOD) durante a germinação de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes.....	96
Figura 18 - Índices quantitativos da enzima catalase (CAT) durante a germinação de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes.....	97
Figura 19 - Índices quantitativos do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) durante a germinação de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes.....	99
Figura 20 - Índices quantitativos da peroxidação lipídica (MDA) durante a germinação de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes.....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correlação de Spearman considerando os índices de atividade em distintas fenofases de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> entre dois períodos consecutivos de amostragem (maio/2014 e maio/2016) para a área 1 - Lages, SC.....	38
Tabela 2 - Correlação de Spearman considerando os índices de atividade em distintas fenofases em <i>Gymnanthes klotzschiana</i> e os fatores climáticos no período de maio/2014 e maio/2016 em Lages, SC.....	41
Tabela 3 - Correlação de Spearman considerando os índices de atividade em distintas fenofases de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> entre dois períodos consecutivos de amostragem (maio/2014 e maio/2016) para área 2 - Capão Alto, SC.....	42
Tabela 4 - Correlação de Spearman considerando os índices de atividade em distintas fenofases de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> e os fatores climáticos no período de maio/2014 e maio/2016 em Capão Alto, SC.....	45
Tabela 5 - Germinação, primeira contagem e IVG em sementes de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> coletadas em duas áreas.....	63
Tabela 6 - Porcentagem de plântulas anormais (PA), sementes mortas (SM), sementes vazias (SV), sementes não germinadas (SNG), e sementes viáveis (SVIA) de <i>Gymnanthes klotzschiana</i> colhidas em duas áreas e submetidas a seis períodos de alagamento .....	65



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACS</b>	Acetyl-CoA Sintase
<b>ADH</b>	Álcool Desidrogenase
<b>ALDH</b>	Aldeído Desidrogenase
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>CAP</b>	Circunferência a Altura do Peito
<b>CAC</b>	Ciclo do Ácido Cítrico
<b>CAT</b>	Catalase
<b>DAP</b>	Diâmetro na Altura do Peito
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>FOM</b>	Floresta Ombrófila Mista
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>IVG</b>	Índice de Velocidade de Germinação
<b>MDA</b>	Malondialdeido
<b>MDH</b>	Malato Desidrogenase
<b>NADH</b>	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio Molecular
<b>O<sub>2</sub><sup>1</sup></b>	Oxigênio Singletto
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical Superóxido
<b>OAA</b>	Oxalacetato
<b>OH°</b>	Radical Hidroxila
<b>PC</b>	Primeira Contagem
<b>PDC</b>	Piruvato Descarboxilase
<b>PDH</b>	Piruvato Desidrogenase
<b>PPi</b>	Pirofosfato
<b>PRADA</b>	Projeto de Recomposição de Áreas Degradadas e Alteradas
<b>PRPC</b>	Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	21
1.1 OBJETIVOS .....	22
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	23
2.2 CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE .....	23
2.2 FENOLOGIA .....	25
2.3 ESTRESSE PELO ALAGAMENTO .....	26
2.4 RESPIRAÇÃO CELULAR COM RESTRIÇÃO NA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO E ADAPTABILIDADE A ESSA CONDIÇÃO .....	27
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E MECANISMOS ANTIOXIDANTES .....	28
2.6 ALAGAMENTO X GERMINAÇÃO E VIGOR .....	29
<b>CAPÍTULO I .....</b>	33
RESUMO .....	33
ABSTRACT .....	33
1 INTRODUÇÃO.....	34
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3 RESULTADOS .....	37
<b>3.1 Lages (área 1) .....</b>	37
<b>3.2 Capão Alto (área 2) .....</b>	41
4 DISCUSSÃO.....	45
5 CONCLUSÃO.....	49
<b>CAPÍTULO II.....</b>	51
RESUMO .....	51
ABSTRACT .....	52
1 INTRODUÇÃO.....	52
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
<b>2.1 Seleção de matrizes, colheita, extração e beneficiamento das sementes .....</b>	54
<b>2.2 Tratamentos de alagamentos .....</b>	55
<b>2.3 Obtenção das curvas de embebição e pontos selecionados para as análises bioquímicas .....</b>	55
<b>2.4 Análises físicas (Determinação da massa seca e umidade) .....</b>	55
<b>2.5 Análises fisiológicas (germinação e vigor) .....</b>	56
<b>2.6 Análises bioquímicas .....</b>	56
<b>2.7 Extração e determinação de proteínas solúveis totais .....</b>	56
<b>2.8 Extração e determinação de açúcares solúveis totais .....</b>	57

<b>2.9 Extração e determinação de amido .....</b>	57
<b>2.10 Extração e determinação de lipídios totais .....</b>	58
<b>2.11 Análise estatística .....</b>	58
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	58
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	74
<b>CAPÍTULO III.....</b>	77
<b>RESUMO .....</b>	77
<b>ABSTRACT.....</b>	77
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	78
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	79
<b>2.1 Seleção de matrizes, colheita, extração e beneficiamento das sementes .....</b>	79
<b>2.2 Tratamentos de alagamentos .....</b>	80
<b>2.3 Obtenção das curvas de embebição e pontos selecionados para as análises enzimáticas e bioquímicas .....</b>	80
<b>2.4 Expressão enzimática – preparação das amostras.....</b>	81
<b>2.5 Preparação do gel para as enzimas – Nativa Page.....</b>	81
<b>2.6 Corrida eletroforética .....</b>	81
<b>2.7 Revelação das enzimas.....</b>	82
<b>2.8 Quantificação dos pixels das enzimas.....</b>	82
<b>2.9 Teores de Peróxido de hidrogênio .....</b>	83
<b>2.10 Peroxidação lipídica .....</b>	83
<b>2.11 Análise estatística .....</b>	83
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	84
<b>3.1 Processo respiratório sob restrição de oxigênio durante a germinação.....</b>	84
<b>3.2 Atividade antioxidante.....</b>	93
<b>3.3 Conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peroxidação lipídica (MDA).....</b>	98
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	103
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	105
<b>REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS.....</b>	107

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

*Gymnanthes klotzschiana* Müll.Arg., conhecida popularmente como branquinho, foi a espécie selecionada neste estudo por apresentar como umas de suas características principais, a tolerância em se desenvolver tanto em ambientes periodicamente alagados como em locais não alagados.

Sabe-se que a maioria dos projetos de recomposição de áreas degradadas e alteradas (PRADA) não tem êxito, sendo o baixo conhecimento da real adaptabilidade das sementes e mudas às novas áreas de colonização um dos motivos. Diante disso, a seleção de matrizes e sementes se torna fundamental nesse processo de restabelecimento de uma nova floresta madura autossustentável.

Durante o desenvolvimento, as plantas estão sujeitas a múltiplos fatores de estresse, os quais irão interferir na sua fenologia, na sobrevivência e em seu crescimento (BOYER, 1982). Desta forma, devemos compreender os processos fisiológicos subsequentes a determinado tipo de estresse, visando entender os mecanismos de aclimatação/adaptação dos vegetais (TAIZ e ZEIGER, 2013).

As respostas dos organismos a um ou vários agentes estressantes são distintas, as quais são reguladas geneticamente. Na natureza, a intensidade destas respostas pode variar até entre indivíduos da mesma espécie. A idade, o grau de adaptação e a atividade sazonal ou diária também influenciam no contexto interespecífico e intraespecífico (KOZLOWSKI, 1997; LYTLE e POFF, 2004).

Embora haja muita informação em relação à tolerância de plantas há algum tipo de estresse biótico ou abiótico, há poucos estudos sobre esse assunto em nível de sementes (SONG et al., 2005). Estresses ambientais estão direta ou indiretamente ligados a alterações no padrão de proteínas/enzimas específicas (MACHADO NETO et al., 2001), assim como em outros aspectos bioquímicos e também fisiológicos.

O grande número de empreendimentos hidroelétricos existentes e que vem sendo construídos e por consequência a formação de extensas áreas que se tornaram alagadas e potencialmente alagadas, além da grande devastação das nossas matas ciliares, aliado ao baixo número de informações de como se comporta a germinação de sementes frente à baixa disponibilidade de oxigênio, nortearam esse trabalho.

## 1.1 OBJETIVOS

Avaliar os aspectos fenológicos do branquinho em dois ambientes (sob efeito do alagamento e sem efeito do alagamento), relacionando as fenofases vegetativas e reprodutivas com as condições climáticas locais e com o alagamento.

Avaliar aspectos fisiológicos e bioquímicos em sementes recém coletadas de branquinho oriundas de dois ambientes (área periodicamente alagada e área não alagada), com o objetivo de identificar o efeito dessas áreas sob esses aspectos.

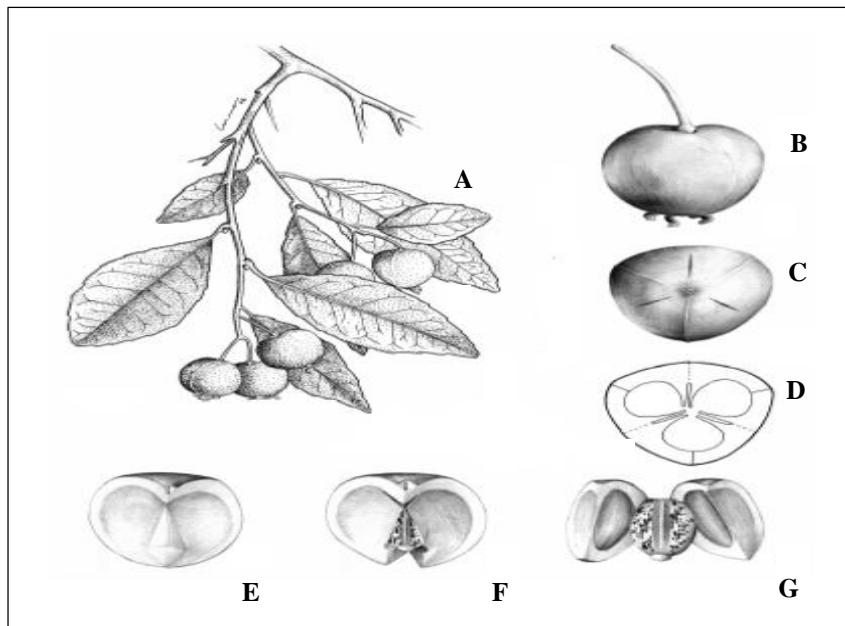
Estudar os aspectos fisiológicos e bioquímicos em sementes de branquinho oriundas dos dois ambientes, e submetê-las ao efeito do alagamento controlado, visando identificar as implicações da falta de oxigênio ao longo do processo germinativo e as estratégias por elas utilizadas para tentar concluir essa etapa de seu desenvolvimento.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.2 CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

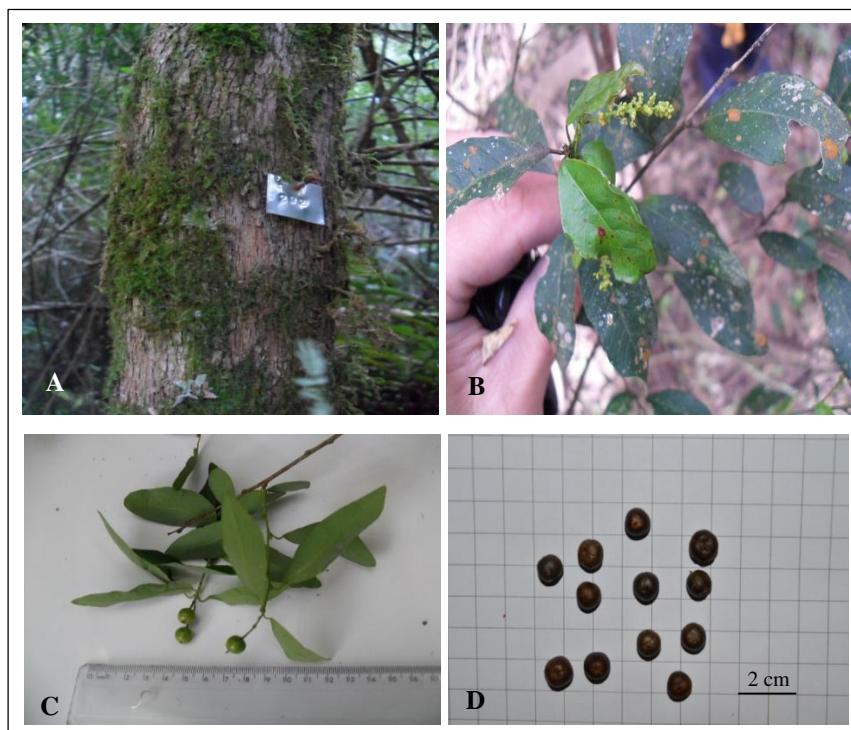
A *Gymnanthes klotzschiana*, anteriormente conhecida como *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L.B. Sm. & Downs, pertence ao clado Eurosideas I, ordem Malpighiales, família Euphorbiaceae (SOUZA e LORENZI, 2005). Possui hábito arbóreo com altura que pode variar de 5 a 15 metros e é considerada pioneira na sucessão ecológica secundária (LORENZI, 2002). Essa espécie ocorre predominante nos três estados da região sul do Brasil, preferindo povoar as matas ciliares de diversas formações florestais do Bioma Mata Atlântica (CURCIO, 2006). A casca do tronco principal é castanho-acinzentada, com fissuras verticais e descamação em pequenas tiras. Suas folhas são simples, alternas, com estípulas, levemente discolores (SOBRAL et al. 2006), conforme demonstram as figura 1 e 2. As flores são pouco vistosas, amarelas, dispostas em inflorescências do tipo espiga e terminais (SOBRAL et al. 2006) (Figura 2). Os frutos são secos, do tipo cápsula, tricoca, com três sementes por fruto (COSMO et al. 2010) (Figuras 1 e 2). As sementes tem formato oval, possuem cicatrizes e podem ter colocação marrom ou serem manchadas. Internamente possuem endosperma e o embrião é composto pelos cotilédones e eixo hipocótilo-radícula. (Figura 3). Possui potencial ornamental, econômico, medicinal e principalmente ecológico (LORENZI, 2002), sendo indicada na recuperação de áreas, especialmente onde ocorre alagamento periódico.

Figura 1 – Disposição das folhas e morfologia dos frutos de *Gymnanthes klotzschiana*. A: ramo com a disposição das folhas e frutos; B: aspecto extreño do fruto; C: ápice; D: representação do fruto; E: detalhe da coca; F: abertura da coca a partir do ápice; G: divisão da coca liberando a semente



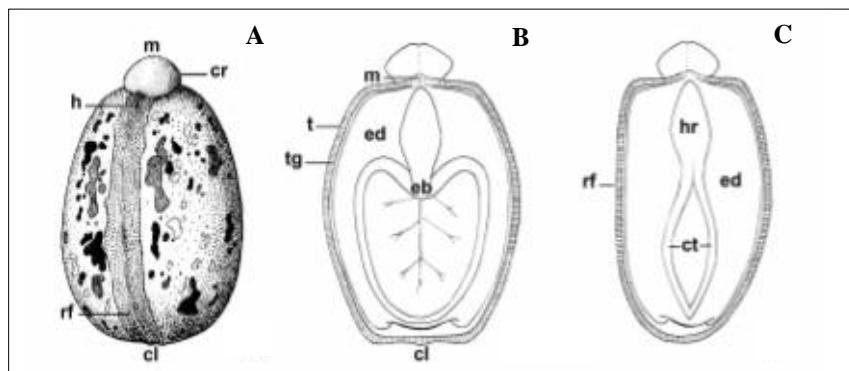
Fonte: Adaptado Cosmo et al. (2010).

Figura 2 – Ilustração do tronco (A), das folhas e inflorescência (B), fruto imaturo (C) e fruto maduro (D) de *Gymnanthes klotzschiana*



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Figura 3 – Morfologia das sementes de *Gymnanthes klotzschiana*. A: vista ventral; B: corte longitudinal a face ventral; C: corte perpendicular a face ventral; m: micrópila; cr: carúncula; h: hilo; rf: rafe; cl: calaza; t: testa; tg: tégumem; ed: endosperma; eb: embrião; hr: eixo hipocótilo-radícula; ct: cotilédones



Fonte: Cosmo et al. (2010)

## 2.2 FENOLOGIA

A fenologia estuda a ocorrência de eventos biológicos repetitivos, como a emissão de novas folhas, a desfolha, a floração e a frutificação, esses correlacionados com os efeitos bióticos e abióticas do meio (ROBERTS et. al., 2015). Variáveis ambientais como temperatura, fotoperíodo e precipitação são fundamentais para desencadear as fenofases durante o crescimento das plantas (HAMANN 2004). No entanto, a disponibilidade de oxigênio no solo é o fator abiótico que mais exerce influência na fenologia das espécies vegetais superiores (SINGH e SINGH, 1992). Cabe destacar que os padrões fenológicos das espécies também são determinados pelo seu caráter genético (POLLARD e BRIGGS, 1982).

O grande variabilidade de fatores bióticos e abióticos presente no meio ambiente estão intimamente ligados a periodicidade e sazonalidade das fenofases e por consequência no padrão de crescimento das plantas (TESFAYE et al., 2011). Marchioreto et al. (2007) avaliaram fenofases vegetativas e reprodutivas em nove espécies árvoreas em uma floresta psamófila no sul do Brasil e concluíram que houve correlação dessas fenofases com temperaturas médias e comprimento do dia. Pereira e Tonini (2012) estudaram o padrão fenológico em *Carapa guianensis* Aubl. em uma floresta no sul de Roraima e observaram que a desfolha esteve relacionada com a época de estiagem.

A produção sementes com alto poder germinativo e vigor, especialmente em ambiente natural, está atrelado as condições de preservação da comunidade vegetal, assim como do solo e do clima, o qual é variável ao longo dos anos. Desta forma, a fenologia também se torna uma

ferramenta indispensável para acompanhar a produção de frutos em matrizes previamente selecionadas, visando a coleta de sementes com elevada qualidade fisiológica.

### 2.3 ESTRESSE PELO ALAGAMENTO

Fatores abióticos determinam vários tipos de estresse ambiental, dentre eles, o efeito da baixa concentração de oxigênio. O alagamento do solo, bem como a sua compactação, são as principais causas da baixa disponibilidade de oxigênio molecular – O<sub>2</sub> (LARCHER, 2004). Geralmente, os vegetais que passam por inundações periódicas e aqueles que as toleram devem alterar seu metabolismo, modificando a via respiratória de forma a suportar condições hipóxicas e eventualmente anóxicas (DAT et al., 2004). Nos últimos anos, muitos estudos têm tentado elucidar as estratégias adotadas pelas plantas, que as permitem crescerem, desenvolverem e sobreviverem sob essa condição (JOLY e BRÄNDLE, 1995).

A falta de oxigênio (anoxia) ou a reduzida concentração de oxigênio no solo (hipoxia) para as plantas é comum no meio ambiente e pode ser causada por muitas razões (LARCHER, 2004). Uma delas é pela inundação temporária exercida pelas cheias dos rios ao longo das suas margens (JUNK, 1993). Quando as temperaturas são baixas e as plantas estão com seu metabolismo praticamente paralisado, o esgotamento de oxigênio é muito lento e as consequências são praticamente inofensivas (TAIZ e ZEIGER, 2013).

As raízes obtêm oxigênio suficiente para respiração aeróbia diretamente do espaço gasoso do solo. Entretanto, para o oxigênio estar disponível nas concentrações exigidas pelas plantas, o solo deve estar bem drenado e estruturado. Contudo, as vezes o solo pode se tornar inundado, quando ele tem dificuldades na drenagem ou quando a chuva ou a irrigação for excessiva (TAIZ e ZEIGER, 2013). Além disso, quando há o alagamento, a difusão dos gases da atmosfera até o solo é demasiadamente afetada e as trocas gasosas são reduzidas (JACKSON e COLMER, 2005).

Embora as raízes possam respirar anaerobicamente, caso esta condição se estenda por algumas horas, isso poderá ocasionar mudanças no metabolismo da planta (LARCHER, 2004). A baixa disponibilidade de O<sub>2</sub>, induzida pelas inundações, leva a uma notável resposta biológica, que inclui a acumulação de espécies reativas de oxigênio (EROs), inativação de enzimas citoplasmáticas, alterações na fermentação de açúcares, danos nas membranas celulares, queda de pH citoplasmático, inibição da síntese protéica e aceleração da degradação proteica (KREUZWIESER e RENNENBERG, 2014).

## 2.4 RESPIRAÇÃO CELULAR COM RESTRIÇÃO NA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO E ADAPTABILIDADE A ESSA CONDIÇÃO

Sob total ou parcial privação de oxigênio, a respiração na fase de glicólise pode ser a fonte principal de energia para as células, porque esta etapa é única que acontece sem a presença de oxigênio, pois o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa não funcionam sem esta molécula. Para esta tarefa, as rotas fermentativas, que estão localizadas no citosol, reduzem o piruvato (produto final da glicólise) para reciclar no NADH (dinucleótido de nicotinamida e adenina), que é fonte de energia. A eficiência da fermentação anaeróbia na produção de energia é de aproximadamente 4% por molécula de sacarose, sendo que a maioria da energia disponível permanece no subproduto reduzido da fermentação: lactato ou etanol (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Durante o episódio de anoxia, o piruvato produzido pela glicólise é inicialmente fermentado a lactato. A produção de prótons pela glicólise e outras rotas metabólicas, assim como o decréscimo da translocação de prótons através da membrana plasmática e do tonoplasto levam a redução do pH citosólico. Com pHs mais baixos, a atividade do lactato desidrogenase é inibida e a piruvato descarboxilase (PDC) é ativada, conduzindo a um aumento na fermentação de etanol e decréscimo na fermentação de lactato. Isso reduz o pH do citosol e diminui a capacidade da planta sobreviver um episódio de anoxia (TAIZ e ZEIGER, 2013). Devido à baixa eficiência na produção de energia na fermentação, uma maior taxa de glicólise é necessária para sobrevivência das células. As maiores taxas de glicólise são resultados das mudanças nos níveis de metabólitos glicolíticos, assim como do aumento na expressão de genes que codificam enzimas da glicólise e da fermentação (SACHS e HO, 1986).

A conversão do piruvato em etanol pela ação da PDC e da álcool desidrogenase (ADH), é a marca clássica da resposta ao alagamento (GRAVOT et al., 2016). Em *Arabidopsis thaliana*, os genes *ADH1*, *PDC1* e *PDC2* têm sido relatados como importantes contra a falta de oxigênio no solo (MITHRAN et al., 2014). O etileno é o responsável pela detecção da hipoxia em plantas pela síntese de fatores de transcrição utilizados na expressão dos genes relacionados com a fermentação (GIBBS et al., 2014).

A combinação exata de características bioquímicas que permite que algumas espécies possam tolerar ambientes anóxicos e hipóxicos por períodos longos não está completamente compreendida. Sabe-se que nessa condição, há expressão de genes que codificam muitas das proteínas de estresse anaeróbico, e desta forma a planta acaba se aclimatando a este tipo de situação ambiental. Após a aclimatação, a planta realiza a fermentação etanólica com maior capacidade, produzindo ATP (adenosina trifosfato) para manter seu metabolismo ativo,

controla o pH citosólico, armazena reservas para períodos prolongados, (LAKSHMANAN et al., 2013; LI et al., 2013), e aumenta a capacidade antioxidante intracelular (SINGAKI-WELLS et al., 2014).

Em sementes de *Brassica rapa*, Park e Hasenstein (2016) analisaram a germinação sob baixa concentração de oxigênio, e concluíram que em condições hipóxicas os açúcares solúveis degradaram-se mais rapidamente e genes relacionados relacionadas a glicólise e via da fermentação são induzidos para cima nessa condição. Estioko et al. (2014) avaliaram duas variedade de arroz, uma tolerante e outra intolerante ao alagamento e revelaram que a variedade de arroz tolerante (Khao Hlan On) aumentou a atividade da ADH e da PDC nas mudas durante a inundação em comparação com a variedade intolerante (IR 42), o que resultou em um maior crescimento inicial.

Quando há a presença de algum tipo de estresse ambiental, as plantas podem também diminuir seu crescimento e seu desenvolvimento (MELO et al., 2010). Por consequência, a acumulação de fotoassimilados tende a baixar e ser menos translocados, especialmente para as sementes em formação (BEWLEY et al., 2013).

## 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E MECANISMOS ANTIOXIDANTES

Como já exposto, o oxigênio é essencial para a maior taxa de produção de energia através da oxidação de compostos orgânicos (COMHAIR e ERZURUM, 2002). As sementes, bem como qualquer organismo que necessite de O<sub>2</sub>, produzem as chamadas “espécies reativas de oxigênio (EROs)” (DAMASCENO et al., 2002), especialmente quando expostas a condições estressantes.

Contudo, as EROs têm outros papéis, como ser um sinalizador inicial a baixa concentração de oxigênio no solo e até na prevenção de danos oxidativos em nível celular (BLOKHINA e FAGERSTEDT, 2010). Não obstante, a acumulação de EROs nas pontas das raízes induziu a morte celular em condições de excesso de água em *Pisum sativum* (CHENG et al., 2013).

De acordo com Andrade et al. (2010), em situações fisiológicas normais, os organismos encontram-se em condição de equilíbrio entre a produção de EROs e a presença de antioxidantes. No entanto, quando existir algum tipo de estresse ambiental, por exemplo hipoxia, pode haver um desequilíbrio entre esses componentes, o que pode causar uma série de alterações em nível celular, como a lipoperoxidação (ANDRADE et al., 2010), e danos a organelas celulares, ácidos nucleicos e proteínas (VALKO et al., 2007). A lipoperoxidação ou

peroxidação lipídica de membrana, causa vários problemas, como a perda de permeabilidade seletiva e pode ser utilizada como marcador de estresse oxidativo (MONTEIRO et al., 2011).

As EROs são produzidas a partir do oxigênio, o qual é bastante reativo devido a seu potencial redox (DOWNLING e SIMMONS, 2009). A instabilidade dessa molécula faz com que sejam sintetizados as seguintes moléculas: o oxigênio singletto ( $O_2^1$ ); o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH^\circ$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MAIA, 2006). O  $OH^\circ$  é o radical livre mais reativo e danoso ao sistema biológico, o qual causa danos no local onde for sintetizado, especialmente nas mitocôndrias (ANDRADE et al., 2010).

Os antioxidantes previnem a oxidação do substrato, que podem ser ácidos graxos insaturados presentes nas membranas celulares. Em condições normais, esses antioxidantes convertem as EROs em água e oxigênio para prevenir a grande produção desses compostos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Antioxidantes podem ser enzimáticos e não enzimáticos. Aqueles são denominados naturais, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O ácido ascórbico, o tocoferol, e o ácido  $\alpha$ -lipoico são exemplos de antioxidantes não enzimáticos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A SOD pertence ao grupo das metaloenzimas, a qual tem a função de proteger às células contra o radical superóxido. Essa enzima catalisa a reação de dismutação do  $O_2^-$  e que tem como produto o  $H_2O_2$  e o  $O_2$  (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005). A CAT é uma metaloproteína que está envolvida na reação de decomposição do  $H_2O_2$  para formar  $H_2O$  e  $O_2$  (RAHMAN et al., 2006).

Em sementes de *Melanoxyton brauna* Schott, Flores et al. (2014) avaliaram a atividade das enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase sob diferentes temperaturas durante a germinação, sendo que foi observado maior atividade das enzimas SOD e CAT quando as temperaturas foram menos ideias, indicando que essas enzimas são importantes no controle de espécies reativas de oxigênio. Quando houve maior estresse salino, Pinheiro et al. (2016) também relataram um aumento na presença da SOD e CAT em sementes *Cucumis melo* L. durante a germinação.

## 2.6 ALAGAMENTO X GERMINAÇÃO E VIGOR

Os efeitos do oxigênio na germinação das sementes é pouco estudado e complexo. Além disso, a maior parte das sementes necessita do oxigênio para completar seu processo

germinativo, mas isso depende da espécie e do grau de dormência que seus propágulos possuíam antes da germinação (BONACIN et al., 2006).

A germinação é caracterizada pelo padrão trifásico de embebição para a maioria das espécies que possuem sementes (MARCOS FILHO, 2015). A fase I tem início com reidratação dos tecidos, sendo esse processo puramente físico, devido à diferença de potencial hídrico da semente e do substrato. Nesta etapa ocorre o reparo de estruturas de membrana e dos ácidos nucleicos. Prodanovic et al. (2007) salientam que devido à rápida entrada de água e oxigênio pode haver um excesso de produção de EROs nesse momento. A fase II da germinação é marcada pela estabilização na absorção de água, sendo uma etapa preparatória para a emissão da radícula. Nessa fase ocorre a reorganização celular, síntese de novas proteínas, hidrólise e início da mobilização das reservas e a desintoxicação das EROs (WANG et al., 2015). Na fase III ocorre novamente a entrada de água na semente devido a produção interna de substâncias osmoticamente ativas responsáveis pela diminuição de potencial. Nesta etapa final, a translocação de reservas é mais intensa e finaliza com formação de uma plântula.

Como anteriormente citado, a embebição é um o primeiro evento fisiológico da germinação e para algumas espécies a água em excesso, ocasionada pela inundação por exemplo, pode induzir a dormência da semente (CORBINEAU e CÔME, 1995), bem como causar sua inviabilidade (MOLLARD et al., 2007).

A maioria das sementes de plantas terrestres que possuem alta taxa de germinação no solo, não germinam em um substrato com excesso de água, uma vez que estas perdem rapidamente a viabilidade sob tais condições (PAROLIN, 2009). Dessa forma, a inundação pode influenciar negativamente na germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas, porque estes eventos são ativados fisiologicamente sob um requerimento adequado de oxigênio (KOZLOWSKI e PALLARDY, 1997). Ferreira et al. (2006) testaram o efeito do alagamento na germinação de sementes de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) e foi constatado germinação acima de 80%, já que é uma espécie adaptada a essa condição. Contudo, Dantas et al. (2000) estudaram o efeito do alagamento nas sementes de *Zea mays* L. sob diferentes temperaturas e constataram que a partir de três dias de hipoxia a germinação decaiu em 40% e no sétimo dia de submersão não houve germinação; ademais temperaturas abaixo de 20°C e acima de 25°C também influenciaram na germinação e o vigor dessas sementes.

A germinação está intimamente associada ao ambiente ao qual a planta está adaptada, sendo as sementes sensíveis a numerosos sinais de seu ambiente, como luz, temperatura, umidade e oxigênio (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1989). Para Santos et al. (2007), a

germinação em si é considerada uma etapa crítica no ciclo do vegetal, por estar associada a vários fatores intrínsecos e extrínsecos.

O processo germinativo requer quantidades de água e oxigênio balanceadas para que a germinação ocorra com sucesso (DANTAS et al., 2000). No entanto, quando há excesso de água no substrato a disponibilidade de oxigênio para o embrião diminui, dificultando a germinação, bem como o vigor em muitas espécies (KOZLOWSKI e PALLARDY, 1997).

Sob o alagamento, a composição, a quantidade e a mobilização das reservas nas sementes (lipídios, proteínas, açúcares solúveis e amido) e as atividades das enzimas relacionadas com a produção de ATP são fundamentais para a germinação e crescimento inicial da plântula (DOLFERUS et al., 2003). As proteínas que são sintetizadas em resposta a anaerobiose são chamados os polipéptidos anaeróbias. A maioria das proteínas conhecidas que se acumulam nas plantas e nas sementes sob anoxia e hipoxia são enzimas que estão relacionadas com a degradação do amido e de sacarose, do ciclo da glicólise e da fermentação de etanol (LIAO e LIN, 2001).

O efeito do alagamento ou da falta de oxigênio também está relacionado a degradação de reservas nas sementes. Segundo Dantas et al. (2002), trabalhando com milho, o efeito do alagamento prejudicou a germinação das sementes, porque a falta de oxigênio afetou a produção de enzimas responsáveis pela degradação do amido (principal fonte de energia) e a mobilização das reservas até o eixo embrionário.



## CAPÍTULO I

### FENOLOGIA DE INDIVÍDUOS DE *Gymnanthes klotzschiana* MÜLL.ARG. DISTRIBUÍDOS EM DUAS FORMAÇÕES DO BIOMA MATA ATLÂNTICA COM E SEM INFLUÊNCIA DO ALAGAMENTO

#### RESUMO

Foi analisada a fenologia de indivíduos de *Gymnanthes klotzschiana* Müll.Arg em duas formações florestais do Bioma Mata Atlântica no sul do Brasil por período de dois anos, com o objetivo de verificar o comportamento de cinco fenofases e suas relações com o alagamento e demais fatores ambientais. A área 1 está localizada em Lages SC, na qual tem o efeito do alagamento periódico e a área 2, localizada em Capão Alto, SC sem o efeito do alagamento. Em cada área foram selecionados 10 indivíduos e avaliadas as seguintes fenofases: queda e brotamento de folhas, floração e produção de frutos imaturos e maduros. Para cada evento fenológico, foi determinado o índice de atividade e o de intensidade (Fournier), a sincronia no período e a correlação com fatores climáticos. O comprimento do dia se correlacionou com todas a fenofases e a precipitação total com nenhuma. A queda foliar nas duas áreas caracterizou a espécie como semi-decídua. Houve sincronia na queda foliar e no enfolhamento nas duas áreas durante os períodos de avaliação. A floração e a frutificação foram anuais, sendo que a maior produção de frutos ocorreu na área 1, indicando que as árvores de *G. klotzschiana* preferem ambientes sujeitos ao alagamento periódico para se desenvolver e reproduzir.

**Palavras Chaves:** Fenofases. Fatores abióticos. Estresse ambiental.

**Phenology of individuals of *Gymnanthes klotzschiana* Müll.Arg. Distributed in two formations of the Atlantic Forest Biome with and without the influence of flooding**

#### ABSTRACT

The phenology of *Gymnanthes klotzschiana* Müll.Arg individuals in two forest formations of the Atlantic Forest Biome in southern Brazil was analyzed for a period of two years, with the objective of verifying the behavior of five phenophases and their relationship with flooding and other factors environmental impacts. Area 1 is located in Lages SC, which has the effect of periodic flooding and area 2, located in Capão Alto, SC without the effect of flooding. In each

area 10 individuals were selected and evaluated the following phenophases: leaf fall and bud, flowering and production of immature and mature fruits. For each phenological event, the activity index and the intensity index (Fournier), the synchrony in the period and the correlation with climatic factors were determined. The length of the day correlated with all phenophases and total precipitation with none. Leaf fall in both areas characterized the species as semi-deciduous. There was synchronization in the foliar fall and the foliage in the two areas during the evaluation periods. Flowering and fruiting were annual, and the highest fruit yield occurred in area 1, indicating that *G. klotzschiana* trees prefer environments subject to periodic flooding to develop and reproduce.

**Keywords:** Phenophases. Abiotic factors. Environmental stress.

## 1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um dos biomas com maior biodiversidade do mundo (MITTERMEIER et al., 2005) e ao mesmo tempo um dos mais ameaçados (MYERS et al., 2000), restando apenas 12,4 % de sua cobertura original (Fundação SOS Mata Atlântica/INPE, 2017). A perda da biodiversidade é preocupante, já que a extinção de espécies ocasiona a diminuição de serviços ecossistêmicos e prejuízos socioeconômicos (ANDRADE e ROMEIRO, 2009).

De maneira resumida, a fenologia estuda a ocorrência de eventos biológicos repetitivos, como brotação foliar, floração e frutificação, esses correlacionados com os efeitos bióticos e abióticas do meio (ROBERTS et al., 2015). Essa ciência gera dados que apoiam programas de restauração/recomposição de áreas degradadas e manejo de áreas protegidas (REGO e LAVARONTI, 2007; MUHANGUZI e IPULET, 2011), e atualmente está sendo utilizada como uma ferramenta para monitorar as mudanças climáticas (RICHARDSON et al., 2012; MELAAS et al., 2016).

Durante o crescimento das plantas, fatores abióticos como temperatura, precipitação e fotoperíodo são essenciais para o desencadeamento de eventos fenológicos (HAMANN, 2004; TESFAYE et al., 2011), assim como o carácter genético das espécies (POLLARD e BRIGGS, 1982). Não obstante, a umidade do solo pode ser a principal variável ambiental na influência dos padrões fenológicos de uma espécie (SINGH e SINGH, 1992), especialmente para aquelas adaptadas a hipoxia.

As estações do ano são mais evidentes nas regiões temperadas do que em regiões tropicais, o que evidencia maior sazonalidade na fenologia vegetativa e reprodutiva em regiões

mais frias (BIANCHINI et al., 2006; SINGH e KUSHWAHA, 2006). Chuvas sazonais associadas à temperatura e fotoperíodo, podem gerar uma padrão fenológico sazonal em espécies florestais do sul do Brasil, como observado por Marques et al. (2004) e Bianchini et al. (2006).

O branquinho (*Gymnanthes klotzschiana*) é uma espécie pioneira da família Euphorbiaceae (KLEIN, 1960), que ocorre nos domínios do Bioma Mata Atlântica e sua dispersão natural se estende desde o sul de Minas Gerais até o Rio grande do Sul (CARVALHO, 2003). Dentre as formações florestais em que o branquinho pode ser encontrado estão a Floresta Estacional Semidecidual e a Floresta Ombrófila Mista (IBGE, 2012). A preferência por solos úmidos e aluviais faz com que essa espécie ocorra com maior densidade em áreas de matas ciliares (SILVA et al., 2012).

Levando em consideração a plasticidade do branquinho em colonizar diversos ambientes, a fragmentação florestal, bem como a necessidade de produção de sementes de qualidade visando semeadura direta ou a produção de mudas, objetivou-se com este trabalho avaliar os aspectos fenológicos vegetativos e reprodutivos da espécie *G. klotzschiana* e sua relação com fatores climáticos em duas áreas, uma sob efeito do alagamento periódico e outra área sem a presença do alagamento.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a coleta de dados foram analizadas duas áreas. A primeira localizada no município de Lages, SC (área 1), que está a uma altitude de aproximadamente 890 metros (Lat: -27.841221° e Long: 50.234878°). A área 2, localizada no município de Capão Alto, SC, está a uma distância aproximada de 65 km em linha reta da Área 1 e com altitude em torno de 930 metros (Lat: -28.196411° e Long: -50.752545°). De acordo Klein (1960) e IBGE (2012), a área 1 é caracterizada como Floresta Ombrófila Mista Aluvial, e a área 2 como Floresta Ombrófila Mista Montana em transição com a Floresta Estacional Semidecidual Montana.

A área 1 se caracteriza por ser um ambiente propício ao alagamento periódico, por estar em local de baixada e acompanhar o curso do Rio Caveiras. Esse fragmento possui aproximadamente 50 hectares, com predominância de indivíduos de branquinho de vários portes nos locais mais úmidos. A área 2 está inserida próxima ao Rio Pelotas, e acompanha um dos “braços” da área de alague da UHE Barra Grande, no entanto por estar em local íngreme não sofre o efeito do alagamento. Considerando a Resolução Conama 04/1994, a área 1 se enquadra

em vegetação secundária em estágio avançado de regeneração, e a área 2, como vegetação secundária em estágio médio, esta principalmente pela baixa ocorrência de indivíduos arbóreos emergentes.

O clima da região de Lages e Capão Alto é classificado segundo Köppen (OMETO, 1981), como Cfb, sendo temperado propriamente dito, com temperatura média no mês mais frio abaixo de 18 °C (mesotérmico), com verões frescos e temperatura média no mês mais quente abaixo de 22 °C, sem estação seca definida. Os dados meteorológicos foram obtidos da estação meteorológica convencional de Lages, SC (INMET, 2016).

Em cada área de estudo foram acompanhados 10 indivíduos, estando dentro do número sugerido por Fournier e Charpentier (1975). Apenas indivíduos acima de 20 cm de circunferência a altura do peito (CAP) foram selecionados nas duas áreas de estudo.

As observações foram mensais e se estenderam de maio de 2014 a maio de 2016. Foram avaliadas as seguintes fenofases: (1) queda foliar: quando as folhas estavam com coloração amarelada e caiam facilmente com o vento ou pela trepidação provocada na árvore; (2) enfolhamento: quando havia a presença de folhas pequenas ( $\leq 1$  cm de comprimento) de coloração verde; (3) florescimento: inflorescências com flores fechadas e abertas ao mesmo tempo; (4) fruto imaturo: quando os cápsulas estavam esverdeadas; (5) fruto maduro: quando os frutos apresentavam coloração marrom-escura. A determinação dos padrões de produção e queda de folhas seguiu a classificação proposta por Morellato et al. (1989), constituída por três categorias: decídua, semidecidua e perenifólia.

Os eventos fenológicos foram analisados pelo Índice de Atividade (método qualitativo), o qual avalia a presença ou ausência da fenofase no indivíduo, bem como a sincronia entre os indivíduos na população em relação a cada fenofase; e pelo Índice de intensidade de Fournier (FOURNIER, 1974), cujo valores obtidos ficam dentro uma escala semi-quantitativa de cinco categorias (0 a 4), com intervalo entre elas de 25%, desta forma permitindo estimar a porcentagem de intensidade da fenofase em cada indivíduo. Para este método, em cada mês é feito a soma dos valores de intensidade por indivíduo e dividido pelo valor máximo possível (número de indivíduos multiplicado por quatro). O valor final é multiplicado por 100 para transformá-lo em percentual.

Para testar o tipo de distribuição dos dados foi realizado o teste de Shapiro e Wilks. O sincronismo das fenofases entre períodos consecutivos de 12 meses foi testado por meio da correlação de Spearman (ZAR, 1996) utilizando os dados do índice de atividade. As relações entre as diferentes variáveis climáticas e o índice de atividade de cada fenofase foram testadas por meio da correlação de Spearman. Os dados climáticos (temperatura média máxima,

temperatura média mínima e precipitação total) foram obtidos mensalmente de maio/2014 a maio/2016 do INMET (2016). O comprimento do dia foi calculado pela fórmula  $N=2hn/15$ , em que N é o comprimento do dia, e hn o ângulo do horário ao nascer do sol, que é determinado por:  $hn = \text{acos}[-\tan(\phi)\tan(\delta)]$ , onde  $\phi$  é a latitude do local e  $\delta$  é a declinação solar. A declinação solar é calculada por  $\delta=23,45\text{sen}[360/365(284 + \text{NDA})]$  em que NDA é o número de dias do ano. Para a análise dos dados foi utilizado o programa BioEstat 5.0.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Lages (área 1)

A perda de folhas em *G. klotzschiana* apresentou sincronia entre os dois períodos fenológicos acompanhados (Tabela 1), sendo que esse resultado é reforçado pelos picos de atividade apresentados, os quais coincidiram entre junho e agosto de 2014 e de 2015 (Figura 4). Esta fenofase foi praticamente constante durante todo o período de estudo, pois se concentrou entre maio/2014 e outubro/2014, fevereiro/2015 e janeiro/2016 e março a maio de 2016. Os picos máximos de atividade (100%) foram de junho/2014 a agosto/2014, março/2015 a outubro/2015 e março/2016 a maio/2016, enquanto que a intensidade máxima (pico de intensidade) ocorreu em setembro/2014 (80%), agosto/2015 (80%) e maio/2016 (47,5%) (Figura 4). Desta forma, a queda mais expressiva das folhas pode ser notada em épocas mais frias. A queda foliar apresentou correlação significativa ( $p < 0,0001$ ) e negativa ( $r_s = -0,7860$ ) com relação ao comprimento do dia, ou seja, a medida que os dias são mais longos a perda de folhas se torna menos expressiva. Também essa fenofase demonstrou correlação negativa e significativa com a temperatura máxima média ( $r_s = -0,6308$ ;  $p = 0,0007$ ) e temperatura mínima média ( $r_s = -0,6319$ ;  $p = 0,0007$ ), o que ficou evidente que houve influência da temperatura na perda ou na manutenção das folhas (Figura 4 e Tabela 2).

Tabela 1 - Correlação de Spearman considerando os índices de atividade em distintas fenofases de *Gymnanthes klotzschiana* entre dois períodos consecutivos de amostragem (maio/2014 e maio/2016) para a área 1 - Lages, SC

Fenofase	$r_s$	p	n
Queda foliar	0,6144	0,0335*	12
Enfolhamento	0,6904	0,0129*	12
Floração	0,4411	0,1511	12
Fruto imaturo	0,6030	0,0379*	12
Fruto maduro	0,6647	0,1830	12

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

\* Valores significativos a 5% de probabilidade.

Houve correlação positiva no brotamento foliar entre os períodos consecutivos de amostragem (Tabela 1), indicando que este fenômeno tende a ocorrer em períodos específicos do ano. Isso ficou evidente, pois o enfolhamento ocorreu entre setembro e março no primeiro período de avaliação (2014/2015) e de setembro a fevereiro no segundo (2015/2016), conforme figura 4. Os picos de atividade foram observados em outubro/2014 (100%) e dezembro/2014 (100%) e de/ intensidade em outubro/2014 (35%). Em 2015, os valores mais elevados, considerando o índice atividade, foram em setembro e outubro (100%) e 2016 em fevereiro (90%). Entretanto, a intensidade máxima observada foi de 42,5% e 30%, em novembro/2015 e fevereiro/2016, respectivamente (Figura 4). Nessa fenofase houve correlação positiva e significativa para comprimento do dia ( $r_s = 0,7240$ ;  $p = < 0,0001$ ), temperatura máxima média ( $r_s = 0,4960$ ;  $p = 0,0116$ ) e temperatura mínima média ( $r_s = 0,4799$ ;  $p = 0,0152$ ), confirmando que esses fatores climáticos influenciam na presença ou ausência de novas folhas (Figura 4; Tabela 2). Os resultados demonstram que a síntese de novas folhas ocorre, de forma mais intensa, nas épocas mais quentes do ano e quanto maior são os comprimentos dos dias.

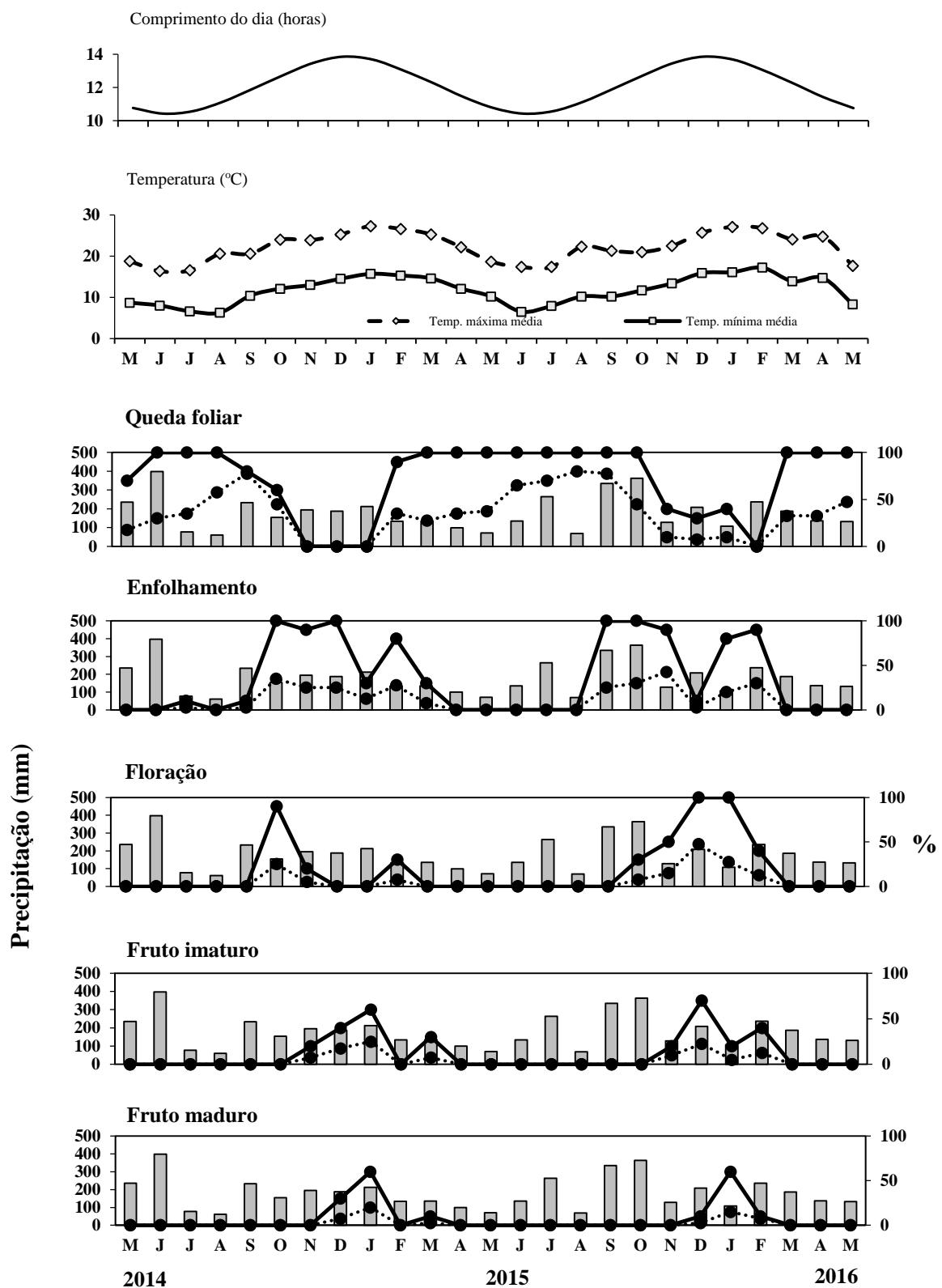
Com relação à presença de botões florais e antese nas inflorescências, não houve correlação entre os dois períodos de estudo (Tabela 1), pois os picos de atividade ocorreram em outubro/2014 (90%) e em dezembro/2015 e janeiro/2016, ambos com 100% de atividade (Figura 4). Os maiores índices de intensidade foram registrados em outubro/2014 (25%) e dezembro/2015 (47,5%) (Figura 4). A floração teve mais atividade e intensidade no segundo ciclo, ou seja, quando houve períodos críticos de alagamentos seguidos nesta área. Os resultados sugerem que a floração de *G. klotzschiana* tende a ocorrer no início da estação quente, pois essa fenofase apresentou correlação positiva e significativa com a temperatura máxima média ( $r_s = 0,5118$ ;  $p = 0,0089$ ), temperatura mínima média ( $r_s = 0,5645$ ;  $p = 0,0033$ ) e comprimento do dia ( $r_s = 0,6510$ ;  $p = 0,0004$ ) (Figura 4; Tabela 2).

A correlação de frutos imaturos e maduros foi significativa apenas para a primeira (Tabela 1), indicando que a produção de frutos/sementes imaturas tende a ocorrer em intervalos regulares durante os anos de avaliação, já que esses eventos ficaram restritos aos meses de novembro/2014 a março/2015 e de novembro/2015 a fevereiro de 2016 (Figura 4); a não significância para os frutos/sementes maduras pode ser explicado pela sua ocorrência em março de 2015 e não em 2016 e a ocorrência em fevereiro de 2016 e não em 2015. No entanto, a frutificação incidiu em intervalos similares, entre dezembro/2014 e janeiro/2015 (primeiro ciclo) e dezembro/2015 a fevereiro/2016 (ciclo seguinte) (Figura 4).

Os picos de atividade (frutos imaturos) foram de 60% em janeiro/2015 e 70% em dezembro/2015; a intensidade máxima alcançada foi de 25% em janeiro/2015 e 22,5 em dezembro do mesmo ano (Figura 4). A maior produção de frutos maduros se concentrou nos meses de janeiro de 2015 e 2016 (20% e 15%, respectivamente). O índice de atividade alcançado foi de 60% para estes períodos anteriormente citados (Figura 4).

As fenofases reprodutivas (produção de frutos imaturos e maduros) também apresentaram correlação significativa e positiva com os fatores climáticos comprimento do dia, bem como com as temperaturas médias mínima e máxima. Isso é um indicativo que esses fatores abióticos foram sazonais e influenciaram diretamente no comportamento reprodutivo dessa espécie, especialmente entre os meses mais quentes do ano. A precipitação total não foi significativa para nenhuma das fenofases avaliadas (Figura 4; Tabela 2).

Figura 4 - Associação de dados climáticos com fenológicos em *Gymnanthes klotzschiana* para a área 1 (Lages - SC) por meio de dois métodos de análise



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Percentual de índice de atividade (—●—) e intensidade de Fournier (- -●- -); Barras: precipitação total mensal no período.

Tabela 2 - Correlação de Spearman considerando os índices de atividade em distintas fenofases em *Gymnanthes klotzschiana* e os fatores climáticos no período de maio/2014 e maio/2016 em Lages, SC

<b>Atividade fenológica</b>	<b>Variável climática</b>	<b>r<sub>s</sub></b>	<b>p</b>	<b>n</b>
Queda foliar	Comprimento do dia	-0.7860	< 0.0001*	24
	Precipitação total	-0.2322	0.2639	24
	Temp. máxima média	-0.6319	0.0007*	24
	Temp. mínima média	-0.6308	0.0007*	24
Enfolhamento	Comprimento do dia	0.7240	< 0.0001*	24
	Precipitação total	0.3080	0.1341	24
	Temp. máxima média	0.4960	0.0116*	24
	Temp. mínima média	0.4799	0.0152*	24
Floração	Comprimento do dia	0.6510	0.0004*	24
	Precipitação total	0.0669	0.7507	24
	Temp. máxima média	0.5118	0.0089*	24
	Temp. mínima média	0.5645	0.0033*	24
Fruto imaturo	Comprimento do dia	0.7701	< 0.0001*	24
	Precipitação total	0.1395	0.5060	24
	Temp. máxima média	0.6967	0.0001*	24
	Temp. mínima média	0.7042	< 0.0001*	24
Fruto maduro	Comprimento do dia	0.6587	0.0003*	24
	Precipitação total	0.1100	0.6006	24
	Temp. máxima média	0.7074	< 0.0001*	24
	Temp. mínima média	0.6824	0.0002*	24

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

\*Valores significativos a 5% de probabilidade

### 3.2 Capão Alto (área 2)

Nessa área, os dois ciclos apresentaram sincronia quanto a perda de folhas (Tabela 2), sendo que essa etapa fenológica ocorreu predominantemente entre as estações mais frias (Figura 5). Isso demonstra um comportamento distinto ao observado na área de Lages, especialmente para ano de 2015, onde a perda de folhas foi contínua (Figura 5). Os picos de atividade ocorreram em junho-agosto de 2014 (100%) decaindo para 60% no mês seguinte, enquanto que o maior pico de intensidade foi atingido em agosto (índice de Fournier = 72,5%). Em 2015, os maiores índices de atividade foram observados de abril-julho (100%) e em 2016 em abril (80%) e maio (80%); intensidades mais elevadas foram registradas em junho/2015 (70%). (Figura 5). A queda foliar apresentou correlação negativa e significativa com o comprimento do dia ( $r_s = -0,8730$ ;  $p = < 0,0001$ ), temperatura máxima média ( $r_s = -0,7791$ ;  $p = < 0,0001$ ) e temperatura mínima média ( $r_s = -0,7814$ ;  $p = < 0,0001$ ), demonstrando que essa sazonalidade climática

interferiu nessa fenofase, pois a menor incidência de radiação solar, bem como baixas de temperaturas, influenciaram na perda de folhas (Figura 5; Tabela 4).

Tabela 3 - Correlação de Spearman considerando os índices de atividade em distintas fenofases de *Gymnanthes klotzschiana* entre dois períodos consecutivos de amostragem (maio/2014 e maio/2016) para área 2 - Capão Alto, SC

Fenofase	$r_s$	p	n
Queda foliar	0,8798	0,0002*	12
Enfolhamento	0,7326	0,0067*	12
Floração	0,0705	0,8277	12
Fruto imaturo	-0,2084	0,4236	12
Fruto maduro	-0,2084	0,5157	12

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

\* Valores significativos a 5% de probabilidade

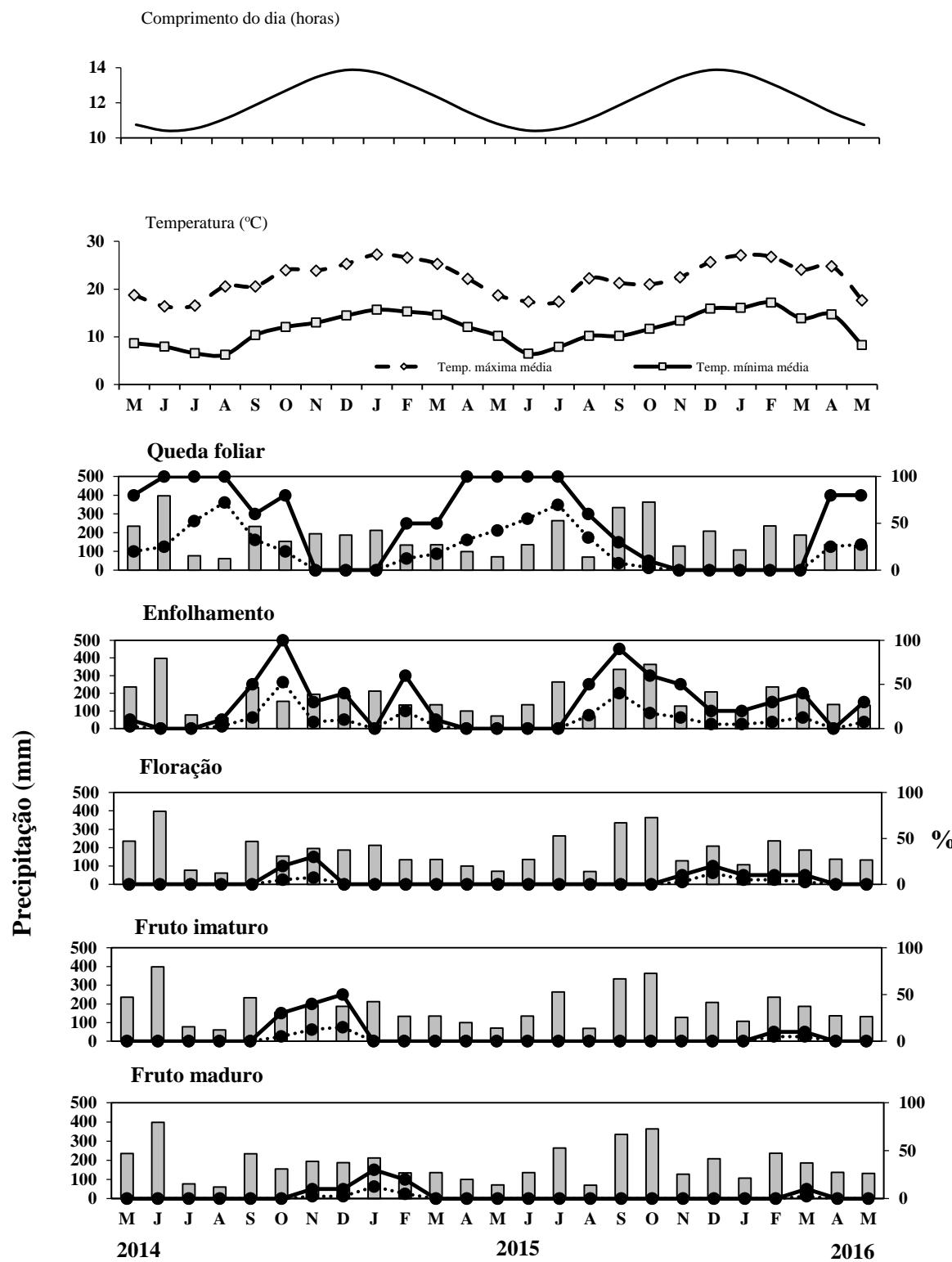
A síntese de novas folhas demonstrou correlação entre os dois períodos de estudo (Tabela 3), já que os indivíduos avaliados apresentaram essa fenofase de agosto a março em ambos os ciclos, predominando nas estações de primavera/verão. Os picos de atividade e intensidade coincidiram para os mesmos períodos, sendo que para outubro/2014 foi de 100% e 52,5%, respectivamente; enquanto que para setembro/2015 foram de 90% e 40% (Figura 5). O comprimento do dia foi o único fator ambiental que apresentou correlação significativa com o enfolhamento ( $r_s = 0,4613$ ;  $p = 0,0202$ ) (Figura 5 e Tabela 4).

Nenhuma fenofase reprodutiva apresentou correlação durante o intervalo de dois anos de avaliação (Tabela 3). A floração no primeiro ciclo ocorreu num período curto, de outubro a novembro, diferentemente do segundo, onde essa fenofase se estendeu de novembro a março 2015/2016. Nessa fenofase, tanto os picos de atividade quanto de intensidade foram baixos e coincidiram no tempo, sendo 30% para atividade e 7,5% para intensidade em novembro/2014 e 20% e 12,5% em dezembro/2015, respectivamente (Figura 5). A presença de frutos imaturos foi registrada de outubro a dezembro/2014 e no ciclo seguinte fevereiro-março/2016. Frutos maduros tiveram sua produção concentrada entre novembro-fevereiro 2014/2015 e apenas em março/2016. Para ambos os estádios de maturação, o índice de atividade foi baixo, atingindo nos frutos imaturos picos de 50% no primeiro ciclo (dezembro/2014) e 10% no segundo (fevereiro e março de 2016). Em frutos maduros a maior atividade alcançada foi de 30% em janeiro/2015 e 10% em março 2016 (Figura 5). Em relação aos picos de intensidade, em frutos imaturos ocorreram em dezembro/2014 (15%) e fevereiro e março de 2016 (5%), enquanto que

para os frutos maduros, os maiores índices de Fournier foram encontrados em janeiro 2015 (12,5%) e março/2016 (2,5%). Pelos resultados, ficou claro que os eventos fenológicos reprodutivos, predominam em atividade e intensidade no verão.

A floração se correlacionou positivamente com o comprimento do dia ( $r_s = 0,5829$ ;  $p = 0,0022$ ) e com as temperaturas média máxima ( $r_s = 0,4593$ ;  $p = 0,0209$ ) e mínima ( $r_s = 0,4955$ ;  $p = 0,0117$ ). Frutos imaturos tiveram correlação apenas com o comprimento do dia ( $r_s = 0,4504$ ;  $p = 0,0238$ ). Entretanto, frutos maduros não tiveram correlação apenas com a precipitação total (Tabela 4). Isso demonstra que a variável comprimento do dia teve maior influência na expressão dos eventos reprodutivos em *G. klotzschiana*, assim como as temperaturas, com exceção aos frutos imaturos (Figura 5; Tabela 4).

Figura 5 - Associação de dados climáticos com fenológicos em *Gymnanthes klotzschiana* para a área 2 (Capão Alto – SC) por meio de dois métodos de análise



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Percentual de índice de atividade (—●—) e intensidade de Fournier (- -●- -); Barras: precipitação total mensal no período.

Tabela 4 - Correlação de Spearman considerando os índices de atividade em distintas fenofases de *Gymnanthes klotzschiana* e os fatores climáticos no período de maio/2014 e maio/2016 em Capão Alto, SC

<b>Atividade fenológica</b>	<b>Variável climática</b>	<b>r<sub>s</sub></b>	<b>p</b>	<b>n</b>
Queda foliar	Comprimento do dia	-0,8730	< 0,0001*	24
	Precipitação total	-0,2680	0,1952	24
	Temp. máxima média	-0,7791	< 0,0001*	24
	Temp. mínima média	-0,7814	< 0,0001*	24
Enfolhamento	Comprimento do dia	0,4613	0,0202*	24
	Precipitação total	0,1490	0,4771	24
	Temp. máxima média	0,3019	0,1423	24
	Temp. mínima média	0,2389	0,2501	24
Floração	Comprimento do dia	0,5829	0,0022*	24
	Precipitação total	0,0570	0,7866	24
	Temp. máxima média	0,4593	0,0209*	24
	Temp. mínima média	0,4955	0,0117*	24
Fruto imaturo	Comprimento do dia	0,4504	0,0238*	24
	Precipitação total	0,1855	0,3746	24
	Temp. máxima média	0,3446	0,0916	24
	Temp. mínima média	0,3105	0,1308	24
Fruto maduro	Comprimento do dia	0,4846	0,0140*	24
	Precipitação total	0,0965	0,6465	24
	Temp. máxima média	0,4845	0,0141*	24
	Temp. mínima média	0,4028	0,0458*	24

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

\* Valores significativos a 5% de probabilidade

#### 4 DISCUSSÃO

Nos períodos avaliados (ciclos 2014/2015 e 2015/2016) e nas duas áreas, as fenofases estudadas em *G. klotzschiana* apresentaram sempre o índice de atividade superior ao índice de intensidade. A falta de coincidência entre os picos de atividade e intensidade foi mais evidente nas fases vegetativas, porque nestas o incremento cumulativo é mais lento e gradual (BENCKE e MORELLATO, 2002). Desta forma, ocorreu um maior número de indivíduos manifestando uma determinada atividade fenológica, mas sempre com menor intensidade. As fenofases apresentaram de uma forma geral, com exceção da precipitação, correlações significativas com os fatores abióticos, indicando que as variáveis climáticas tiveram um comportamento sazonal em ambas as áreas avaliadas e exerceiram influência direta no padrão fenológico da *G. klotzschiana*. Morellato e Leitão (1990) salientam que em ambientes pouco sazonais, fatores

ambientais tem menor influência sobre as fenofases. Marques (2007) comenta que o sul do Brasil é um ecótono entre o clima tropical e subtropical, o qual apresenta chuvas bem distribuídas durante o ano. Desta forma, os padrões fenológicos nessa região estão mais relacionados com a temperatura e o fotoperíodo (MORELLATO et al., 2000). No entanto, processos fisiológicos das plantas e pressões seletivas também podem determinar a periodicidade das fenofases (TALORA e MORELLATO, 2000).

O padrão de desfolhamento em *G. klotzschiana* caracterizou-se como semidecídua para as duas áreas avaliadas. Esse padrão de perda de folhas já tinha sido observado nessa espécie por Athayde et al. (2009) em uma floresta ribeirinha, onde a perda de 50% das folhas nos indivíduos avaliados ocorreu entre o período de junho e setembro. A queda foliar apresentou sazonalidade, quando foi demonstrado que esse evento ocorre predominantemente com maior atividade e intensidade no inverno; no entanto, no outono e na primavera acontece de maneira mais branda. A sazonalidade para a queda foliar foi mais fortemente correlacionada com temperaturas amenas e ao menor fotoperíodo, sugerindo que esses fatores podem funcionar como gatilhos na perda de folhas em *G. klotzschiana*. Marchioretto et al. (2007) e Athayde et al. (2009) também observaram em várias espécies arbóreas este cenário, onde a queda das folhas ocorre quando há baixas temperaturas e menor comprimento do dia. Marques et al. (2004) observaram comportamento semelhante para uma área de Floresta Ombrófila Mista, no estado do Paraná. Entretanto, em florestas tropicais a queda de folhas está frequentemente associada a períodos de estiagem (BULLOCK e SOLIS-MAGALLANES, 1990), fato que não ocorreu na região de estudo porque as chuvas foram bem distribuídas, justificando a falta de correlação com esta variável climática.

Mesmo que a precipitação não se correlacionou significativamente com a perda de folhas, para a área 1 esse fator ambiental teve efeito na desfolha, pois quando comparado com o ano anterior (2014), o desfolhamento foi mais pronunciado devido a chuvas mais severas, especialmente entre setembro e outubro, o que ocasionou alagamento quase que permanente até dezembro, devido a sequência de chuvas nesses meses anteriores. Para área 2, por mais que as chuvas foram intensas nos meses citados, a queda foliar não ocorreu, pois devido a declividade local do terreno, a água não acumulou no solo, desta forma tendo um baixo efeito dessa fenofase no período em questão. A queda foliar pela falta de oxigênio no solo é compreensível, pois a fotossíntese necessitada de oxigênio para a produção de energia e outros compostos (TAIZ e ZEIGER, 2013), e a perda das folhas poderia ser uma estratégia evolutiva dessa espécie para crescer e reproduzir somente em condições ambientais mais favoráveis (LARCHER, 2004; JACKSON e COLMER, 2005).

O brotamento ocorreu com maior intensidade após o período de queda das folhas. A emissão de novas folhas foi sazonal durante os dois ciclos e não apresentou correlações positivas significativas com a pluviosidade, pois a região de estudo é caracterizada pela presença de chuvas bem distribuídas (LEITE, 2002). Alguns estudos fenológicos relatam que o fotoperíodo e temperaturas mais elevadas podem induzir o brotamento (ZOCCHÉ e ALEXANDRE, 2005; MARCHIORETTO et al., 2007), sendo que o surgimento de novas folhas sinaliza a transição do inverno para a primavera e o início da estação de crescimento em florestas temperadas (POLGAR e PRIMACK, 2011). O comprimento do dia foi a variável ambiental que mais teve influência no enfolhamento das árvores nas duas áreas de avaliação, pois isso tende a otimizar as taxas de produção fotossintética (DaMATTA et al., 2007) e por consequência o acúmulo de reservas visando a produção de sementes de maior qualidade (SANTOS et al., 2012; MARCOS FILHO, 2015). Especificamente na área 1 (Lages, SC) em dezembro de 2015, não houve emissão de novas folhas, mesmo num período com temperaturas mais elevadas. Isso provavelmente esteve associado ao alagamento, onde as plantas de branquinho preferiram florescer em vez de enfolhar.

Houve uma renovação intensa de folhas, já que tanto a queda foliar como brotamento ocorreram durante a maior parte dos estudos. Isso provavelmente demonstra que o branquinho é uma espécie importante no fornecimento de alimento para herbívoros (NUNES et al., 2008; FARIA e XAVIER, 2011; ARAÚJO, 2013). Além disso, essa espécie também pode usar essa estratégia para melhor germinação das sementes que caem no solo, pois nessa condição haverá menor restrição a entrada de radiação solar e por consequência a formação de um banco de plântulas mais acelerado, especialmente na área 1, já que nesse ambiente as folhas não permanecem no solo por muito tempo devido as cheias constantes.

O padrão de florescimento pode ser considerado, de acordo com a classificação de Newstrom et al. (1994), como regular ou sazonal, já que sempre ocorreu no mesmo período nas duas áreas avaliadas (setembro – março) e anual. Athayde et al. (2009) relataram a floração de *G. klotzschiana* de agosto a outubro, em 75% dos indivíduos avaliados. Comportamento anual na floração foi observado em outras espécies do Bioma Mata Atlântica, como em *Guazuma ulmifolia* Lam (NUNES et al., 2005), *Inga edulis* Mart e *Trema micrantha* (L.) Blume (PEREIRA et al., 2008). Não houve correlação do florescimento com a precipitação, a qual ocorreu em um período com menores índices pluviométricos. Esse comportamento pode estar associado a maior proteção dos órgãos reprodutivos e a eficiência de polinizadores, uma vez que chuvas intensas podem danificar as peças florais, afetando a produção de sementes (PEDRONI et al., 2002; GUEDES et al., 2009; TONINI, 2013). O maior comprimento do dia e temperaturas

mais elevadas são determinantes na indução da floração (MARQUES et al., 2004; ZIPARRO e MORELLATO, 2007), que no caso do branquinho se correlacionaram positivamente e significativamente nas duas áreas de estudo. Liebsch e Mikich (2009) e Cascaes et al. (2013) em estudos realizados na Mata Atlântica e Roberts et al. (2015) que avaliaram uma floresta temperada da Europa, apontaram um padrão sazonal para a floração, em especial quando há uma transição de temperaturas frias para temperaturas mais altas. Esses fatores abióticos também podem estar relacionados à presença de polinizadores, dispersores e predadores, os quais exercem influência direta no comportamento fenológico (MORELLATO et al., 1989).

Na área de Lages, a qual está sujeita ao alagamento periódico, às chuvas intensas em setembro e outubro de 2015 (Figura 2) resultaram no alagamento da área até meados de dezembro (período de florescimento), desta forma houve uma baixa produção de flores nesse período. Após o alagamento da área, ocorreu uma maior produção de flores quando comparado ao ciclo anterior (janeiro e fevereiro de 2016), demonstrando alta adaptabilidade dessa espécie a essa condição de falta de oxigênio. Essa maior produção de novas flores pode estar atrelada a urgência da espécie em deixar maior número de descendentes, pois a produção de frutos maduros, desde a floração, leva em torno de três meses, o que coincidiria com o início da perda de folhas, ou seja, com o menor metabolismo fisiológico dos indivíduos de branquinho.

A produção de frutos imaturos e maduros indicou que a espécie apresenta padrão de frutificação anual (NEWSTROM et al., 1994), com uma maior produção por indivíduo na área de Lages, SC, ou seja, na presença de um ambiente mais propício ao alagamento, o que ressalta a maior adaptabilidade dessa espécie neste tipo de habitat. Essas fenofases também demonstram um padrão sazonal nos períodos avaliados, sendo que para dias mais longos e temperaturas mais elevadas (especialmente para área 1) houve correlação positiva, no entanto não havendo relação com as chuvas no período. Esse mesmo comportamento já tinha sido observado em algumas espécies arbóreas localizadas em uma floresta de Mata Atlântica do sul do Brasil (MARCHIORETTO et al., 2007). Temperaturas altas, associadas à baixa precipitação, podem ser fundamentais na dispersão das sementes. Como o branquinho é uma espécie autocórica, essa condição climática poderia favorecer a abertura natural das cápsulas e por consequência a dispersão mais efetiva dos propágulos. Árvores de branquinho podem ser um importante instrumento de gestão para sustentar a diversidade de frugívoros (BIANCHINI et al., 2015), especialmente para área de Lages, onde a densidade relativa desta espécie é elevada. O desenvolvimento sazonal na produção de frutos e sementes, tem grande influência na avifauna, uma vez que a competição entre os dispersores depende dos recursos oferecidos pelas plantas

(OBERMULLER et al., 2008), garantindo que esses animais permaneçam dentro dos fragmentos florestais.

Considerando ainda a produção de frutos e sementes, os resultados demonstram uma estratégia importante desenvolvida pela espécie como uma forma de disponibilizar para a avefauna alimento por um maior intervalo de tempo, visto que as árvores permaneceram com frutos maduros por um período de até dois meses em ambas as áreas. Estudos fenológicos que incluem a avaliação da disponibilidade de recursos para a avifauna, podem contribuir no entendimento da relação animal-planta e são fundamentais para a conservação da biodiversidade (REYS et al., 2005; PEREIRA et al., 2008; PATRICIO et al., 2014).

## 5 CONCLUSÃO

O fotoperíodo foi a variável climática de maior influência no comportamento fenológico da *G. klotzschiana* nas duas áreas de estudo.

A perda de folhas nas duas áreas caracterizou a espécie como sendo semidecídua.

A floração e a frutificação foram caracterizadas como anual nas duas áreas de avaliação.

A maior produção de frutos imaturos e maduros ocorreu para a área mais propícia ao alagamento (área 1), indicando que a *G. klotzschiana* prefere solos mais encharcados para se desenvolver e se reproduzir.



## CAPÍTULO II

### COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Gymnanthes klotzschiana* MÜLL.ARG. SUBMETIDAS A SUBMERSÃO

#### RESUMO

*Gymnanthes klotzschiana*, conhecida popularmente como branquinho, é uma espécie arbórea importante na recomposição de áreas alteradas. Objetivou-se com este trabalho avaliar aspectos físicos e fisiológicos de sementes colhidas em duas áreas (uma sujeita a inundações periódicas - área 1 e outra sem o efeito do alagamento - área 2), e bioquímicos de sementes oriundas de uma área de *G. klotzschiana*, submetidas à hipoxia. Para cada tratamento, foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes, que foram submetidas a: um dia (T2), três dias (T3), cinco dias (T4), dez dias (T5) e 20 dias sob hipoxia (T6), além da testemunha (T1). Em ambas as áreas, todos os tratamentos apresentaram três fases de germinação. As sementes da área 1 demonstraram os maiores valores de germinação e vigor. Apenas sementes de T1 e T2 não diferiram entre as áreas, sendo que a máxima germinação foi no T2 para área 1 que alcançou 90%. A menor germinação foi registrada no T6 (31%) para as sementes coletadas na área 2. Houve aumento no teor de proteínas durante toda a germinação, que alcançou  $30 \text{ mg.g}^{-1}$  no T6. As quantidades de açúcares solúveis e de amido aumentaram no primeiro momento, e no início da fase III, diminuíram. O teor de lipídios na fase III da germinação diminuiu no T1 e no T2 e para o T3, T4, T5 e T6 aumentou, chegando a alcançar  $470 \text{ mg.g}^{-1}$  no T6. Os resultados de germinação e vigor sugerem que as sementes colhidas da área não sujeita ao alagamento natural são mais sensíveis a hipoxia a partir de três dias de estresse. No início da germinação (fases I e II), as sementes de branquinho utilizam como fonte de energia e no metabolismo outros carboidratos e não os açúcares solúveis previamente disponíveis e o amido. Na fase III, açúcares solúves e o amido são as principais fontes de reservas para a formação de uma nova plântula.

**Palavras-chave:** Estresse. Hipoxia. Amido. Lipídios. Branquinho.

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL BEHAVIOR IN SEED GERMINATION  
OF *Gymnanthes klotzschiana* MÜLL.ARG. SUBMERGED**

**ABSTRACT**

*Gymnanthes klotzschiana*, popularly known as branquinho, is an important arboreal species in the reconstruction of altered areas. The objective of this work was to evaluate the physical and physiological aspects of seeds harvested in two areas (one subject to periodic flooding - area 1 and the other without the effect of flooding - area 2), and biochemical seeds from a *G. klotzschiana* area submitted to hypoxia. For each treatment, four replicates of 25 seeds were used, which were submitted to: one day (T2), three days (T3), five days (T4), ten days (T5) and 20 days under hypoxia (T6). Of the control (T1). In both areas, all treatments presented three stages of germination. The seeds of area 1 showed the highest values of germination and vigor. Only seeds of T1 and T2 did not differ between areas, and the maximum germination was in T2 for area 1, which reached 90%. The lowest germination was recorded in the T6 (31%) for the seeds collected in area 2. There was an increase in the protein content throughout the germination, which reached  $30 \text{ mg.g}^{-1}$  in the T6. The quantities of soluble sugars and starch increased at the first moment, and at the beginning of phase III, decreased. Lipid content in stage III germination decreased in T1 and T2 and for T3, T4, T5 and T6 increased, reaching  $470 \text{ mg.g}^{-1}$  in T6. The results of germination and vigor suggest that seeds harvested from the area not subject to natural flooding are more sensitive to hypoxia after three days of stress. At the beginning of germination (phases I and II), the seeds of the branquinho use as energy source and metabolism other carbohydrates and not the previously available soluble sugars and the starch. In phase III, solubles and starch are the main sources of reserves for the formation of a new seedling.

**Keywords:** Stress. Hypoxia. Starch. Lipids. Branquinho

## 1 INTRODUÇÃO

*Gymnanthes klotzschiana* popularmente conhecida como Branquinho é uma espécie que pertence à família Euphorbiaceae, pioneira e pode ser encontrada na Mata Atlântica desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. O branquinho ocorre naturalmente em solos úmidos e em solos aluviais (SILVA et al., 2012), sendo uma espécie típica da Floresta Ombrófila Mista Aluvial (CROCE, 1991). Essa espécie arbórea pode ser utilizada na produção de madeira serrada e na geração de energia (CARVALHO, 2003) e suas raízes e folhas possuem

propriedades terapêuticas (SMITH et al., 1988). Na restauração de áreas degradadas, essa espécie é considerada chave, especialmente em locais onde o efeito do alagamento é uma constante.

A germinação nada mais é do que a retomada do crescimento do eixo embrionário após a semente se desligar fisiologicamente da planta mãe e encontrar condições favoráveis para se desenvolver (BEWLEY et al., 2013). Durante o processo germinativo, normalmente as sementes de diferentes espécies apresentam um padrão trifásico de imbibição (CARVALHO e NAKAGAWA, 2012). A primeira fase se caracteriza pela reativação do metabolismo pela entrada intensa de água, início da produção de energia, síntese de mRNA e reparo de DNA (ácido desoxirribonucleico), ativação de polissomos e síntese de proteínas a partir de mRNAs pré-existentes. A fase seguinte se diferencia principalmente pela baixa entrada de água na semente, sendo caracterizada por um período de repouso fisiológico. Nesta fase acontece a síntese e duplicação do DNA, o início da mobilização das reservas e alongamento das células da radícula. Na terceira fase, há a reentrada de água de forma mais intensa, expansão celular que culmina com a emissão da radícula e finaliza com a formação de uma plântula normal ou anormal devido a divisões celulares sucessivas (MARCOS FILHO, 2015; WANG et al., 2015).

O alagamento pode comprometer a germinação pela restrição na disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio, assim como o desenvolvimento das plantas (KOZLOWSKI, 1997). No entanto, isso irá depender principalmente da espécie e também do tempo de inundação (CRAWFORD e BRANDLE, 1996). Os ambientes tropicais e subtropicais sujeitos à inundação variam muito em relação à duração, à frequência e à amplitude do alagamento (MENEGUCCI, 2008; FERREIRA et al., 2009); desta forma, criando locais variados e com distintas necessidades adaptativas para as espécies se desenvolverem. Além disso, nessa condição de restrição de oxigênio, pode haver diminuição da fotossíntese líquida e por consequência menor translocação de fotoassimilados até as sementes em desenvolvimento (BEWLEY et al., 2013).

As sementes acumulam durante a maturação grandes quantidades de substâncias de reserva, especialmente carboidratos, proteínas e lipídios (CORTE et al., 2006). Ao longo da germinação essas reservas são consumidas para geração de energia e na síntese de novos compostos, os quais irão participar da constituição de novas células e tecidos (BEWLEY e BLACK, 1994). Quando a falta de oxigênio incide durante o processo germinativo, pode haver alterações na hidrólise destes compostos (MIRO e ISMAIL, 2013).

Objetivou-se com este trabalho avaliar aspectos físicos e fisiológicos de sementes colhidas em duas áreas (uma sujeita a inundações periódicas e outra sem o efeito do alagamento), e bioquímicos de sementes oriundas de uma área de *G. klotzschiana*, submetidas à hipoxia.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Seleção de matrizes, colheita, extração e beneficiamento das sementes

Foram selecionadas matrizes adultas livres fitossanitários aparentes e distâncias mínima entre elas de 30 metros, conforme recomendações de Higa (2006). As sementes foram coletadas de frutos maduros (coloração marron-escura) provenientes de duas áreas. A primeira localizada no município de Lages, SC (área 1) foram selecionadas 20 matrizes e está a uma altitude de aproximadamente 890 metros (Lat: -27.841221° e Long: 50.234878°). Na área 2 foram selecionadas oito matrizes e está localizada no município de Capão Alto, SC a uma distância aproximada de 65 km em linha reta da Área 1 e com altitude em torno de 930 metros (Lat: -28.196411° e Long: -50.752545°). De acordo Klein (1960) e IBGE (2012), a área 1 é caracterizada como Floresta Ombrófila Mista Aluvial, e a área 2 como Floresta Ombrófila Mista Montana em transição com a Floresta Estacional Semidecidual Montana. A área 1 se caracteriza por ser um ambiente propício ao alagamento periódico, por estar em local de baixada e acompanhar o curso do Rio Caveiras. Esse fragmento possui aproximadamente 50 hectares. A área 2 está inserida próxima ao Rio Pelotas, e acompanha um dos “braços” da área de alague da UHE Barra Grande, no entanto por estar em local íngreme não sofre o efeito do alagamento. O clima da região de Lages e Capão Alto é classificado segundo Köppen (OMETO, 1981), como Cfb, sendo temperado propriamente dito, com temperatura média no mês mais frio abaixo de 18 °C (mesotérmico) e temperatura média no mês mais quente abaixo de 22 °C, sem estação seca definida.

Após a coleta, os frutos foram colocados em sacos plásticos e encaminhados ao Laboratório de Sementes da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) para extração das sementes, a qual ocorreu de maneira espontânea à sombra sob lona preta. A separação das sementes dos restos frutos ocorreu com uso de peneiras e manualmente. Posteriormente as sementes foram armazenadas em câmera fria (10 °C e UR = 65%).

## 2.2 Tratamentos de alagamentos

Para a simulação do estresse hídrico por alagamento, 100 sementes, divididas em 4 repetição, foram colocadas em copo plástico com 60 mL de água destilada, a qual foi renovada a cada 72 h. Foram utilizados seis tratamentos: um dia (T2), três dias (T3), cinco dias (T4), dez dias (T5) e vinte dias de alagamento (T6), além do tratamento testemunha, sem alagamento (T1).

## 2.3 Obtenção das curvas de embebição e pontos selecionados para as análises bioquímicas

As curvas de embebição foram realizadas para a seleção de pontos, durante o processo de germinação, em que seriam realizadas as análises bioquímicas e também para verificar o comportamento na absorção de água nos diferentes tratamentos propostos.

Assim, para cada tratamento, as curvas foram obtidas por meio da seguinte fórmula:  

$$\text{Peso Final} = \frac{\text{Peso Inicial} \times (100 - \text{Umidade Inicial})}{100 - \text{Umidade Final}}$$
. As pesagens foram realizadas nas primeiras 24 horas a cada 6 horas, e posteriormente a cada 12 horas. Cada curva foi finalizada quando pelo menos 40% das sementes de cada repetição apresentavam raiz primária de três milímetros. A umidade inicial foi determinada de acordo com Brasil (2009), através de duas repetições de 2g, antes da simulação de hipoxia.

Para a quantificação dos componentes bioquímicos durante as três fases de germinação foram selecionadas sementes que estavam em diferentes pontos de umidade na curva de embebição. Para a área 1 foram a 8,9 % (umidade inicial), 21% (fase I), 30% (fase II) e 45% (fase III) de umidade; na área 2 os pontos de umidade foram: 9,2% (umidade inicial), 21% (fase I), 40% (fase II) e 55% (fase III), ou seja, quatro pontos da curva de embebição.

## 2.4 Análises físicas (Determinação da massa seca e umidade)

Foram determinados, segundo Brasil (2009), a massa seca (duas repetições de 50 sementes) e o teor de água das sementes (duas repetições de 0,5g cada). Para a pesagem das amostras utilizou-se balança eletrônica com precisão de 0,001g e na secagem, estufa a 60 °C por 24h na determinação da massa seca e estufa a 105 °C por 24 h para obter o teor inicial de água das sementes. Após o período de secagem, os recipientes foram acondicionados em dessecador contendo sílica gel por 10 minutos, até atingir temperatura ambiente.

## 2.5 Análises fisiológicas (germinação e vigor)

As sementes foram colocadas para germinar em caixas plásticas ( $11,0 \times 11,0 \times 3,5$  cm) sobre substrato papel mata borrão, umedecido em 2,5 vezes o seu peso. A germinação foi realizada em câmara de crescimento tipo B.O.D (demanda bioquímica do oxigênio) contendo quatro lâmpadas de 25 W, temperatura alternada ( $20/30$  °C) e fotoperíodo de 12 horas (SANTOS e AGUIAR, 1999). Foi considerado para somatório da porcentagem final de germinação somente sementes que geraram plântulas normais (BRASIL, 2009). Para confirmação da normalidade das plântulas, as mesmas foram transplantadas para sacos plásticos com substrato a base de casca de pinus, turfa e vermiculita e mantidas por 60 dias em estufa. Apenas plântulas que não formaram radícula ou cotilédones foram classificadas como anormais (danos não apresentados).

As sementes que não geraram plântulas normais foram classificadas como plântulas anormais, sementes não germinadas, sementes vazias e sementes mortas. Para verificar a viabilidade das sementes não germinadas, estas foram seccionadas longitudinalmente e imersas em solução de 2,3,5 trifenil cloreto tetrazólio a 0,1% por duas horas a 30 °C, de acordo com a metodologia sugerida por Cosmo et al. (2010). Foram consideradas viáveis as sementes que apresentaram coloração rosada no eixo hipocótilo-radícula e nos cotilédones.

O acompanhamento da germinação foi feito diariamente para se determinar o vigor, o qual foi realizado pela Primeira Contagem - PC (cinco dias após o final de cada tratamento) e pelo Índice de Velocidade de Germinação (IVG). Este teste foi avaliado após as sementes emitiram o primeiro par de cotilédones. O cálculo para o vigor foi realizado segundo a fórmula matemática proposta por Maguire (1962). Todas as análises fisiológicas finalizaram aos 21 dias após o período de submersão.

## 2.6 Análises bioquímicas

Foram determinados, em cada um dos pontos selecionados das curvas, proteínas solúveis totais, açúcares solúveis totais, amido e lipídios.

## 2.7 Extração e determinação de proteínas solúveis totais

Para a extração, previamente as sementes de cada um dos pontos selecionados das curvas de embebição dos seis tratamentos foram moídas na presença de nitrogênio líquido. Em

seguida, foi colocado 1 g desse material em cadrinho e adicionados 3 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,5), PVPP a 4% (p/v) e maceradas até formar um “creme” de coloração marrom. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 3600 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e reservado em freezer a -80 °C. Para a quantificação, foi retirado 10 µL de cada amostra e diluídas em 390 µL de água destilada. As proteínas solúveis totais foram determinadas em espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S, de acordo com o método descrito por Bradford (1976) e os resultados expressos em mg.g<sup>-1</sup> de massa seca de semente. Foram utilizadas duas repetições por ponto das curvas.

## 2.8 Extração e determinação de açúcares solúveis totais

Foram utilizadas duas repetições por ponto das curvas de embebição para cada tratamento. Foram moídas 0,25 g de sementes por réplica, previamente secas em estufa a 60 °C por 48 h. Em seguida, as amostras foram colocadas em tubo tipo falcon e adicionado 25 mL de etanol 80% (v/v), as quais permaneceram durante 30 minutos em banho maria a 60 °C e posteriormente foram centrifugadas por sete minutos a 3000 g. O mesmo procedimento foi repetido, no entanto com adição de 30 mL de etanol 80% (v/v). Os sobrenadantes foram reservados e armazenados a 10 °C. Os açúcares solúveis totais foram determinados pelo método da Antrona, Clegg (1956). Para isso, retirou-se 20 µL da amostra extraída, a qual foi diluída em 980 µL de água destilada e adicionados 2 mL da solução antrona em tubos de ensaio. Depois, as amostras foram homogeneizadas em vortex por dois segundos e colocadas em banho maria a 96 °C por três minutos. As leituras das amostras (previamente resfriadas por cinco minutos em gelo) foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S no comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram expressos em mg.g<sup>-1</sup> de semente de massa seca de semente.

## 2.9 Extração e determinação de amido

Com o resíduo das amostras que foram utilizadas para a determinação dos açúcares solúveis totais, foi feita a quantificação do amido de acordo com a metodologia desenvolvida por McCready et al. (1950). O resíduo foi ressuspenso em 2,5 mL de água destilada e 3,2 mL de ácido perclórico 52% (v/v) sob agitação por dois minutos em turbilhador. Em seguida, as amostras ficaram em repouso por 30 minutos e posteriormente foram centrifugadas a 2000 rpm

por dez minutos a temperatura ambiente. Esse procedimento foi repetido três vezes. Os sobrenadantes foram coletados e o volume final completado até 25 mL com água destilada. Os sobrenadantes foram diluídos 25 vezes. Para a quantificação do amido, foi utilizado o mesmo método de quantificação de açúcares solúveis totais. Os resultados foram expressos em mg.g<sup>-1</sup> de semente de massa seca de semente.

## **2.10 Extração e determinação de lipídios totais**

Para a quantificação, foi utilizado o método de Soxhlet (1879). Inicialmente as sementes foram moídas e secas a 60 °C por 48 horas. Foi utilizado aproximadamente 1,25 g por amostra com duas repetições. O tempo de extração foi de 8 horas e como solvente foi utilizado éter de petróleo. A quantificação foi expressa por meio da seguinte equação:  $L = \frac{BC - BV}{MA} \times 100$ . Em que: L: porcentagem de lipídios totais; BC: balão com a amostra extraída; BV: balão vazio; MA: massa da amostra moída e seca. Os resultados foram expressos em mg.g<sup>-1</sup> de semente de massa seca de semente.

As análises bioquímicas foram realizadas apenas para as sementes coletadas na área 1.

## **2.11 Análise estatística**

Os dados inicialmente foram submetidos a análise de normalidade pelo Teste de Shapiro Wilk. Em seguida foi realizada a análise fatorial (seis tratamentos x duas áreas – 6 X 2) e os valores gerados foram avaliados pelo Teste F e as médias pelo Teste de Scott-Knott (1974), ambos a um nível de significância  $\alpha = 0,05$ . A análise de regressão foi utilizada para ajustar as curvas e também foram analisadas a um nível de probabilidade de 95% de confiança e em ambos os casos foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

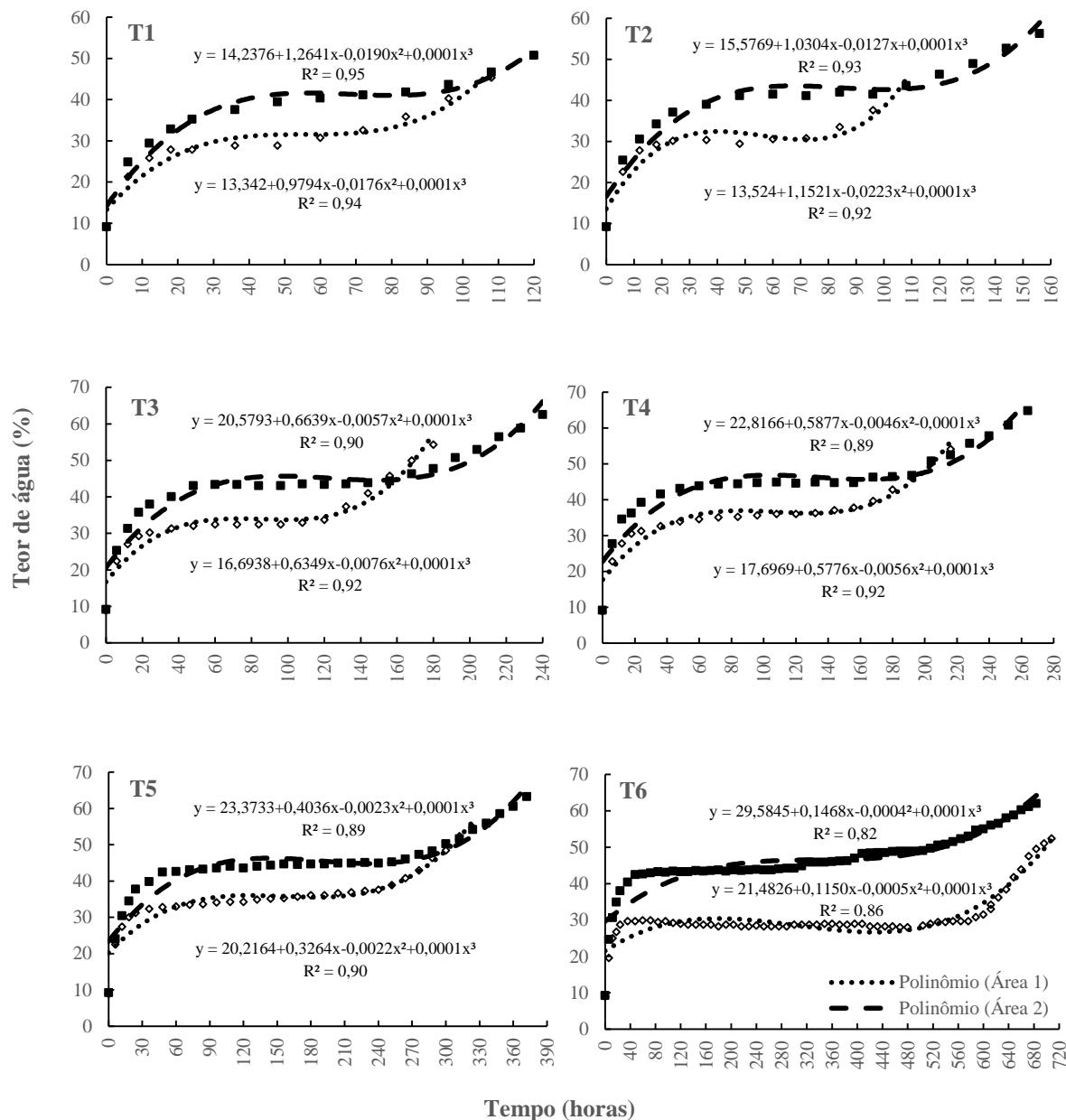
As sementes recém coletadas da área 1 apresentaram umidade inicial de 8,9% e germinação de 85%. As provenientes da área 2 tiveram 9,2% de umidade inicial e 84% de germinação. Em ambos os locais de coleta a massa seca foi de 0,085g/50 sementes.

Para as duas áreas de coleta, todos os tratamentos seguiram o padrão trifásico de germinação. Considerando apenas as sementes coletadas na área 1, no início da fase I da germinação, elas apresentaram 8,9% no teor de água. No começo da fase II, as sementes

alcançaram em torno de 30% umidade, em aproximadamente 30 horas. Nesta fase houve uma baixa absorção de água e foi proporcionalmente mais prolongada para os tratamentos que ficaram por um maior período expostos a restrição de oxigênio. Nos T2 e T3, a fase III iniciou em aproximadamente 60 horas após a retirada das sementes do alagamento controlado (emissão da radícula). O T4 iniciou a última fase em 40 horas depois do estresse e o T5 em 12 horas pós-alagamento. Para o T6, a fase III iniciou 100 horas após a retirada das sementes da água. A testemunha entrou nesta fase da germinação, próximo de 70 horas após o início da embebição. As sementes iniciaram a última fase da germinação com um teor de água próximo de 35% (Figura 6).

As sementes coletadas na área 2 começaram o processo germinativo com 9,2% de umidade e iniciaram a fase seguinte apresentando em torno de 40%, a qual foi atingida em aproximadamente 24 horas em todos os tratamentos. Assim como o lote da área 1, a fase II foi mais demorada a medida que o tempo de exposição ao alagamento aumentava; no entanto para o T6, houve um aumento constante no teor de água nessa fase. Para o T2, T3 e T4, a última fase da germinação iniciou por volta de 100 horas após a retirada das sementes do estresse; o T5 e T6 iniciaram a fase III 60 horas pós-estresse e a testemunha 100 horas após o início da germinação. No começo da fase III as sementes de todos os tratamentos apresentaram umidade próxima de 45% (Figura 6).

Figura 6 - Curvas de embebição durante a germinação de sementes de *Gymnanthes klotzschiana* coletadas da área 1 (Lages – SC) e na área 2 (Capão Alto - SC), quando submetidas a diferentes períodos de alagamento



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias.

Esses resultados demonstram que as sementes coletadas na área 1 (ambiente sujeito ao alagamento periódico), germinam mais rapidamente e ao mesmo tempo necessitam um menor teor de água para iniciar e finalizar o processo germinativo, independente dos tratamentos avaliados. Isso provavelmente é uma adaptação desenvolvida pela espécie contra o alagamento, pois quanto mais rápida for a germinação e formação de uma plântula, maiores serão as chances

em suportar a turbulência das águas, bem como a restrição de oxigênio. As sementes nessa condição de estresse, tendem a aumentar a atividade de algumas enzimas relacionadas a respiração anaeróbia, como a álcool desidrogenase e a piruvato descarboxilase (MAGNESCHI e PERATA, 2009). A reprogramação metabólica e molecular se torna fundamental para gerar energia necessária para uma rápida germinação e alongamento das plantas em condições de hipoxia/anoxia (NARSAI e WHELAN, 2013).

Com relação as etapas da germinação, a fase I é um processo físico, e independe da viabilidade das sementes (MARCOS FILHO, 2015). Nessa etapa, a entrada de água nas sementes foi rápida em todos os tratamentos nos dois lotes avaliados, possivelmente devido à grande diferença de potencial hídrico entre a semente e o substrato. Essa acelerada entrada de água não prejudicou a germinação das sementes coletadas na área 1, bem como nas sementes coletadas na área 2, visto que apresentaram germinação similar nos tratamentos testemunha (Tabela 5).

Isso pode evidenciar uma capacidade positiva das sementes de *G. klotzschiana* em reorganizar suas estruturas de membranas de forma eficiente. De acordo com Bewley et al. (2013) sementes que suportam baixos teores de água ao final do processo de maturação (ortodoxas) como o branquinho, apresentam açúcares redutores e oligossacarídeos que interagem com as proteínas e com os grupos funcionais hidrofílicos nas membranas, mantendo a compartimentalização e funcionalidade celular. Após a hidratação ou início da embebição, ocorre a transição imediata da fase gel para a conformação líquido-cristalino dos fosfolipídios da membrana, e esses açúcares voltam para o citoplasma e há menor perda de solutos. A manutenção da integridade celular, está a associada com a capacidade das sementes em se reorganizar de maneira mais eficiente e assim preservar sua qualidade fisiológica (WEITBRECHT et al., 2011; VILLA-HERNANDEZ et al., 2013).

O maior teor de água nas sementes coletadas na área 2 ao final da fase I e até o término da germinação, pode ser explicado pela menor restrição à entrada de água pelo tegumento da semente e/ou pela mudança na sua composição química, que é alterada por fatores genéticos e ambientais (GALLARDO et al., 2008). Durante a maturação, o ambiente exerce influência direta no tipo de reservas que serão formadas e acumuladas nos tecidos de armazenamento (COPELAND e MCDONALD, 2001). Como as sementes foram coletadas em locais com características ambientais distintas, especialmente quanto a presença de alagamentos periódicos, é possível que houve mudanças na composição bioquímica do endosperma nas sementes de branquinho. Bradford (1994) salienta que o conteúdo de proteínas nas sementes pode ser alterado pela disponibilidade de água no solo.

A estabilidade na absorção de água na fase II é comum nas espécies que apresentam geminação com três fases bem definidas (CARVALHO e NAKAGAWA, 2012). Foi observado que as sementes que ficaram por um maior período sob restrição na disponibilidade de oxigênio estenderam essa fase proporcionalmente. O comportamento distinto para o T6 das sementes oriundas da área 2, que teve absorção contínua de água (especialmente a partir do décimo dia de imersão em água), pode estar atrelado ao efeito do estresse e de seu vigor. Esse foi o tratamento com a maior porcentagem de sementes mortas e que obteve a menor germinação (Tabela 5). Neste caso, a morte de algumas sementes poderia ter iniciado pela peroxidação lipídica causada por radicais livres (SEVCIKOVA et al., 2011; PALERMO et al., 2015), o que possivelmente ocasionou a perda de turgência das células pela morte induzida. As membranas biológicas são barreira semipermeável e a manutenção de suas funções depende de sua integridade (KRAFFE et al., 2007, PERNET et al., 2007).

O início da protrusão radicular (Fase III) é um processo basicamente físico (BEWLEY et al. 2013) e a entrada de água é essencial para haver a expansão celular. Posteriormente a maior absorção de água se justifica pela necessidade do transporte de compostos previamente hidrolisados até o eixo embrionário, os quais são necessários na formação de uma nova plântula.

Os tratamentos testemunhas tiveram comportamentos distintos com relação a fase III, visto que as sementes da área 1 iniciaram essa fase 30 horas antes. Isso é um indício da maior qualidade das sementes desse lote. De uma maneira geral, considerando todos os tratamentos, as sementes coletadas da área 1 chegaram a fase III antes das sementes oriundas da área 2. O vigor das sementes envolve a biossíntese de energia e de compostos metabólicos, associados a atividade celular e integridade de membranas (AOSA, 2003) que são fundamentais na tolerância aos estresses ambientais durante a germinação (XIAOLIN et al., 2017).

A germinação apresentou diferenças significativas entre os tratamentos na mesma área e entre as áreas. Para a área 1, apenas o tratamento T6 foi inferior aos demais (45%), sendo que o T2 obteve o maior índice (90%). Para a área 2, os tratamentos T1 e T2 foram superiores, com 84% e 81% de germinação, respectivamente; o T3, T4 e o T5 foram estatisticamente iguais e superiores ao T6, que obteve 31% de germinação. Considerando o mesmo tratamento entre as áreas, apenas a testemunha e o T2 não diferiram estatisticamente (Tabela 5).

Os tratamentos avaliados nas duas áreas de coleta também apresentaram resultados distintos quanto ao vigor das sementes. A PC (primeira contagem) de germinação para as sementes da área 1 foi significativamente maior para os tratamentos T1 (80%), T2 (86%), T3 (80%) e T4 (75%) de estresse por hipoxia; o T5 se diferenciou destes (66%) e foi maior que o T6 (5%). Para as sementes da área 2, apenas o tratamento com 20 dias de alagamento controlado

(T6) foi distinto aos demais, sendo que não houve germinação até o quinto dia pós-estresse. Quando foi comparado a PC nos mesmos tratamentos com relação as áreas, todos os tratamentos da área 1 foram superiores ao da área 2. Entre o T1 e T5 houve uma diferença média na PC de 67% e no T6 de 5% (Tabela 5).

O IVG das sementes oriundas da área 1 demostrou o menor valor para o T6 (0,77). Na área 2, esse teste apresentou valores superiores para o T1 (1,61) e o T2 (1,62), e o menor índice encontrado foi para o T6 (0,58). Quando foi comparado o IVG entre os mesmos tratamentos em relação as áreas, observou-se que apenas o T6 demostrou valores que não diferiram estatisticamente (Tabela 5). Esses resultados sugerem, especialmente quanto a germinação e a primeira contagem que as sementes coletadas da área 1 são mais tolerantes ao alagamento por serem adaptadas a essa condição. No entanto, as sementes da área 2 possuem também uma certa tolerância, especialmente quanto aos resultados de germinação.

Tabela 5 - Germinação, primeira contagem e IVG em sementes de *Gymnanthes klotzschiana* coletadas em duas áreas

<b>Tratamentos</b>	<b>Germinação</b>		<b>PC</b>		<b>IVG</b>	
	área 1	área 2	área 1	área 2	área 1	área 2
-----%-----						-----adimensional-----
T1	85aA	84aA	80aA	12aB	2,26aA	1,61aB
T2	90aA	81aA	86aA	19aB	2,78aA	1,62aB
T3	84aA	66bB	80aA	7aB	2,71aA	1,19bB
T4	78aA	63bB	75aA	5aB	2,68aA	1,14bB
T5	70aA	63bA	66bA	10aB	2,68aA	1,32bB
T6	45bA	31cB	5cA	0bA	0,77bA	0,58cA
CV (%)	13,5		21,7		13,7	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

\* Letras minúsculas comparam na mesma coluna e letras maiúsculas na mesma linha; médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Scott-Knott ( $\alpha=0,05$ ). PC: primeira contagem; IVG: índice de velocidade de germinação. Área 1: local sujeito ao alagamento; Área 2: local não sujeito ao alagamento; Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias.

Quando não houve o efeito do estresse, a germinação foi similar nas duas áreas, contudo mais lenta para as sementes da área 2. Os maiores valores de germinação, PC e IVG para os tratamentos T2, T3, T4 e T5 (área 1), apontaram que as sementes toleram ao alagamento por até 240 horas sem qualquer dano significativo ao seu metabolismo, fato não evidenciado para as sementes da área 2, que perderam o poder germinativo e o vigor a medida que o alagamento foi mais intenso. Sementes com maior vigor possuem maior resistência a estresses ambientais,

fato que ocorreu nas sementes coletadas na área 1, pois em uma provável condição de restrição de oxigênio futura, essas sementes necessitam germinar rapidamente após serem dispersas. A maior tolerância ao alagamento ou a falta de oxigênio na germinação é regulado geneticamente (ISMAIL e MACKILL, 2013; COLMER et al., 2013). Sabe-se que os genes *pdc1*, *pdc2*, *adh1* e *aldh1* são importantes nessa condição de submersão completa das sementes (KLOK et al., 2002), que incluem a capacidade de iniciar e manter o catabolismo de carboidratos necessário para a respiração anaeróbia e assim sustentar o fornecimento e manutenção de energia (BAILEY-SERRES et al., 2012; COLMER et al., 2013; KIRK et al., 2013).

Ao analisar o T2 de ambas as áreas, observou-se que o período da aplicação do estresse nas sementes ocorreu principalmente durante fase I da germinação e por consequência o efeito desse fator adverso foi baixo ou nulo, visto que esta fase tem a função principal de apenas reativar o metabolismo da semente (BEWLEY et al., 2013). Os tratamentos T3, T4 e T5 avaliados com as sementes da área 1, também tiveram um baixo efeito da hipoxia, pois essas sementes ficaram sob restrição de oxigênio durante a fase II, etapa da germinação em que o metabolismo das sementes é baixo, se restringindo basicamente a hidrólise das reservas e combate a radicais livres (WANG et al., 2015). Deste modo, o tempo em que as sementes desses tratamentos ficaram sob hipoxia, possivelmente, não foi suficiente para causar danos nas membranas celulares e organelas e desta forma a atividade metabólica se manteve normalizada. No entanto, esses danos podem ter ocorrido nas sementes desses mesmos tratamentos oriundas da área 2 e principalmente nos tratamentos T6 das duas áreas, onde houve os menores índices de germinação e vigor.

A manutenção da integridade celular durante todo o período de estresse em que as sementes da área 1 foram expostas, possivelmente está relacionada ao momento em que esse efeito adverso estava presente durante a germinação e a capacidade das sementes em combater essa condição adversa. Como a Fase II é uma etapa preparatória da germinação (BEWLEY et al. 2013), a falta de oxigênio apenas atrasou esse processo. A manutenção da qualidade das sementes durante esse período, provavelmente, está ligada à síntese de compostos antioxidantes. O  $O_2^-$ ,  $OH^\circ$  e  $O_2^1$  são exemplos de radicais livres que causam os maiores danos oxidativos das estruturas a nível celular (MITTLER, 2011; LÓPEZ et al., 2011; SHARMA et al., 2012). Enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT são importantes na neutralização desses compostos deletérios (IANNONE et al., 2012; LUO et al., 2013) e provavelmente agiram para manter a qualidade fisiológica das sementes.

Barddal (2006) também simulou a estresse pelo alagamento em sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L.B. Sm. & Downs e obteve 93% de germinação para o tratamento

controle e 91 e 87% de germinação para as sementes que ficaram por três e sete dias em submersão, respectivamente; quando o estresse pelo alagamento foi de 14 e 28 dias, a germinação foi de 79% e 59%, respectivamente. Nota-se que os resultados de germinação obtidos por esse autor foram similares aos encontrados nesse trabalho.

A tabela 6 demonstra a percentagem de outras categorias de sementes de *G. klotzschiana* que não geraram plântulas normais e a viabilidade das sementes daquelas que não germinaram. A formação de plântulas anormais foi baixa, a qual variou de 0 a 9% para as duas áreas, sendo o máximo registrado para o T5 – área 1 e o T3 – área 2, sugerindo um baixo efeito do alagamento nessa variável. O número de sementes mortas (SM) tiveram destaque para os tratamentos em que as sementes ficaram por até vinte dias sob estresse (T6). Nesse tratamento o número de sementes não germinadas representou 24% e as SM 22% para a área 1. Na área 2, o T6 apresentou 22% de SNG e 37% de SM. A quantidade de sementes vazias foi similar em todos os tratamentos em ambas as áreas, sendo que o valor máximo foi de 13%.

Para as sementes não germinadas foi realizado o teste de tetrazólio para verificar a viabilidade destas. Novamente o destaque fica para o T6 de ambas as áreas, os quais para todas as sementes que não germinaram (22% e 37%, respectivamente), nenhuma estava viável (Tabela 6). Para o restante dos tratamentos, a viabilidade ficou entre 0 e 4% do total da germinação, desta forma o número de sementes dormentes apresentou pouca influência na distinção dos tratamentos e dos lotes.

Tabela 6 - Porcentagem de plântulas anormais (PA), sementes mortas (SM), sementes vazias (SV), sementes não germinadas (SNG), e sementes viáveis (SVIA) de *Gymnanthes klotzschiana* colhidas em duas áreas e submetidas a seis períodos de alagamento

<b>Tratamentos</b>	<b>PA</b>		<b>SM</b>		<b>SV</b>		<b>SNG</b>		<b>SVIA</b>	
	área 1	área 2	área 1	área 2	área 1	área 2	área 1	área 2	área 1	área 2
<b>%</b>										
T1	0	0	1	2	5	4	9	10	1	4
T2	4	1	0	4	5	8	1	6	0	1
T3	2	9	3	3	6	5	5	17	2	2
T4	0	7	2	11	13	6	7	13	1	0
T5	9	5	1	18	8	7	12	7	2	0
T6	0	3	22	37	9	7	24	22	0	0

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

\*Valores em percentagem; Área 1: local sujeito ao alagamento; Área 2: local não sujeito ao alagamento; Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias.

De forma geral em ambas as áreas avaliadas, o número de sementes não germinadas e de sementes mortas aumentaram a medida que o estresse foi mais acentuado, especialmente para o T6. As sementes nessa condição de restrição de oxigênio podem limitar divisões e alongamento celular pela escassez de energia (TAKAHASHI et al., 2011), assim como sofrer danos pela presença de EROs (ANDRADE et al., 2010) e/ou acúmulo de substâncias tóxicas, como a presença de acetaldeído (ZHANG et al., 1994; RAHMAN et al., 2001).

Quando há algum estresse ambiental, as sementes eventualmente entram em dormência (FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006), pelo menos até que as condições do meio se tornem favoráveis (HUANG et al., 2010). No entanto, para as sementes desta espécie, o estresse pela falta de oxigênio, especialmente para um período superior a dez dias, representou a perda de viabilidade para a maioria das sementes que não germinaram.

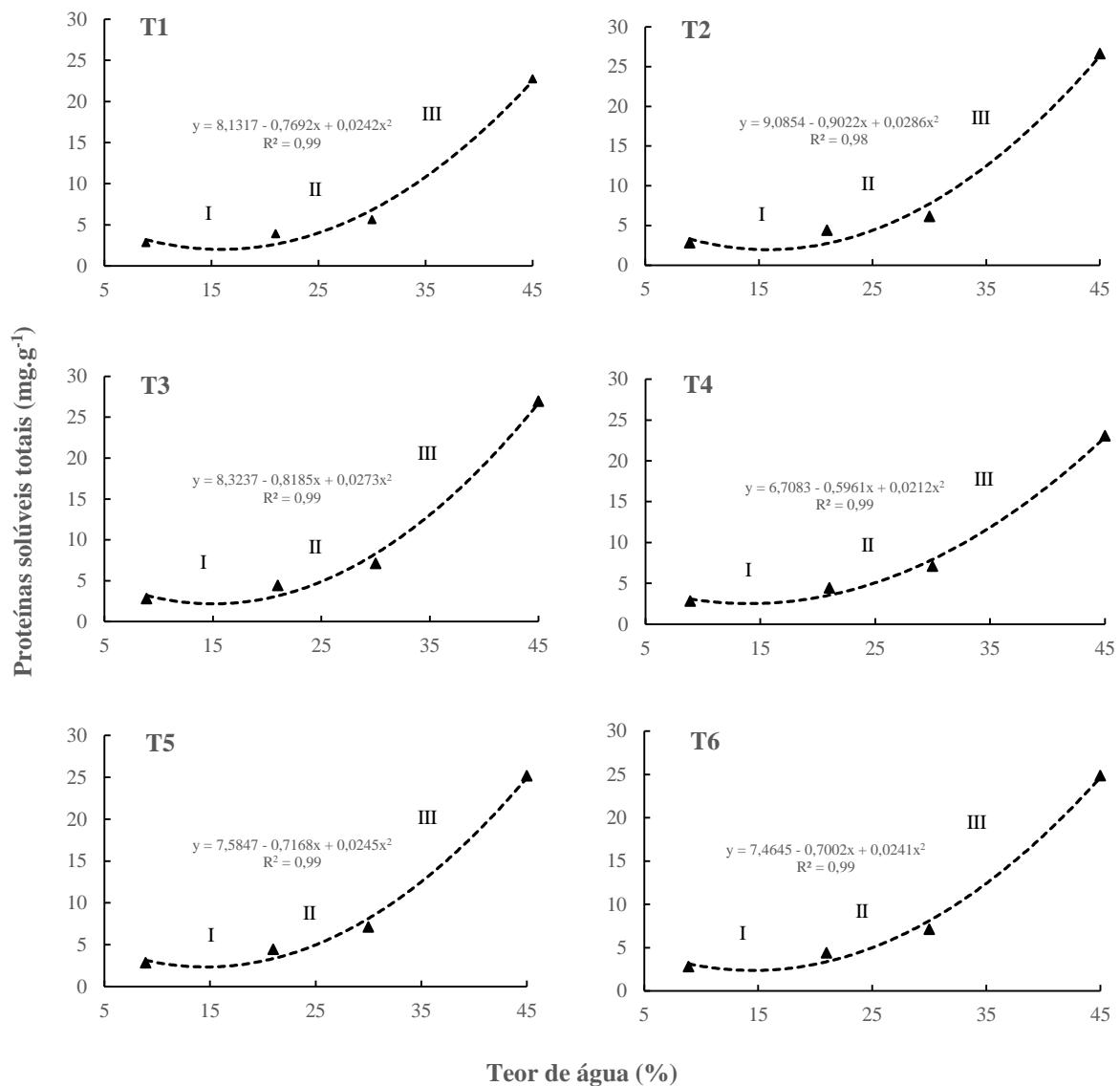
O estresse por hipoxia influencia a germinação das sementes (FERREIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2012) e dependendo da intensidade da inundação os propágulos podem perder a sua viabilidade (CRAWFORD e BRANDLE, 1996; MEDINA et al., 2009) e/ou o desenvolvimento de plântulas pode ser comprometido (PISICCHIO et al., 2010).

Espécies adaptadas a ambientes periodicamente inundados, como a *G. klotzschiana* desenvolvem estratégias que as permitem se estabelecer e sobreviver em baixas concentrações de oxigênio (JACKSON e RAM, 2003). As sementes dessas espécies necessitam aproveitar os curtos e imprevisíveis períodos em que o nível de água recua para a germinação ou desenvolvimento da planta se concretizar (MARQUES e JOLY, 2000). Isso foi comprovado, especialmente para as sementes coletadas na área sujeita ao alagamento recorrente, quando o vigor da sementes foi maior.

No alagamento, existem espécies que paralisam o seu crescimento, reduzindo o consumo de energia, sendo este retomado ao final do período de estresse (PAROLIN, 2009; FERREIRA et al., 2009; MEDRI et al., 2012). Isso foi observado durante a fase II de germinação, pois quando as sementes estavam submersas, elas não absorveram água de forma expressiva. Em até 100 horas pós-estresse as sementes de todos os tratamentos voltaram a embeber normalmente e o metabolismo de germinação foi reativado (Figura 6).

Com relação a disponibilidade de proteínas solúveis totais nas sementes, todos os tratamentos apresentaram o mesmo comportamento durante o processo germinativo. Independente da presença ou ausência do efeito do alagamento, houve um aumento no teor de proteínas logo após o início do processo de embebição, o qual se intensificou após as sementes alcançarem 21% no teor de água (final da fase I). O maior teor alcançado foi no T3 com 27 mg.g<sup>-1</sup> (Figura 7).

Figura 7 - Disponibilidade de proteínas solúveis totais durante a germinação de sementes *Gymnanthes klotzschiana*, submetidas a diferentes períodos de alagamento



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias.

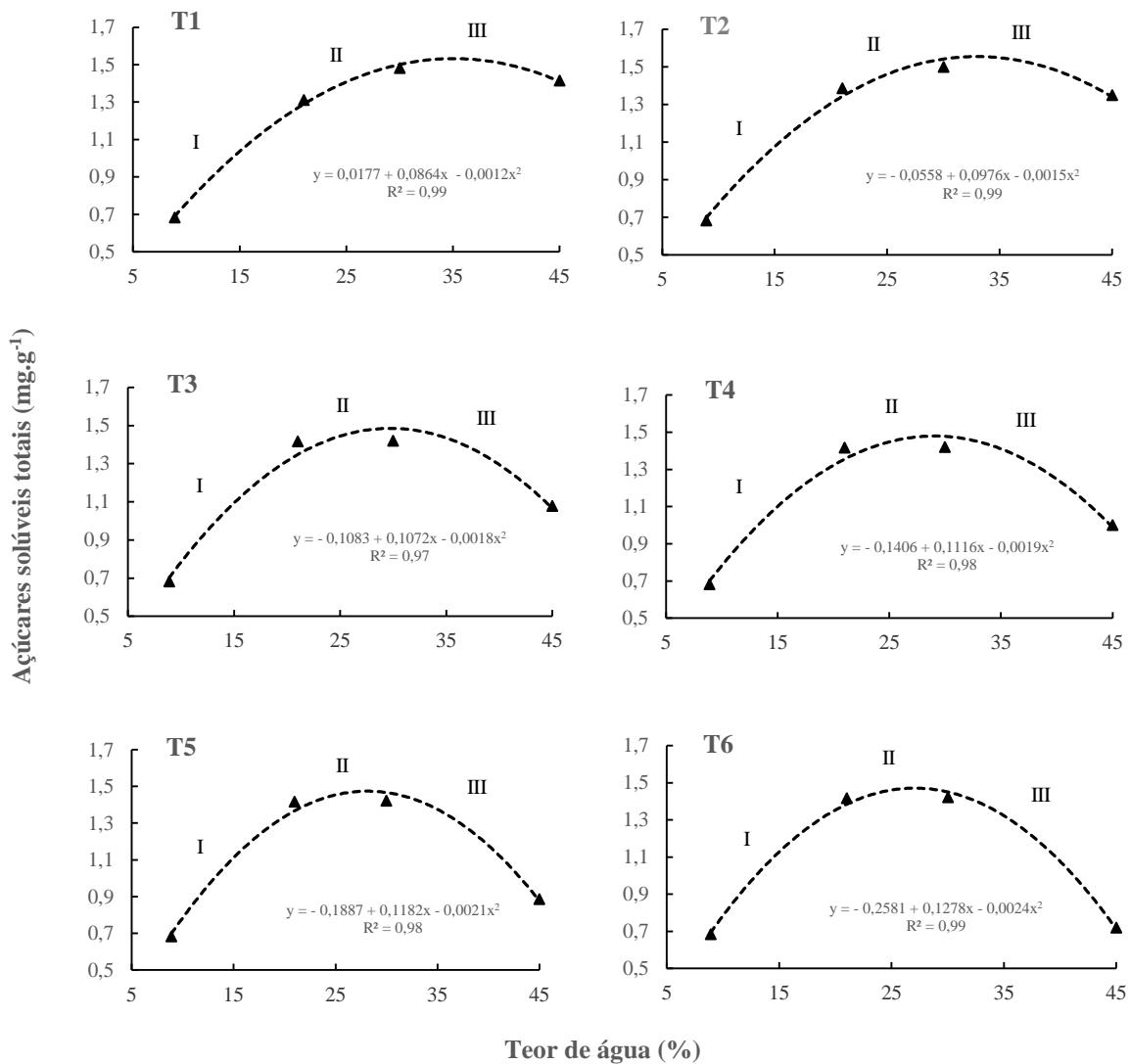
O aumento de proteínas solúveis no decorrer da germinação é compreensível, visto que a síntese de novas proteínas ocorre devido a presença do mRNA pré-existente, o qual foi acumulado no final do processo de maturação (BEWLEY et al., 2013). Entretanto, as proteínas são hidrolisadas (especialmente as duas primeiras fases da germinação) por proteases, disponibilizando aminoácidos e peptídeos necessários a germinação (CARVALHO E NAKAGAWA, 2012).

Enzimas hidrolíticas são produzidas (notadamente durante a fase II) para possibilitar a mobilização das reservas até o embrião (DANTAS et al., 2000), as quais fornecem energia e

esqueletos carbônicos para a formação de uma nova plântula. Lima et al. (2008) comentaram que o acúmulo de proteínas durante a germinação é essencial para fornecimento de nitrogênio e formação de novas proteínas, que por sua vez irão participar na formação de novos tecidos. No final do processo de germinação, o maior acúmulo de proteínas solúveis totais para os tratamentos sob estresse, podem também estar relacionadas a síntese de enzimas antioxidantes.

Os tratamentos apresentaram comportamento similar quanto a presença de açúcares solúveis totais no decorrer da germinação. Nos tratamentos um e dois ocorreu um aumento de açúcares até as sementes atingirem em torno de 30% de umidade (fase II), no entanto houve uma estabilização na disponibilidade de carboidratos no T3, T4, T5 e T6 durante a transição entre as fases I e II da germinação. Quando as sementes entraram na fase III, em todos os tratamentos houve diminuição desse composto. Esta redução foi gradativa, ou seja, a medida que o estresse pelo alagamento se intensificava, ocorria uma maior redução na disponibilidade de açúcares solúveis totais, os quais diminuíram em até 50% ao final da germinação, quando comparado ao T1 (Figura 8).

Figura 8 - Disponibilidade de açúcares solúveis totais durante a germinação de sementes *Gymnanthes klotzschiana*, submetidas a diferentes períodos de alagamento



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias.

Esse aumento inicial de açúcares solúveis totais provavelmente não foi devido a hidrólise do amido (Figura 9), nem a de lipídios (Figura 10). O incremento desse composto poderia ser explicado pela possível quebra de polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC), os quais podem ser os principais carboidratos de reserva em uma semente, devido principalmente ao seu valor energético (TOZZI, 2010; BEWLEY et al., 2013). Desta forma, provavelmente a utilização de açúcares solúveis foi menor que o acúmulo desse composto.

De acordo com Buckeridge e Dietrich (1996), durante o processo de embebição pelas sementes os PRPC exercem uma função importante, sendo que as reservas de rafinose são

degradadas em sacarose. A rafinose e a sacarose podem estar presente em toda a semente, provavelmente se apresentando como reservas locais, por serem pouco móveis (Reid, 1971). Esses compostos são reservas de carbono e energia e importantes para processos de reorganização celular dos tecidos antes do início da mobilização de outras reservas (BUCKERIDGE et al., 2000).

A utilização de polissacarídeos de parede celular é mais conveniente para o metabolismo das sementes durante a germinação, já que não apresentam radicais livres em suas moléculas (BUCKERIDGE et al., 2000). Outra vantagem da presença desse componente de reserva, seria sua baixa atividade osmótica, uma vez que são pouco solúveis em água e altamente compactados na parede celular (BUCKERIDGE et al., 2000). Assim, nessa condição de alagamento não iriam contribuir na diminuição do potencial hídrico interno das sementes e assim poderiam ajudar na preservação da integridade de membranas.

Outra hipótese que poderia explicar o aumento de açúcares seria a gliconeogênese. Miro e Ismail (2013) sugeriram uma via alternativa para converter o acetaldeído em acetil-CoA sob hipoxia, com o envolvimento das enzimas mALDH (Aldeído Desidrogenase) e acetil-CoA sintase (ACS). O acetil-CoA é sintetizado nos glioixissomos e entra no ciclo do glioxilato, o qual fornece os intermediários necessários a síntese de glicose/sacarose como fumarato, malato e oxaloacetato a partir do succinato (LU et al., 2005).

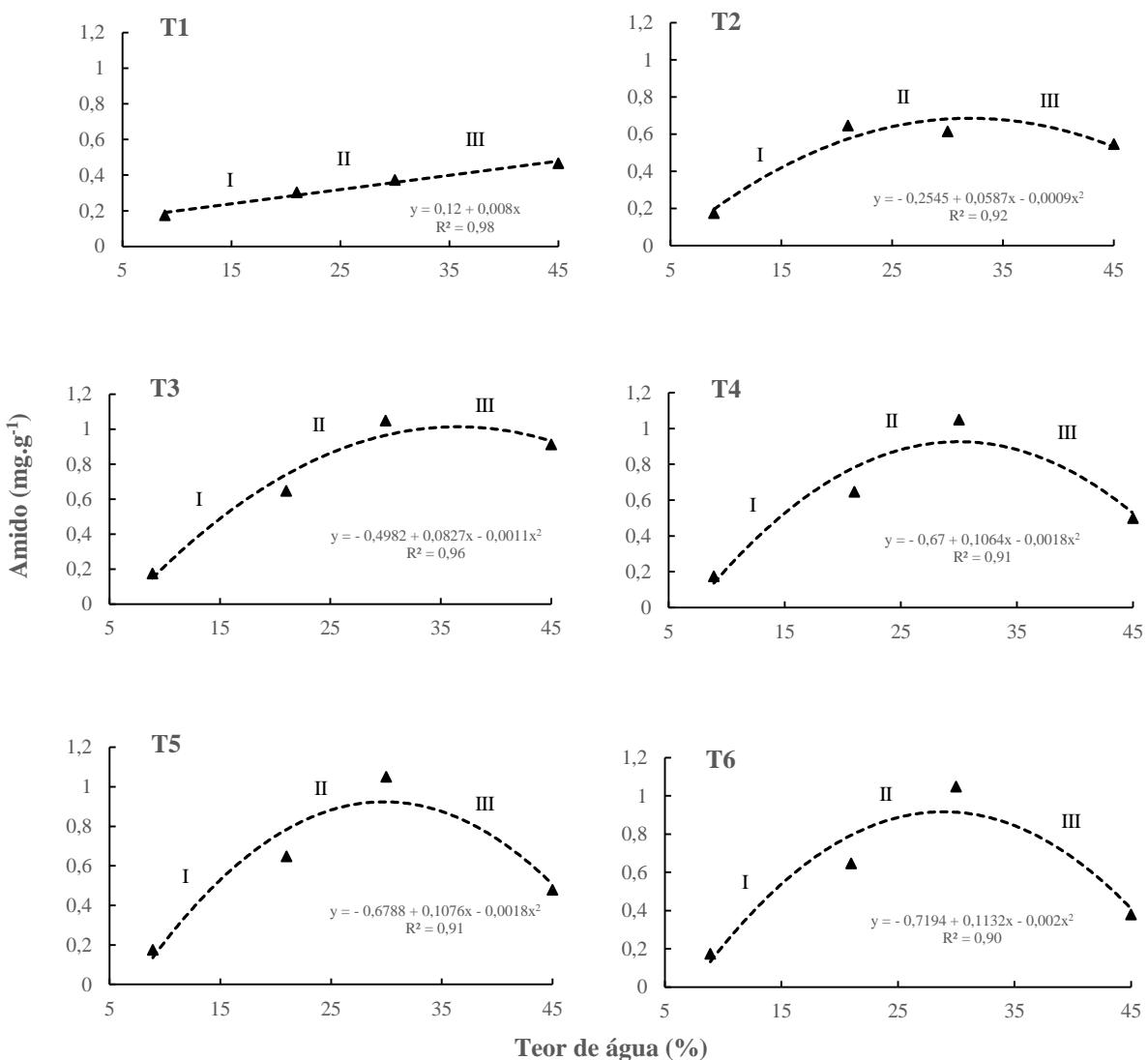
A estabilização no consumo de açúcares para os tratamentos mais severos quanto a disponibilidade de oxigênio é compreensível, visto que nessa condição de estresse e ao mesmo tempo as sementes estando na fase II da germinação, elas diminuíram seu metabolismo germinativo. Após a retirada das sementes do alagamento simulado, houve a retomada da germinação, sendo que o decréscimo na quantidade de açúcares pode estar relacionado a necessidade de maior produção de energia e esqueletos carbônicos para a germinação ser finalizada (PRITCHARD et al., 2002). Magneschi e Perata (2009) salientam que a continuação do metabolismo dos carboidratos é essencial para a germinação e para o estabelecimento de plântulas sob submersão. As sementes com grandes reservas de carboidratos possuem vantagem adaptativa quando o oxigênio é limitante (ELLA et al., 2011).

Nos tratamentos sob estresse a partir de três dias, esse progressivo consumo pode ser explicado tanto pela necessidade de energia, formação de outros compostos e proteínas (Figura 7), como pela maior síntese de lipídios (Figura 10), sugerindo a influência da hipoxia no acúmulo de triglicerídeos, visando o estabelecimento da planta no ambiente.

Apenas o T1 demonstrou comportamento diferenciado com relação à mobilização do amido, que cresceu linearmente ao longo da germinação, iniciado com  $0,2 \text{ mg.g}^{-1}$  e ao final se

obteve um valor próximo de  $0,5 \text{ mg.g}^{-1}$ . Nos demais tratamentos, houve uma tendência ao aumento da quantidade de amido até atingirem a fase II da germinação, sendo que a partir do T3 esse valor ultrapassou  $1 \text{ mg.g}^{-1}$ . (Figura 9). Posteriormente ao estresse, o amido declinou e como aconteceu com os açúcares, os tratamentos que foram submetidos ao estresse mais intenso demonstraram os menores valores para esse polissacarídeo de reserva.

Figura 9 - Mobilização de amido durante a germinação de sementes *Gymnanthes klotzschiana*, submetidas a diferentes períodos de alagamento



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias.

O aumento contínuo do amido no tratamento testemunha, sugere que esta espécie apenas utiliza essa reserva com mais intensidade, quando o alagamento está presente em seu habitat, possivelmente conservando-o para uma possível situação hipóxica futura. Contudo, isso não

significa que a sementes não estejam utilizando essa reserva, porque a síntese pode ser maior que o consumo. Quando as sementes foram expostas a um maior tempo de restrição na disponibilidade de oxigênio durante as duas primeiras fases da germinação maior foi a síntese e seu consumo após a retirada das sementes do efeito da hipóxia (fase III). Isso demonstra que o estresse por hipoxia influência tanto no acúmulo desse composto (fase I e II), quanto na utilização dessa reserva. O consumo provavelmente está relacionado as mesma razões anteriormente elencadas para a utilização dos açúcares solúveis totais.

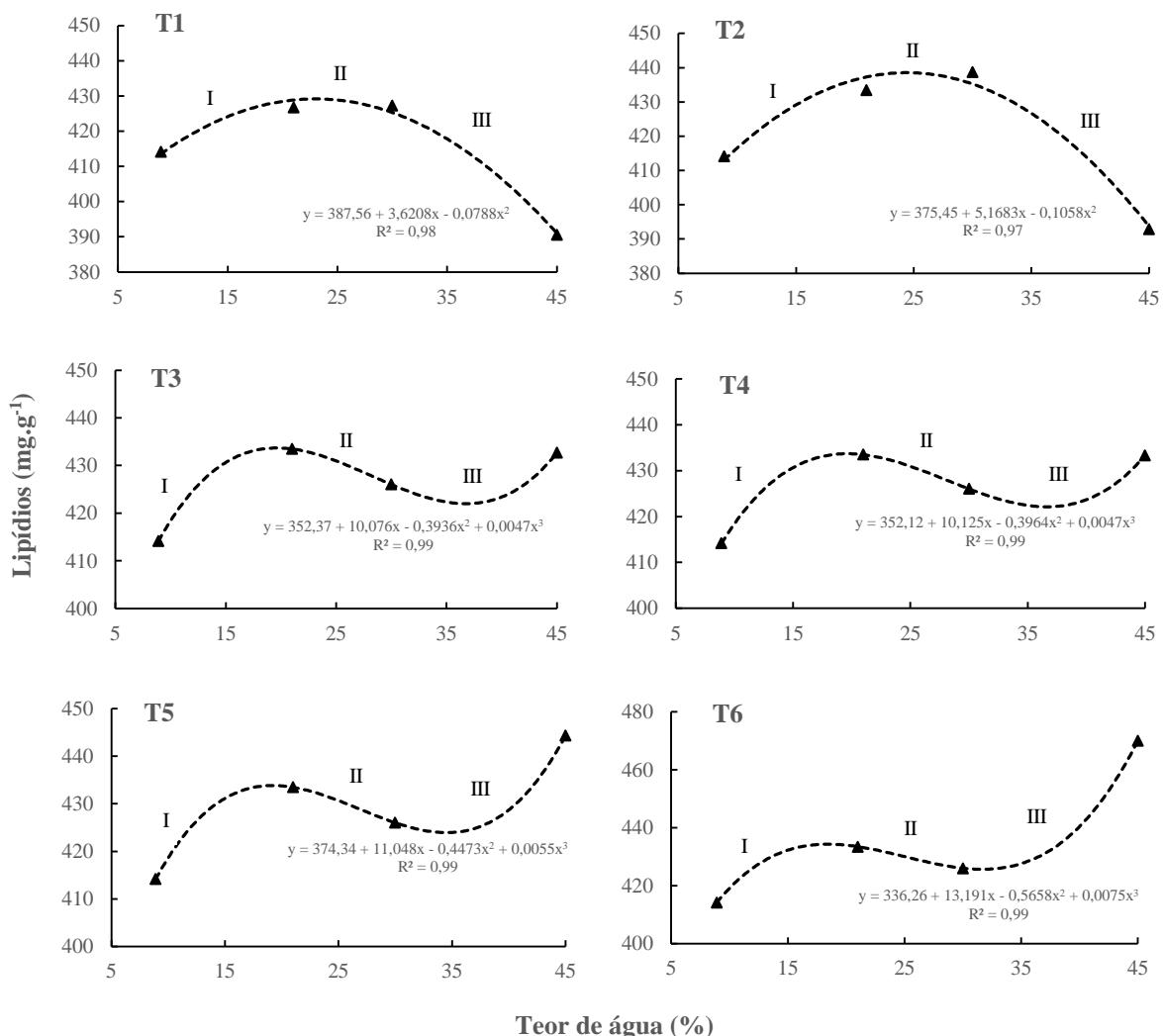
Quando há disponibilidade de açúcares (Figura 8), a glucose pode ser polimerizada em amido (HELDT, 2005), bem como a sacarose pode ser fonte inicial para a produção desse polissacarídeo (BEWLEY et al., 2013). Miro e Ismail (2013) relataram que o metabolismo de carboidratos é fortemente inibido quando o oxigênio é limitante, especialmente as etapas envolvidas na degradação do amido em açúcares simples para uso na glicólise, principalmente porque a maioria das enzimas envolvidas são menos ativas sob baixo oxigênio. Quando o efeito da hipoxia foi retirado, houve um consumo crescente do amido, provavelmente porque o ciclo do ácido cítrico ficou mais ativo, já que esse ciclo é inibido pela falta de oxigênio, o qual atua como um aceitador terminal de elétrons na ultima fase da respiração aeróbia (MIRO e ISMAIL, 2013).

Em sementes de arroz sob hipoxia, as reservas de amido podem manter o metabolismo ativo nas sementes, uma vez que a enzima  $\alpha$ -amilase quebra o amido, o qual fornece grande quantidade de substrato para a rota fermentativa (PERATA et al., 1992), o que provavelmente não ocorreu nas sementes de branquinho. Segundo Borek et al. (2006), a presença de altos teores de açúcares solúveis em tecidos embrionários influenciou a degradação do amido em *Lupinus luteus* L. durante a germinação. No entanto, em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr. os teores de amido nos embriões não diferiram durante o período de embebição (PONTES et al., 2002).

Nas variedades de arroz tolerantes ao alagamento, o catabolismo do amido é essencial para disponibilizar açúcares solúveis para a glicólise e assim a germinação ser finalizada com sucesso (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007; ISMAIL et al., 2009). De acordo com Miro e Ismail (2013) duas enzimas são fundamentais nesse processo, as  $\alpha$ -amilases para a quebra do amido e a sacarose sintase no início da glicólise, pois para a síntese da glicose-1-P, a reação utiliza o PP<sub>i</sub> (pirofosfato) em vez de ATP. Entretanto, os resultados sugerem que o amido não é a principal fonte de carboidratos sulúveis no início da germinação do branquinho, sendo que essa espécie utiliza outra fontes para geração de energia até a fase II, provavelmente PRPC e os lipídios (exclusivo da fase II).

Em relação à presença de lipídios durante a germinação, esse componente de reserva se comportou de maneira diferenciada para os distintos períodos de alagamento avaliados. No entanto, até as sementes atingirem 21% no teor de água, os valores foram similares nos tratamentos testados, aumentando em até 30 mg.g<sup>-1</sup> aproximadamente. Nos tratamentos T1 e T2, os lipídios, até atingirem fase II, tiveram um leve aumento e nos demais tratamentos diminuíram esse componente. A última fase da germinação apresentou um decréscimo na quantidade de lipídios para o T1 e o T2. Entretanto, nos demais tratamentos houve aumento no teor de lipídios durante a fase final de germinação, o qual foi maior à medida que o estresse se intensificava. O T6 apresentou em torno de 470 mg.g<sup>-1</sup> de lipídios ao final do processo germinativo, sendo o maior valor quantificado (Figura 10).

Figura 10 - Disponibilidade de lipídios totais durante a germinação de sementes *Gymnanthes klotzschiana*, submetidas a diferentes períodos de alagamento



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias.

O aumento inicial na quantidade de lipídios não dependeu do estresse, visto que em todos os tratamentos até as sementes atingirem 21% (final da fase I), esse componente teve um incremento similar. Esse comportamento pode ter sido causado pela mesma razão que aumentou o teor de amido, ou seja, pela grande disponibilidade de açúcares solúveis livres nas sementes, desta forma houve a síntese desse composto para ser utilizado nas próximas etapas.

O precursor de todos os ácidos graxos é o acetil-CoA o qual é derivado da sacarose que se encontra disponível no citosol (BEWLEY e BLACK, 2013). Esse aumento dos lipídios também foi verificado nos tratamentos controle (T1) e sob um dia de estresse (T2) durante a fase II da germinação, indicando que as sementes dessa espécie apenas utilizam essa reserva em situação de maior restrição de O<sub>2</sub>, o que ocorreu nos tratamentos com maior tempo de alagamento (fase II), ou seja, a partir de três dias de restrição de oxigênio. Contudo, essa diminuição no conteúdo dos lipídios pode estar relacionada a peroxidação lipídica.

A utilização das reservas lipídica na fase III no T1 e no T2 indica que as sementes utilizaram essas reservas para uma germinação mais rápida, visto que são compostos com valor energético alto (TAIZ e ZEIGER, 2013). O incremento no teor de lipídios para os tratamentos T3, T4, T5 e T6, na última fase de germinação, teve influência do estresse pela falta de oxigênio. Edwards et al. (2012) relataram durante a germinação em arroz sob anoxia e hipoxia que ocorreu a mudança do metabolismo de oxidação dos lipídios para a sua biossíntese, uma vez que uma grande proporção do ATP gerado foi alocada para manter a integridade das membranas. Além disso, os lipídios de membrana podem funcionar como precursores de compostos sinalizadores, os quais são importantes para perceber alguma alteração ambiental adversa (TAIZ e ZEIGER, 2013). Contudo, essa síntese a partir do início da fase III pode estar relacionada a formação de novas células e tecidos.

#### 4 CONCLUSÃO

Em ambas as áreas e em todos os tratamentos, as sementes de *Gymnanthes klotzschiana* demonstram o padrão trifásico de germinação.

Houve aumento contínuo no conteúdo de proteínas solúveis totais ao longo de toda germinação de todos os tratamentos.

Até a fase II da germinação as sementes aumentaram a disponibilidade de açúcares solúveis totais e na última fase houve o consumo desse componente de reserva. Esse comportamento ocorreu em todos os tratamentos.

O amido foi utilizado com maior intensidade apenas na última fase da germinação quando as sementes foram expostas ao estresse pelo alagamento. O seu crescente aumento até a fase II pode ser explicado pela maior disponibilidade de açúcares solúveis totais.

Houve aumento no teor de lipídios até o inicio da fase II da germinação. Durante a fase III da germinação, ocorreu a síntese de lipídios nos tratamentos a partir de três dias de estresse, demonstrando a influência do alagamento na disponibilidade desse componente.

Diante desses resultados incomuns, especialmente quanto ao comportamento dos açúcares solúveis totais e dos lipídios totais, sugere-se estudos posteriores para tentar elucidar melhor os resultados deste trabalho.



## CAPÍTULO III

### ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE E DO CICLO RESPIRATÓRIO EM SEMENTES DE *Gymnanthes klotzschiana* MÜLL.ARG. SUBMETIDAS A SUBMERSÃO

#### RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho verificar a presença do peróxido de hidrogênio, alterações enzimáticas associadas à respiração celular, a presença de antioxidantes enzimáticos, e a peroxidação lipídica em sementes de *Gymnanthes klotzschiana*, colhidas em duas áreas e submetidas a diferentes período de simulação do estresse pelo alagamento. Foram avaliadas as enzimas álcool desidrogenase - ADH, malato desidrogenase - MDH, superóxido dismutase - SOD e catalase - CAT. Esses parâmetros foram avaliados em quatro pontos da curva de embebição de sementes submetidas ao alagamento controlado por T1: controle; T2: um dia; T3: três dias; T4: cinco dias; T5: dez dias; e T6: vinte dias. O aumento do estresse pelo alagamento diminuiu a expressão da enzima ADH nas sementes da área 2, no entanto a MDH foi similar em ambas. A SOD apresentou um padrão similar nestas áreas em todos os pontos da curva e nos tratamentos avaliados, contudo a CAT foi expressa apenas no último ponto da curva nas sementes da área 2. Por fim, os índices de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA foram mais elevados durante a germinação nas sementes da área 2, em praticamente todos os pontos da curva e tratamentos propostos. Esses resultados indicam que as sementes da área 1 são mais adaptadas a hipoxia, pois utilizam o piruvato de maneira mais eficiente e são mais efetivas no controle das espécies reativas de oxigênio – EROS.

**Palavras chaves:** Curva de embebição. Hipoxia. Estresse.

ANTIOXIDANT ENZYMIC ACTIVITY AND RESPIRATORY CYCLE IN SEEDS OF  
*Gymnanthes klotzschiana* MÜLL.ARG. SUBMERGED

#### ABSTRACT

The objective of this work was to verify the presence of hydrogen peroxide, enzymatic changes associated with cellular respiration, the presence of enzymatic antioxidants, and lipid peroxidation in *Gymnanthes klotzschiana* seeds, harvested in two areas and submitted to different periods of stress simulation by the flood. The enzymes alcohol dehydrogenase - ADH,

malate dehydrogenase - MDH, superoxide dismutase - SOD and catalase - CAT were evaluated. These parameters were evaluated in four points of the seed imbibition curve submitted to flood control by T1: control; T2: one day; T3: three days; T4: five days; T5: ten days; and T6: twenty days. Increased stress from flooding decreased the expression of the ADH enzyme in the seeds of area 2, but MDH was similar in both. SOD presented a similar pattern in these areas at all points of the curve and in the evaluated treatments, however the CAT was only expressed at the last point of the curve in the seeds of area 2. Finally, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA indexes were higher during the Germination in the seeds of area 2, at practically all the points of the curve and proposed treatments. These results indicate that the seeds of area 1 are more adapted to hypoxia, since they use pyruvate more efficiently and are more effective in controlling the reactive oxygen species (ROS).

**Keywords:** Imbibition curve. Hypoxia. Stress.

## 1 INTRODUÇÃO

O branquinho (*Gymnanthes klotzschiana*) é uma espécie que ocorre nos domínios do Bioma Mata Atlântica podendo ser encontrado em diferentes formações florestais, como na Floresta Estacional Semidecidual e na Floresta Ombrófila Mista (IBGE, 2012). A preferência por solos úmidos e aluviais faz com que essa espécie ocorra com maior densidade em áreas de matas ciliares (SILVA et al., 2012).

A partir da segunda metade do século 20, houve um aumento significativo no número e na intensidade das inundações, afetando o desenvolvimento das plantas (BAILEY-SERRES et al., 2012) devido, principalmente, a restrição na difusão de gases para dentro e para fora das células vegetais (CHENG et al., 2016). Somado a isso, o alagamento é uma situação comum e ocorre corriqueiramente em locais de baixada próximos ou não a cursos de água. As inundações podem influenciar negativamente na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas, já que estes eventos são ativados fisiologicamente sob um requerimento adequado de oxigênio (KOZLOWSKI e PALLARDY, 1997).

Inundações restringem a disponibilidade de O<sub>2</sub> no solo, diminuindo a energia produzida pelas plantas, já que a síntese de ATP é menos eficiente durante a respiração anaeróbia (BAILEY-SERRES et al., 2012). A glicólise é a única etapa da respiração que não requer oxigênio, desta forma necessitando um alto fluxo glicolítico para manter a integridade e funcionalidade celular (KATO-NOGUCHI, 2006). Uma maior taxa de glicólise pode ser sustentada pela regeneração NAD<sup>+</sup> realizada via fermentação do piruvato a etanol (LIMA et al.,

2008) e/ou através da síntese de outro ácido orgânico, o malato (BASAGLIA, 1989). Para a rota fermentativa ocorrer há necessita da atividade da enzima ADH e para a produção do malato, da enzima malato desidrogenase – MDH (TAIZ e ZEIGER, 2013).

As EROs podem danificar os componentes celulares durante a falta de oxigênio intracelular (BAXTER-BURRELL et al., 2002; FUKAO et al., 2006). Contudo, o peróxido de hidrogênio pode atuar na detecção precoce da hipoxia, servindo como um sinal eficaz na indução de respostas adaptativas (BLOKHINA e FAGERSTEDT, 2010). Em plantas, algumas enzimas podem usar os produtos da fermentação, como o acetaldeído, para sintetizar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HARRISON, 2002). O radical superóxido, o radical hidroxila são outros exemplos de EROs (RAHMAN et al., 2006), os quais podem ser neutralizadas por compostos enzimáticos antioxidantes como a superóxido dismutase e a catalase (DOLATABADIAN e MODARRESSANAVY, 2008; GLEASON, 2012).

Levando em consideração que a ação do oxigênio na germinação das sementes é pouco estudada e ao mesmo tempo essa molécula é essencial para a maioria das sementes completarem o processo germinativo, objetivou-se com esse trabalho verificar alterações enzimáticas associadas a respiração celular, a presença de antioxidantes enzimáticos, a atividade do peróxido de hidrogênio e a peroxidação lipídica em sementes de *G. klotzschiana*, colhidas em duas áreas e submetidas a diferentes período de simulação do estresse pelo alagamento.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### **2.1 Seleção de matrizes, colheita, extração e beneficiamento das sementes**

Foram selecionadas matrizes adultas livres fitossanitários aparentes e distâncias mínima entre elas de 30 metros, conforme recomendações de Higa (2006). As sementes foram coletadas de frutos maduros (coloração marron-escura) provenientes de duas áreas. A primeira localizada no município de Lages, SC (área 1) foram selecionadas 20 matrizes e está a uma altitude de aproximadamente 890 metros (Lat: -27.841221° e Long: 50.234878°). Na área 2 foram selecionadas oito matrizes e está localizada no município de Capão Alto, SC a uma distância aproximada de 65 km em linha reta da Área 1 e com altitude em torno de 930 metros (Lat: -28.196411° e Long: -50.752545°). De acordo Klein (1960) e IBGE (2012), a área 1 é caracterizada como Floresta Ombrófila Mista Aluvial, e a área 2 como Floresta Ombrófila Mista Montana em transição com a Floresta Estacional Semidecidual Montana. A área 1 se caracteriza por ser um ambiente propício ao alagamento periódico, por estar em local de baixada e

acompanhar o curso do Rio Caveiras. Esse fragmento possui aproximadamente 50 hectares. A área 2 está inserida próxima ao Rio Pelotas, e acompanha um dos “braços” da área de alague da UHE Barra Grande, no entanto por estar em local íngreme não sofre o efeito do alagamento.

Após a coleta, os frutos foram colocados em sacos plásticos e encaminhados ao Laboratório de Sementes da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) para extração das sementes, a qual ocorreu de maneira espontânea à sombra sob lona preta. A separação das sementes dos restos frutos ocorreu com uso de peneiras e manualmente. Posteriormente as sementes foram armazenadas em câmara fria ( $10^{\circ}\text{C}$  e UR = 65%).

## **2.2 Tratamentos de alagamentos**

Para a simulação do estresse hídrico por alagamento, 100 sementes, divididas em 4 repetição, foram colocadas em copo plástico com 60 ml de água destilada, a qual foi renovada a cada 72 h. Foram utilizados seis tratamentos: um dia (T2), três dias (T3), cinco dias (T4), dez dias (T5) e vinte dias de alagamento (T6), além do tratamento testemunha, sem alagamento (T1).

## **2.3 Obtenção das curvas de embebição e pontos selecionados para as análises enzimáticas e bioquímicas**

As curvas de embebição foram realizadas para a seleção de pontos, durante o processo de germinação, em que seriam realizadas as análises bioquímicas e também para verificar o comportamento na absorção de água nos diferentes tratamentos propostos.

Assim, para cada tratamento, as curvas foram obtidas por meio da seguinte fórmula:

$Peso Final = \frac{Peso Inicial \times (100 - Umidade Inicial)}{100 - Umidade Final}$ . As pesagens foram realizadas nas primeiras 24 horas a cada 6 horas, e posteriormente a cada 12 horas. Cada curva foi finalizada quando pelo menos 40% das sementes de cada repetição apresentavam radícula de três milímetros. A umidade inicial foi determinada de acordo com Brasil (2009), através de duas repetições de 2g.

Para as avaliações durante as três fases de germinação foram selecionadas sementes que estavam em diferentes pontos de umidade na curva de embebição. Para a área 1 foram a 8,9 % (umidade inicial), 21% (fase I), 30% (fase II) e 45% (fase III) de umidade; na área 2 os pontos de umidade foram: 9,2% (umidade inicial), 21% (fase I), 40% (fase II) e 55% (fase III), ou seja, quatro pontos da curva de embebição.

Após a aplicação dos tratamentos e em cada ponto da curva de embebição selecionado, em sementes de ambas as áreas, foram realizadas as determinações de atividade enzimática respeiratória e antioxidante, bem como do peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica.

#### **2.4 Expressão enzimática – preparação das amostras**

Para a avaliação de isoenzimas, previamente as sementes foram moídas em cadinho na presença de nitrogênio líquido. Foram utilizados 100 mg de sementes já processadas por amostra e adicionados em cada amostra 250 µL do tampão de extração (Tris HCL 0,2M, pH 8,0 + 0,1% de β-mercaptoetanol). Posteriormente, o material foi homogeneizado em vortex por cinco segundos e deixado em geladeira Over-Night. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm/4 °C por 30 minutos e os sobrenadantes reservados (ALFENAS, 2006).

#### **2.5 Preparação do gel para as enzimas – Nativa Page**

O gel separador foi produzido com 87 mL de água destilada, 13,5 mL de Tris HCL 3,778 M (pH 8,9), 33 mL de acrilamida 30%, 450 uL de APS 10% e 180 uL de TEMED. O concentrador foi preparado com 36,45 mL de água destilada, 4,5 mL de Tris HCL 0,6173 M (pH 6,8), 6,75 mL de acrilamida 30%, 150 uL de APS 10% e 90 uL de TEMED. O APS e o TEMED foram adicionados a solução no mesmo momento, após a mistura dos demais reagentes.

#### **2.6 Corrida eletroforética**

A corrida foi processada em géis de poliacrilamida (Nativa-Page) a 7,5% para o gel separador) e a 4,5% para o gel concentrador. O tampão do tanque utilizado para o sistema gel/eletrodo foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 50 µl da amostra extraída em cada poço do gel e as corridas foram realizadas a 160 V por aproximadamente cinco horas em geladeira a 12 °C. O tampão do tanque foi preparado com 63,2 g de Tris Base (PM 121,14), 39,9 g de glicina e 600 mL de água destilada e colocada para dissolver sob agitação. Em seguida, completou o volume para 900 mL. Em um recipiente a parte foi colocado 10 g de SDS em 100 mL de água. Por fim, misturou-se as soluções obtendo um volume final de 1 L.

## 2.7 Revelação das enzimas

A solução de revelação para ADH foi preparada (nessa sequência) com 20 mL de etanol 95%, 20 mg de  $\beta$ -NAD + NA<sub>2</sub>, 20 mg de MTT, 2 mg de PMS e 100 mL de Tris-HCL 0,2 M (pH 8,0) (o etanol foi inserido na solução no momento da revelação). Após a retirada do gel da placa, este foi colocado em uma tigela de vidro e adicionada a solução (para todas as enzimas esse procedimento). Posteriormente foi incubado o gel no escuro a 30-37 °C por 12 horas para o aparecimento das bandas, conforme Alfenas (2006).

Para a MDH, a solução foi composta de 2,8 mL de DL malato 10%, 15 mg de  $\beta$ -NAD, 67,2 mL de Tris-HCL 0,1 M (pH 8,5), 20 mg de MTT, 20 mg de PMS 1%; previamente foi dissolvido o  $\beta$ -NAD no malato e depois os demais componentes. O gel foi incubado no escuro a 30-37 °C por aproximadamente cinco minutos, até o aparecimento das bandas (ALFENAS, 2006).

A solução para revelar a SOD consistiu de 4 mg de riboflavina, 300 mg de EDTA, 20 mg de MTT e 100 mL de Tris-HCL 0,05 M (pH 8,0) (foi dissolvido a riboflavina e o EDTA na solução tampão). A solução foi colocada sobre o gel a 30-37 °C e a revelação ocorreu na presença de luz branca em aproximadamente cinco minutos, conforme Alfenas (2006).

A CAT foi revelada através da solução composta por 2 g de ferrocianato de potássio e 2 g de cloreto de ferro, sendo que foram dissolvidos esses reagentes em 200 mL de água destilada (primeiro o ferrocianato de potássio). Em seguida essa solução foi agitada e filtrada em papel germitest. Após a retirada do gel da placa, foi adicionado uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01% e colocado sobre agitação durante cinco minutos. Em seguida o gel foi lavado em água corrente e adicionado a solução de revelação previamente filtrada. O gel foi incubado a 35 °C por aproximadamente cinco minutos para o aparecimento das bandas (ALFENAS, 2006).

## 2.8 Quantificação dos pixels das enzimas

Para a quantificação das enzimas reveladas foi utilizado o programa ImageJ®, desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health (RASBAND, 2017) e os resultados foram expressos em pixels/ $10^4$ .

## **2.9 Teores de Peróxido de hidrogênio**

A quantificação do peróxido de hidrogênio foi realizada de acordo com Alexieva et al. (2001). Foram utilizadas duas repetições de 0,2 g em cada ponto da curva de embebição para os seis tratamentos propostos. Inicialmente as amostras foram trituradas e maceradas em nitrogênio líquido, em seguida foi adicionado 2 mL do tampão de extração (ácido tricloroacético a 0,1%). Para a extração o material preparado foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. Para a quantificação utilizou-se 200 µL do sobrenadante acrescido de 800 µL de iodeto de potássio e 200 µL de tampão fosfato (0,1M pH 7,5), onde ficaram no gelo por uma hora. Posteriormente as amostras ficaram em temperatura ambiente por 15 minutos e para as leituras utilizou espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S a 390 nm. Os resultados foram expressos em µg.g<sup>-1</sup> massa fresca.

## **2.10 Peroxidação lipídica**

O malondialdeido (MDA) foi quantificado conforme procedimento desenvolvido por Heath e Packer (1968). Utilizou-se 0,2 g de sementes em cada ponto da curva de embebição para cada tratamento proposto. A extração da amostra seguiu o mesmo procedimento para a quantificação do peróxido de hidrogênio. O MDA foi quantificado utilizando 50 µL do sobrenadante, adicionando mais 1 mL de ácido tricloroacético 20% e ácido tiobarbitúrico a 0,5%, e posteriormente foram incubados por 30 minutos a 95 °C. A reação química foi paralisada em gelo por 10 minutos e em seguida ficaram em repouso por 15 minutos. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S a 600 e 535 nm. Os resultados foram apresentados em µmol.g<sup>-1</sup> de peso fresco.

## **2.11 Análise estatística**

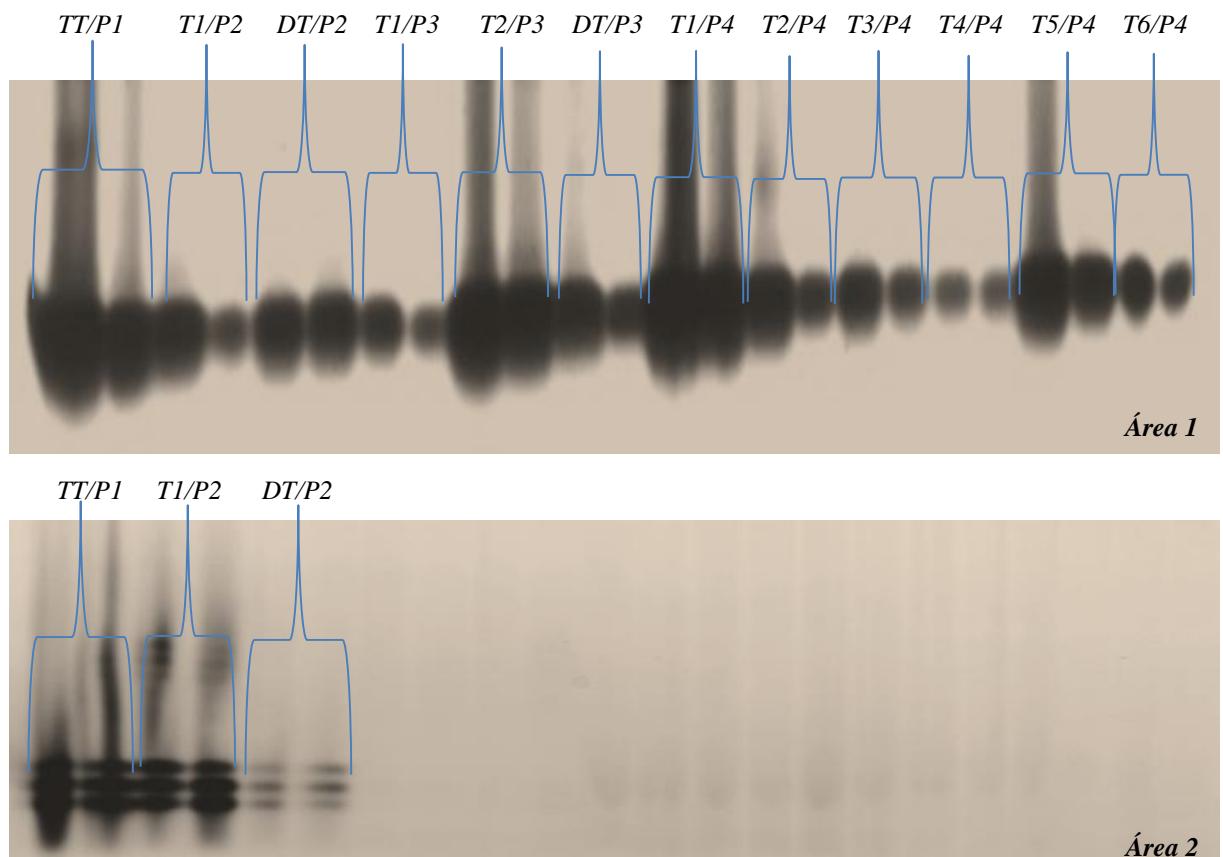
Os dados inicialmente foram submetidos a análise de normalidade pelo Teste de Shapiro Wilk. Em seguida foi realizada a análise fatorial 6 x 4 x 2 (seis tratamentos, quatro pontos na curva de embebição e duas áreas de coleta) e os valores gerados foram avaliados pelo Teste F e as médias pelo Teste Scheffé (1959) a 0,1% de probabilidade utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### **3.1 Processo respiratório sob restrição de oxigênio durante a germinação**

Com relação a expressão da ADH, verificou-se a presença em todos os pontos da curva de embebição de todos os tratamentos para as sementes coletadas na área 1. No entanto, para a área 2 essa enzima foi expressa apenas nos pontos 1 e 2 da curva (Figura 11). Os índices de expressão para ambas as áreas foram estatisticamente iguais antes do início da germinação (próximo de 50.000 pixels), mas significativamente superior para as sementes oriundas da área 1, quando atingiram 21% de umidade (P2), com exceção do tratamento testemunha (T1). De forma geral, a atividade dessa enzima diminuiu ao longo da germinação, sendo que os menores índices foram observados quando as sementes foram retiradas do alagamento controlado (P4), como demonstra na figura 12. O piruvato gerado durante a glicólise pode ser convertido em acetaldeído pela enzima PDC. O acetaldeído pode ser metabolizado por duas vias, uma delas em etanol pela enzima ADH (CASTRO et al., 2005; MIRO e ISMAIL, 2013).

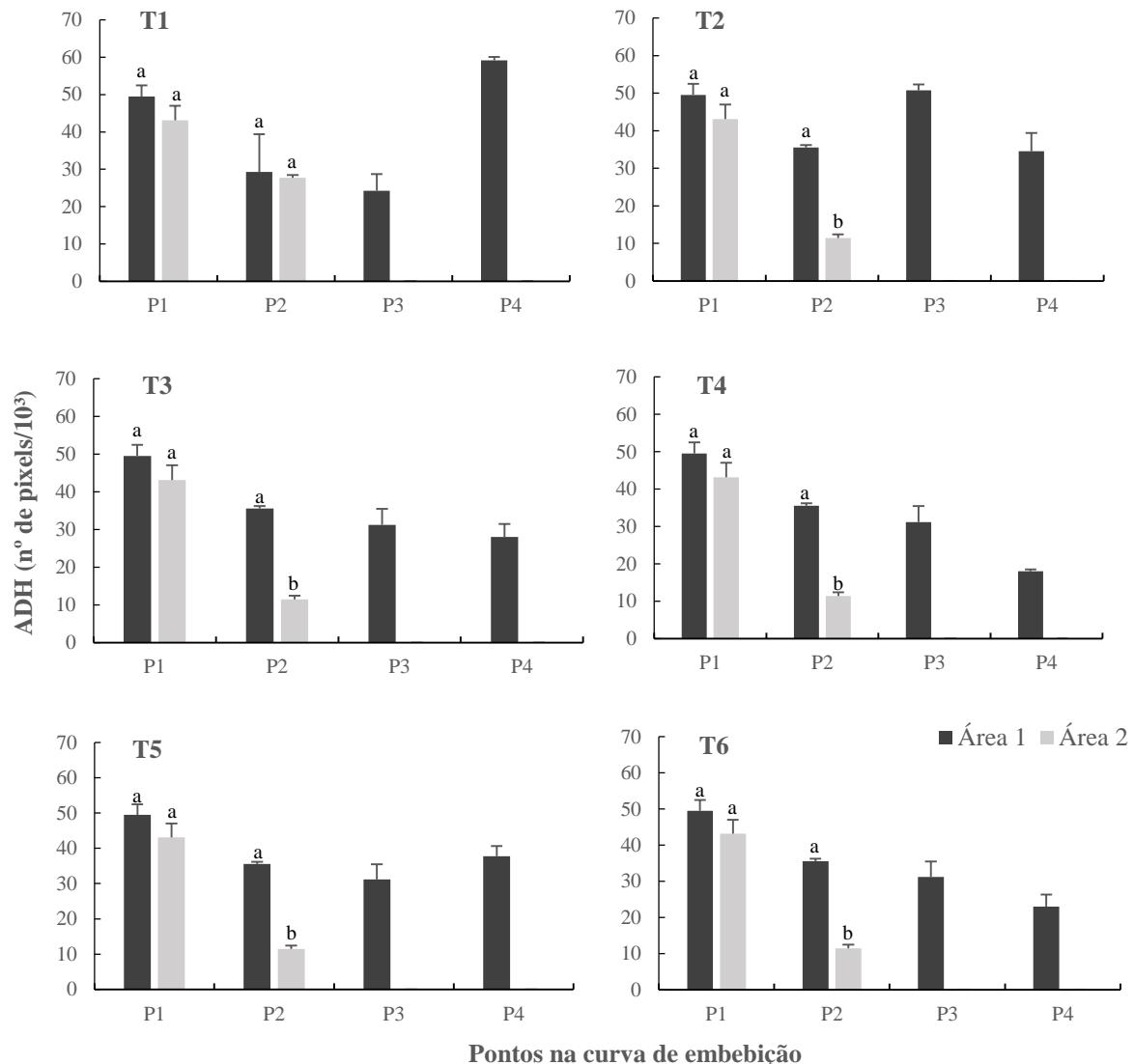
Figura 11 - Expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes de *Gymnanthes klotzschiana* coletadas em Lages, SC (área 1) e Capão Alto (área 2), quando submetidas ao efeito de diferentes períodos de estresse pelo alagamento em quatro pontos da curva de embebição



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

TT: todos os tratamentos; DT: demais tratamentos avaliados; Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias; P: pontos na curva de embebição com relação a umidade das sementes (área 1 - P<sub>1</sub>: 8,9% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 30% - fase II; P<sub>4</sub>: 45% - Fase III; e área 2 - P<sub>1</sub>: 9,2% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 40% - fase II; P<sub>4</sub>: 55 - fase III).

Figura 12 - Índices quantitativos da enzima álcool desidrogenase (ADH) durante a germinação de *Gymnanthes klotzschiana* sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Scheffé ( $\alpha=0,1$ )

P: pontos na curva de embebição com relação a umidade das sementes (área 1 - P<sub>1</sub>: 8,9% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 30% - fase II; P<sub>4</sub>: 45% - Fase III; e área 2 - P<sub>1</sub>: 9,2% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 40% - fase II; P<sub>4</sub>: 55% - fase III; Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T3 - dois dias; T4 - três dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias).

A expressão da ADH nos dois primeiros pontos da curva de embebição pode estar relacionada à baixa permeabilidade natural para a entrada de oxigênio e sua difusão lenta para os demais tecidos da semente. De acordo com YU et al. (2014), no início da germinação a energia é fornecida principalmente pela respiração anaeróbica, logo após a atividade respiratória normaliza, à medida que ocorre o consumo do oxigênio. A enzima ADH tende a estar presente durante a germinação, principalmente no início (BEWLEY et al., 2013), sendo também

importante na eliminação deletéria do acetaldeído. Somado a isso, durante as primeiras horas da germinação após a embebição, as mitocôndrias não estão completamente desenvolvidas e a piruvato desidrogenase (PDH) e as enzimas do ciclo de ácido tricarboxílico não estão ativas (HOWELL et al., 2006), desta modo juntificando a rota fermentativa no início do processo germinativo, pelo menos até as sementes atingirem 21% de umidade (P2).

Albuquerque et al. (2009) avaliaram o perfil isoenzimático de álcool desidrogenase durante a embebição de sementes de *Bowdichia virgiliooides* Kunth, em condições ideais de germinação e verificaram alta atividade da enzima no início e posterior diminuição nas fases finais do processo germinativo. Conley et al. (1999) também observaram uma grande diminuição na atividade dessa enzima em sementes de uma linhagem selvagem de *Arabidopsis* durante a germinação, principalmente a partir do quinto dia de embebição.

A menor presença dessa enzima ao final da primeira fase, e a não expressão na fase II e III da germinação no tratamento testemunha e quando as sementes da área 2 foram expostas ao alagamento controlado, pode revelar uma menor adaptabilidade a restrição de oxigênio para as sementes dessa área. Esse fato não foi evidenciado nas sementes da área 1, pois a atividade da ADH foi constante nas três fases da germinação, idenpendente do efeito do alagamento. Gravot et al. (2016) comentam que a fermentação é a marca clássica contra as inundações, pois permite que as células vegetais evitem a acumulação tóxica do acetaldeído, bem como sustentem fluxos glicolíticos que satisfaçam necessidades energéticas e metabólicas mínimas para lidar com a hipoxia.

Em condições de baixa disponibilidade de O<sub>2</sub>, o pH citoplasmático também pode ser alterado, o que pode causar a morte celular. A redução do pH do citosol tem sido associada à via de fermentação do ácido láctico, em que o lactato é produzido a partir do piruvato através da atividade da lactato desidrogenase (MIRO e ISMAIL, 2013). Roberts et al. (1992) trabalharam com coleóptilos anóxicos em arroz e concluíram que a diminuição do pH ativa a rota fermentativa do etanol. No entanto, a proporção de succinato e lactato foi considerada relevante para a acidose do citoplasma e poderia diferenciar entre espécies tolerantes e não tolerantes dependendo da sua capacidade de produzir mais succinato do que o lactato para sobreviver à hipoxia (FAN et al., 2003; FELLE, 2005; KULICHIKHIN et al., 2009).

De acordo com van Dongen et al. (2004), as sementes do cereais como o milho e o arroz apresentam tecidos hipóxicos ou anóxicos, onde a respiração e, portanto, a produção de energia se tornam limitantes durante a germinação sob condições normais. Howell et al. (2009) observaram a transcrição de enzimas em sementes de arroz em germinação, e concluíram que tanto a respiração como a fermentação alcoólica são induzidas, supostamente para regular a

respiração e evitar anoxia interna, o que colocaria em risco o crescimento do embrião (ZABALZA et al., 2009). Em mutantes *rad* deficientes no gene *adh1* ocorre o acúmulo do piruvato, o que poderia acelerar a respiração e levar as sementes a anoxia, causando danos irreparáveis às células (HOWELL et al., 2006). Isso poderia explicar de forma satisfatória a atividade da enzima ADH durante todas as fases da germinação nas sementes coletadas na área 1. Não obstante, as sementes dessa área podem sofrer restrição de O<sub>2</sub> a qualquer momento durante a germinação, desta forma a fermentação supriria a necessidade energética momentânea para as sementes.

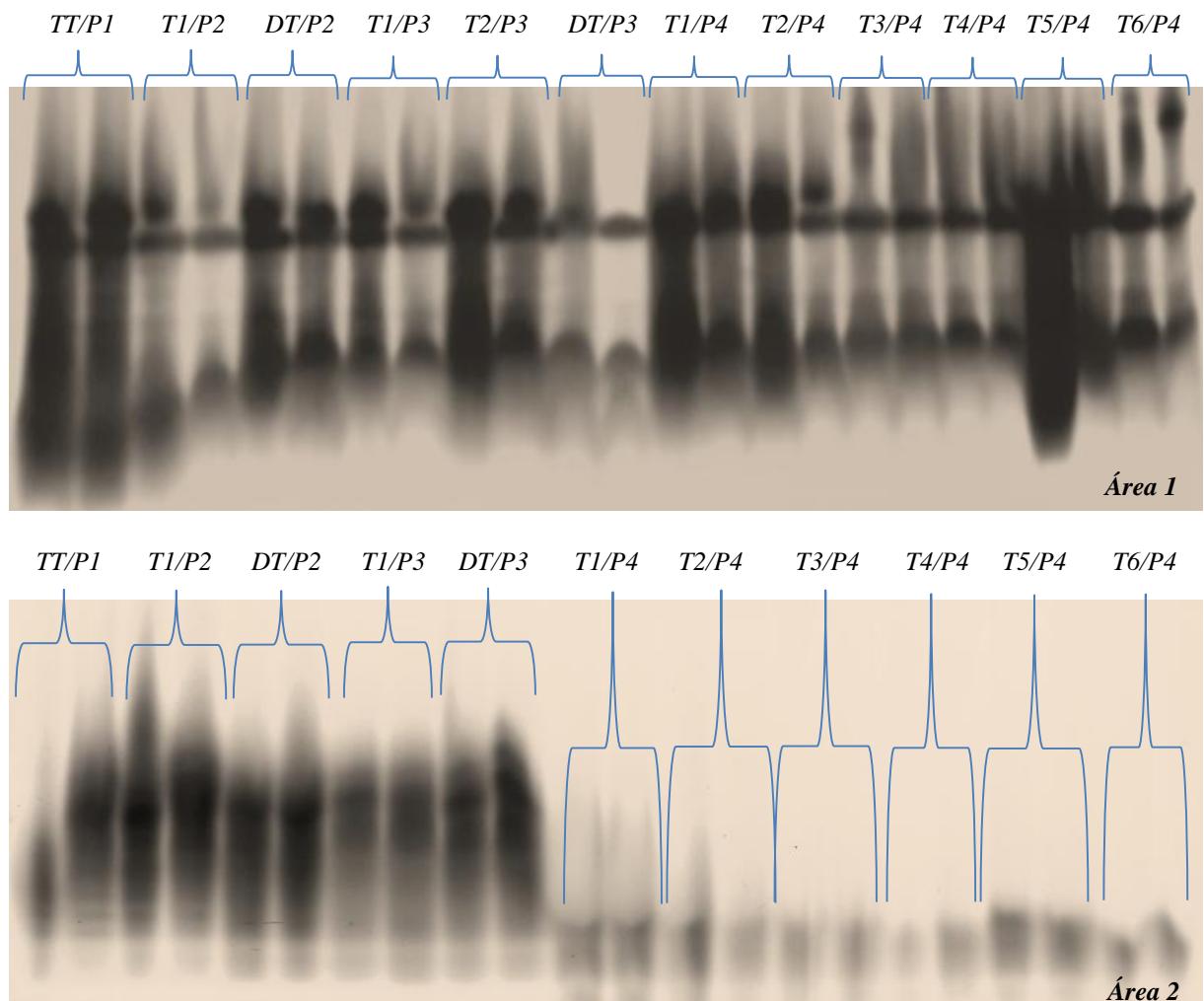
A manutenção da produção mínima de energia sob baixos níveis de O<sub>2</sub> celular só é alcançada pela atuação conjunta dos genes *pdc1*, *pdc2*, *adh1* e *aldh1* (KLOK et al., 2002). A expressão de ADH é sensível às concentrações de oxigênio (van DONGEN et al., 2009). Ismail et al. (2009) avaliaram sementes de duas variedades de arroz, uma tolerante (Khao Hlan On) e outra intolerante (IR42) ao alagamento, onde foi demonstrado que a enzima ADH obteve uma atividade 100 vezes maior que a ALDH e cerca de 10 vezes a de PDC no genótipo tolerante. Em *Arabidopsis thaliana*, *adh1*, *pdc1* e *pdc2* têm sido relatados como importantes intervenientes nas respostas contra as inundações (ISMOND et al., 2003; MITHRAN et al., 2014). Outros estudos com mutações (CONLEY et al., 1999, TOUGOU et al., 2012) sugerem que a falta de *adh1* cria uma deficiência energética que afeta o processo germinativo, induzindo respostas semelhantes à germinação sob imersão. Takahashi et al. (2011) concluíram que a escassez de energia no mutante *rad* germinado sob submersão completa afetou tanto a divisão celular quanto a extensão celular.

A produção de etanol parece estar regulada para evitar o acúmulo de produtos tóxicos e também para coordenar a síntese e o consumo de energia (GIBBS e GREENWAY, 2003). Contudo, a diminuição do acetaldeído através da via da ADH e da ALDH pode balancear a atividade da ADH na direção oposta para gerar o acetaldeído a partir do etanol, cuja reposição pode regular a atividade de PDC. Deste modo, a ADH pode indiretamente regular a atividade da PDH durante a submersão pela quantidade de acetaldeído existente (MIRO e ISMAIL, 2013).

A expressão da MDH foi verificada nos quatro pontos da curva de embebição de todos os tratamentos e nas duas áreas (Figura 13). Nas sementes oriundas da área 1, a atividade da MDH foi maior antes do início da germinação ( $\cong 170.000$  pixels), quando o teor foi significativamente superior ao alcançado pelas sementes da área 2 ( $\cong 65.000$  pixels). Ao final da fase I da germinação (P2), a presença dessa enzima foi similar na maioria dos tratamentos ( $\cong 100.000$  pixels), com exceção da testemunha, quando a MDH foi maior para nas sementes coletadas na área 2. Durante a fase II (P3), ou seja, quando as sementes apresentam um menor

metabolismo, a expressão da MDH foi parecida no T1 e T2, mas superior nos demais tratamentos para a área 2. Quando as sementes foram reoxigenadas (P4) a maior a expressão da MDH foi percebida nas sementes da área 1 (Figura 14). A MDH, dentre outras funções nas plantas, é uma enzima ativa durante o processo de respiração celular aeróbia, regenerando uma molécula de oxalacetato (OAA) a partir da oxidação de uma molécula de malato e usando NAD<sup>+</sup> como aceitador de elétrons durante o ciclo do ácido cítrico (CAC) (WEEDEN e WENDEL, 1990; VENUGOPAL e REDDY, 1992; REDDY, 2012).

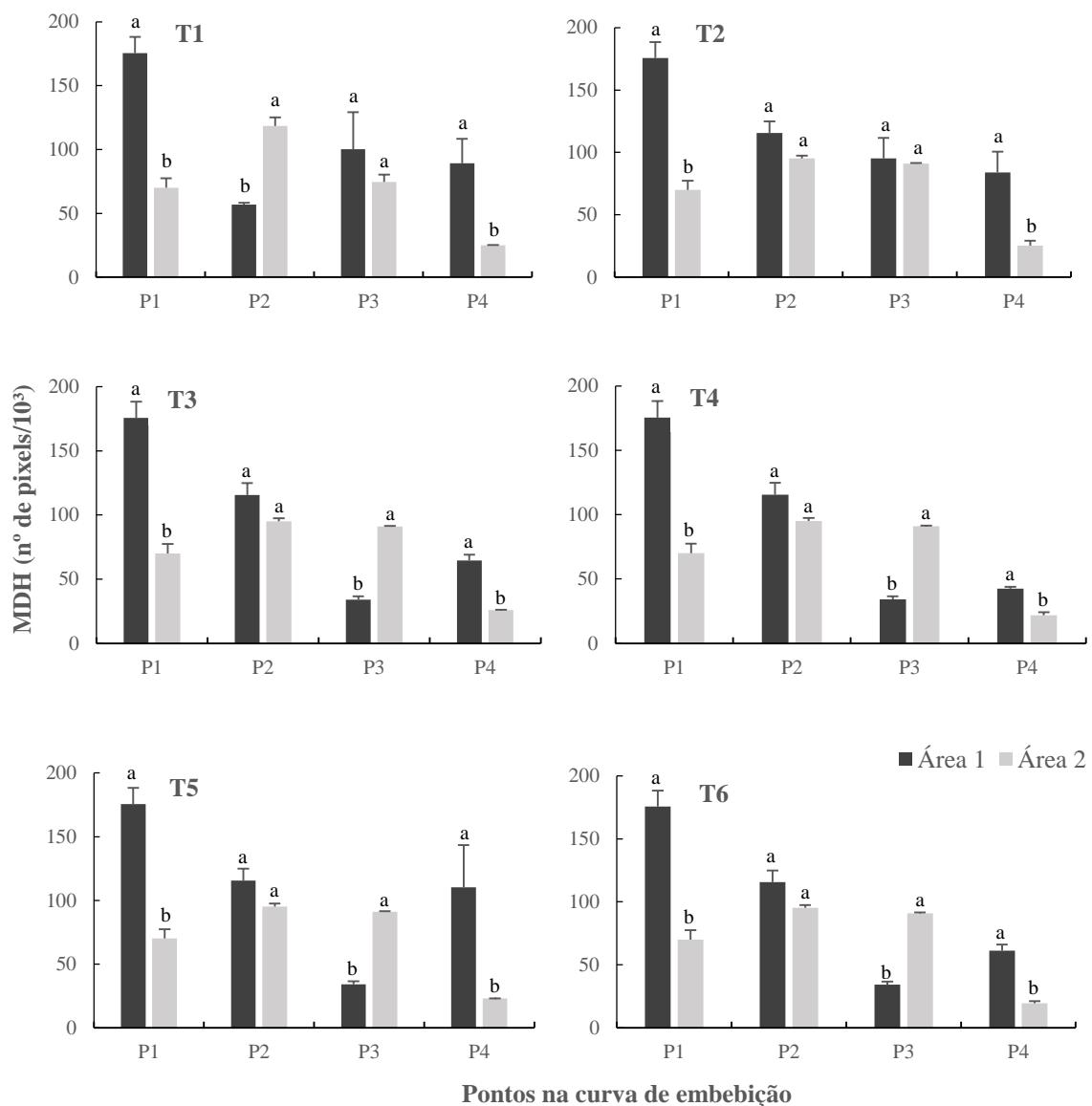
Figura 13 - Expressão da enzima malato desidrogenase (MDH) em sementes de *Gymnanthes klotzschiana* coletadas em Lages, SC (área 1) e Capão Alto (área 2), quando submetidas ao efeito de diferentes períodos de estresse pelo alagamento em quatro pontos da curva de embebição



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

TT: todos os tratamentos; DT: demais tratamentos avaliados; Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias; P: pontos na curva de embebição com relação a umidade das sementes (área 1 - P<sub>1</sub>: 8,9% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 30% - fase II; P<sub>4</sub>: 45% - Fase III; e área 2 - P<sub>1</sub>: 9,2% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 40% - fase II; P<sub>4</sub>: 55% - fase III).

Figura 14 - Índices quantitativos da enzima malato desidrogenase (MDH) durante a germinação de *Gymnanthes klotzschiana* sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Scheffé ( $\alpha=0,1$ ) cada tratamento  
 P: pontos na curva de embebição com relação a umidade das sementes (área 1 - P<sub>1</sub>: 8,9% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 30% - fase II; P<sub>4</sub>: 45% - Fase III; e área 2 - P<sub>1</sub>: 9,2% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 40% - fase II; P<sub>4</sub>: 55% - fase III; Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias).

Importante salientar que a MDH pode ser citosólica ou mitocondrial, sendo a primeira importante na gliconeogênese, lipogênese e na conversão do OAA em malato procedente do fosfoenolpiruvato; a segunda atua no CAC, dentre outras funções metabólicas (BASAGLIA, 1989; TAIZ e ZEIGER, 2013).

Foi constado antes e no início da germinação, nas sementes de ambas as áreas, que a MDH foi expressa de maneira distinta, sobretudo no P1. Contudo, provavelmente essa enzima não se encontrava ativa ou não estava relacionada diretamente com a geração de energia pela rota aeróbia, já que é a respiração anaeróbia que predomina na fase I. Desta forma, a expressão da MDH inicialmente poderia estar apenas relacionada ao acúmulo de malato, o qual pode ser armazenado no vacúolo para posterior utilização no CAC através da ação da enzima málica, a qual descaboxila o malato a piruvato (TAIZ e ZEIGER, 2013).

No ponto 3 as sementes da área 2 não apresentaram expressão da ADH. Desta forma, a única saída para a diminuição do acúmulo de piruvato, além a prévia transformação do fosfoenolpiruvato em malato, poderia ser ativação de uma rota alternativa, onde envolveria a conversão do piruvato em acetil-CoA pela ação das enzimas PDC, mALDH e ACS na privação do oxigênio. Entretanto, a expressão da MDH envolvida diretamente no ciclo do ácido cítrico não pode ser descartada, já que houve a troca de água a cada três dias e uma possível reoxigenação no meio.

A via mais favorável no metabolismo anaeróbio é provavelmente a produção de acetato para remover o acetaldeído tóxico e reciclar carbono para uso em outras vias, tais como o ciclo do glioxilato (MIRO e ISMAIL, 2013). Nessa situação, o acetato poderia então acumular ou ser convertido em intermediários do ciclo ácido cítrico, como o malato ou citrato (YAMASHITA e FUJIWARA, 1966). Sob condições aeróbias, o piruvato é transformado em acetil-CoA pela PDH. Contudo, essa enzima não é funcional em condições anaeróbicas por causa do acúmulo de NADH, impedindo a produção directa de acetil-CoA a partir de piruvato. Assim, sugeriu-se uma via alternativa para envolver a conversão de piruvato em acetil-CoA (VIGEOLAS et al., 2003; HOWELL et al., 2009).

Alguns estudos relacionaram o aumento da atividade da ALDH à tolerância à submersão no arroz. Tais estudos relataram que a família de mALDH mitocondrial teve o aumento mais significativo na atividade em variedades capazes de germinar sob condições anaeróbias (NAKAZONO et al., 2000; TSUJI et al., 2003). Meguro et al. (2006) concluíram que o gene *ALDH2a* é mais responsável à anaerobiose e, portanto, poderia desempenhar um papel importante na desintoxicação do acetaldeído. Lasanthi-Kudahettige et al. (2007) descobriram que o *ALDH2a* foi regulado para cima por 11 vezes e o *ALDH2b* foi regulado para baixo por 22 vezes em sementes de arroz sujeitas a anoxia desde a embebição.

Quando o acetil-CoA entra no ciclo do glioxilato em condição anaeróbia, o isocitrato é convertido em glioxilato pela enzima isocitrato liase e o glioxilato para malato pela enzima malato sintase. Esse ciclo em comparação com o ciclo do ácido cítrico tem menor perda de

carbono, porque tem duas etapas a menos (LU et al., 2005). Foi concluído em mudas de arroz que esse é o caminho para manter o metabolismo em curso sob condições submersas (FAN et al. 2003; LU et al., 2005). FAN et al. (2003) testaram sementes pré-germinadas da variedade de arroz japonica "M201" após imersão no escuro e seguiram acompanhando as reações metabólicas sob hipoxia *in vivo* com ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ . Neste cenário, ambos os ciclos mantiveram o catabolismo de carboidratos e a biossíntese protéica, gerando simultaneamente substratos e energia para as células.

Em genótipos tolerantes ao alagamento, a fermentação etanólica envolvendo PCD e ADH e, mais importante, mALDH, poderia conferir uma vantagem adaptativa para a germinação sob condições submersas, pois o poder de redução do ciclo do glioxilato, poderia sustentar tanto o catabolismo de carboidratos como a biossíntese protéica (MIRO e ISMAIL, 2013). Destaca-se que o ciclo do glioxilato está diretamente envolvido na gliconeogênese, sendo que para ambos os sistemas funcionarem há a necessidade da presença enzima MDH.

Nas fases II e III, o catabolismo do carbono possivelmente seguiu basicamente três vias, a fermentativa (somente para as sementes da área 1), o ciclo do glioxilato e o ciclo do ácido cítrico após a etapa da glicólise. Importante ressaltar que na fase II a presença da ADH possivelmente foi fundamental na maior germinação e vigor das sementes oriundas da área 1, já que nessa condição de hipoxia/anoxia a síntese de energia pela fermentação etanólica é fundamental para manter a integridade das células. Esse fato pode ser considerado uma vantagem adaptativa para essa espécie quando há restrição do  $\text{O}_2$  no meio ambiente. Não obstante, a maior expressão da MDH na fase III também influenciou no maior vigor das sementes desse lote.

De acordo com Albuquerque et al. (2009) a malato desidrogenase é importante na respiração durante a germinação de *Bowdichia virgiliooides*, pois a sua expressão está relacionada à recuperação e atividade de mitocôndrias. Na germinação de *Hordeum vulgare* L., Tunes et al. (2009) também observaram a atividade dessa enzima durante todo esse processo. Malone et al. (2007) avaliaram o sistema isoenzimático da enzima malato desidrogenase em sementes de arroz e sugeriram que a maior expressão da enzima MDH pode estar associada com a síntese de novos tecidos.

A malato desidrogenase não atua apenas na respiração, sendo importante também em várias outras reações biossintéticas e hidrolíticas, tais como síntese de aminoácidos, quebra de óleos e gorduras armazenadas nos corpos lipídicos das sementes, gliconeogênese, manutenção dos potenciais redox e intercâmbio de metabólitos entre o citoplasma e as organelas (LIN et al.,

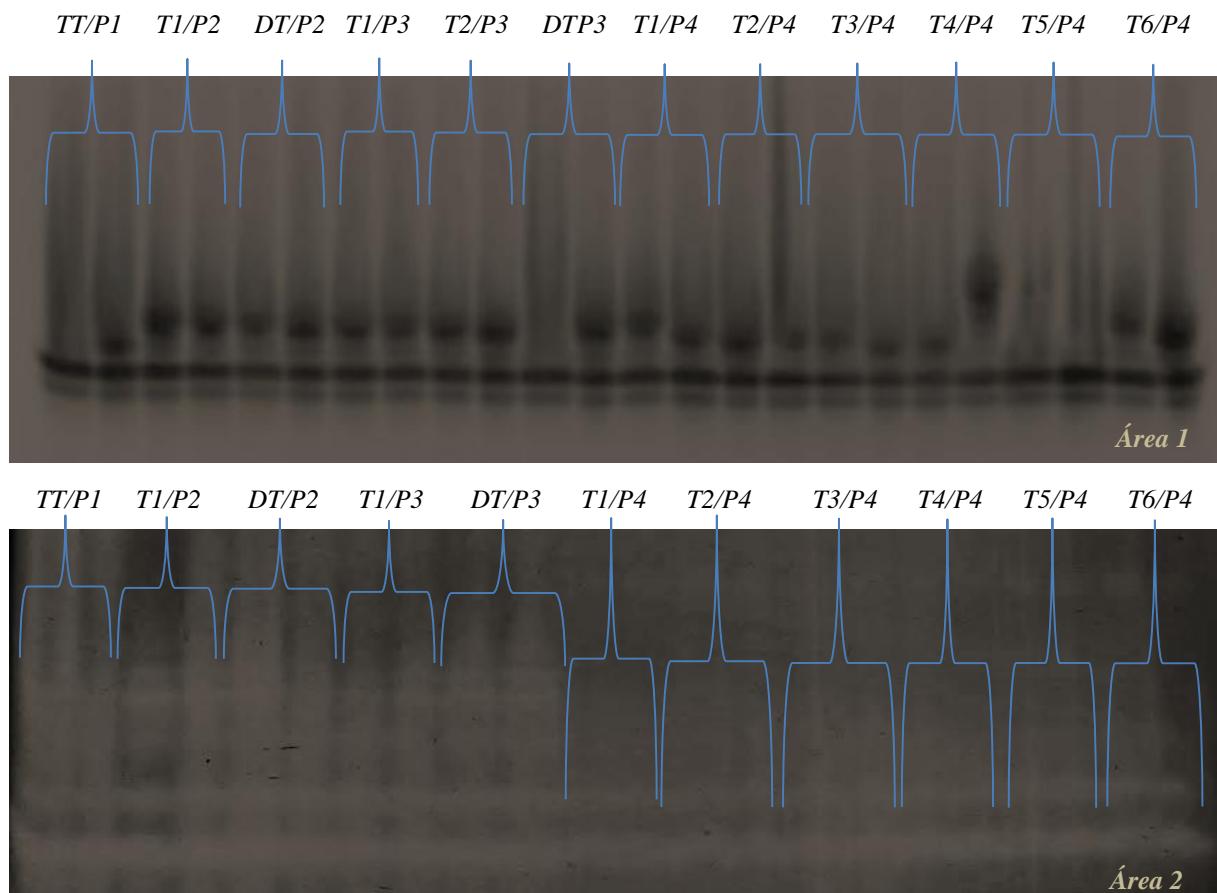
2003). Desta forma, justificando as múltiplas isoformas presentes durante a germinação da *G. klotzschiana* – branquinho, especialmente nas sementes oriundas da área 1.

### 3.2 Atividade antioxidante

A SOD atua no primeiro processo de defesa antioxidante e pode ser encontrada na matriz mitocondrial e peroxissomos (MnSOD), assim como no citoplasma celular e no espaço extracelular (Cu/Zn-SOD) (ALSCHER et al, 2002). Ela catalisa a formação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> a partir da dismutação de íons superóxido, radicais livres e íons de hidrogénio (MØLLER et al., 2007; POOBATHY et al., 2013). A expressão da SOD nas sementes de ambas as áreas foi similar em todos os tratamentos, pelo menos nos dois primeiros pontos da curva de embebição (P1 e P2). Nesses pontos a atividade da SOD atingiu valores acima de 30x10<sup>3</sup> pixels. Durante a fase II (P3) e a fase III (P4) da germinação, essa enzima apresentou índices significativamente superiores nas sementes oriundas da área 1 independente do tratamento, exceto para o tratamento controle (Figuras 15 e 16).

A CAT também apresenta diferentes isoformas, sendo responsável pela neutralização do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) presente em altas concentrações nos peroxissomos e glixossomos, protegendo as células de danos oxidativos (GILL e TUTEJA, 2010; SILVA NETA, 2014). A CAT atua na decomposição de duas moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em uma molécula de oxigênio e duas moléculas de água (SHARMA, 2012; POOBATHY et al., 2013). Para as sementes coletadas na área 1, o padrão de expressão dessa enzima coincidiu com aquele expresso pela SOD. Porém, essa padrão não foi observado nas sementes advindas da área 2, pois a presença da CAT apenas foi verificada na última fase da germinação (P4), exceto no tratamento controle. No P4, a CAT obteve índices superiores no T2, T3 e T4 (área 1) e estatisticamente iguais no T5 e T6 (Figuras 17 e 18).

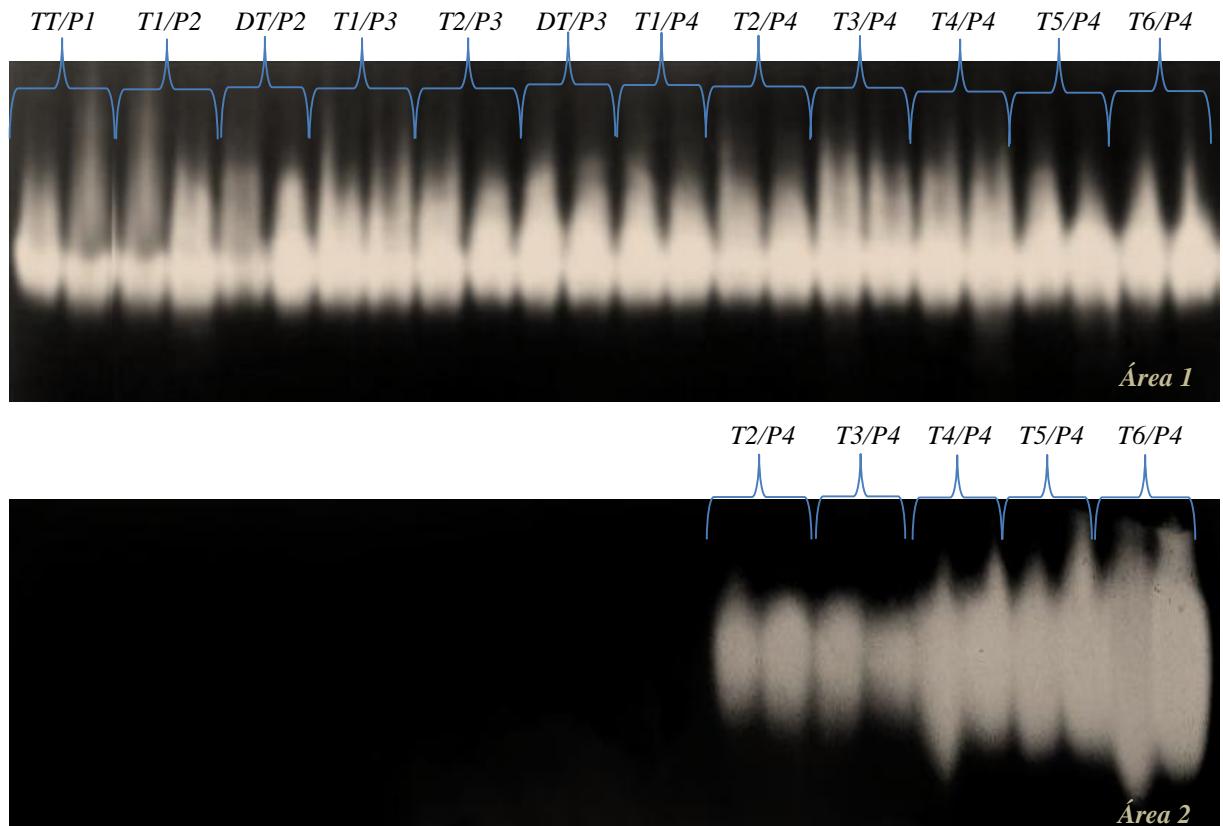
Figura 15 – Expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de *Gymnanthes klotzschiana* coletadas em Lages, SC (área 1) e Capão Alto (área 2), quando submetidas ao efeito de diferentes períodos de estresse pelo alagamento em quatro pontos da curva de embebição



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

TT: todos os tratamentos; DT: demais tratamentos avaliados; Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias; P: pontos na curva de embebição com relação a umidade das sementes (área 1 - P<sub>1</sub>: 8,9% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 30% - fase II; P<sub>4</sub>: 45% - Fase III; e área 2 - P<sub>1</sub>: 9,2% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 40% - fase II; P<sub>4</sub>: 55% - fase III).

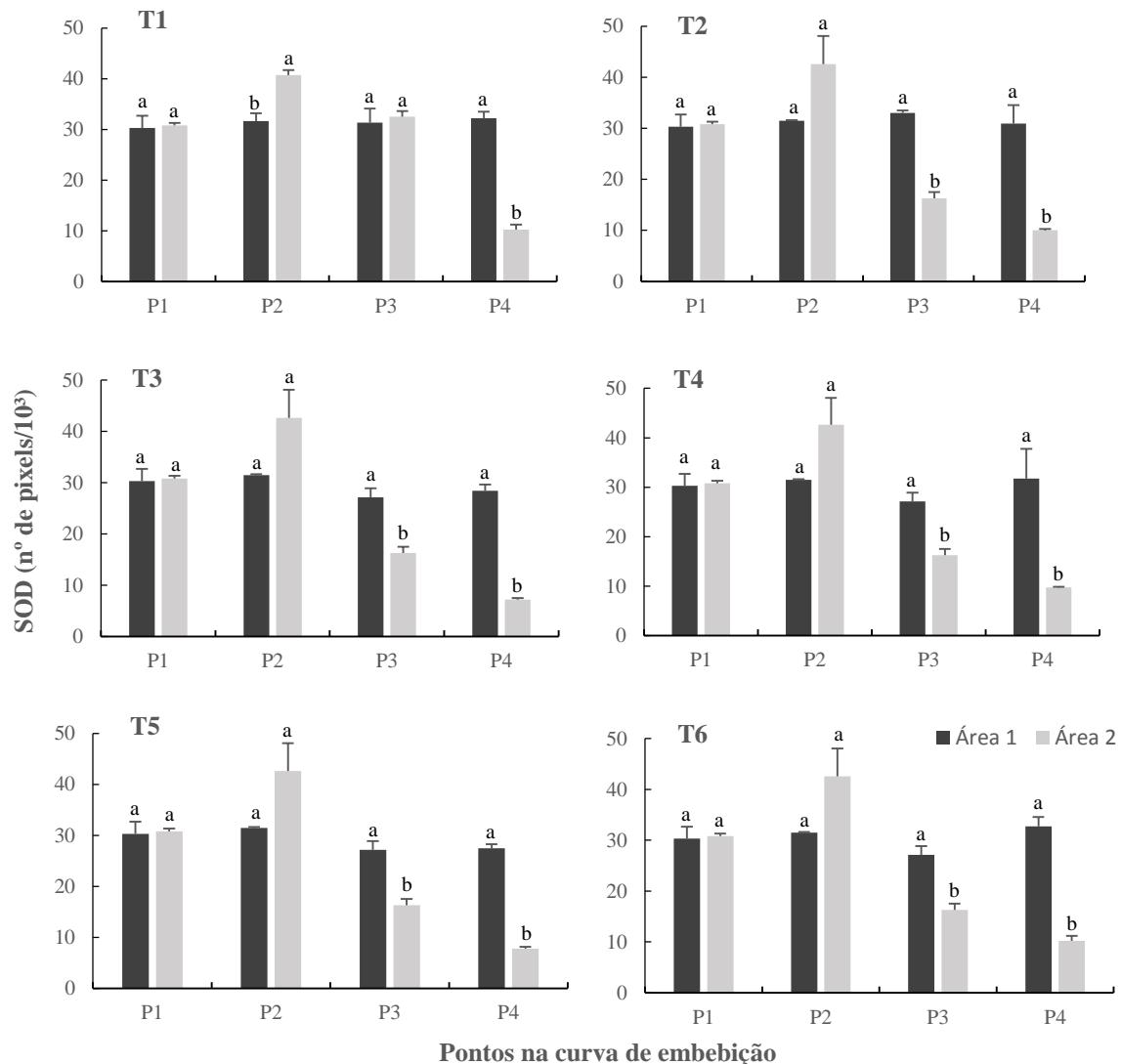
Figura 16 - Expressão da enzima catalase (CAT) em sementes de *Gymnanthes klotzschiana* coletadas em Lages, SC (área 1) e Capão Alto (área 2), quando submetidas ao efeito de diferentes períodos de estresse pelo alagamento em quatro pontos da curva de embebição



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

TT: todos os tratamentos; DT: demais tratamentos avaliados; Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias; P: pontos na curva de embebição com relação a umidade das sementes (área 1 - P<sub>1</sub>: 8,9% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 30% - fase II; P<sub>4</sub>: 45% - Fase III; e área 2 - P<sub>1</sub>: 9,2% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 40% - fase II; P<sub>4</sub>: 55% - fase III).

Figura 17 - Índices quantitativos da enzima superóxido dismutase (SOD) durante a germinação de *Gymnanthes klotzschiana* sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes

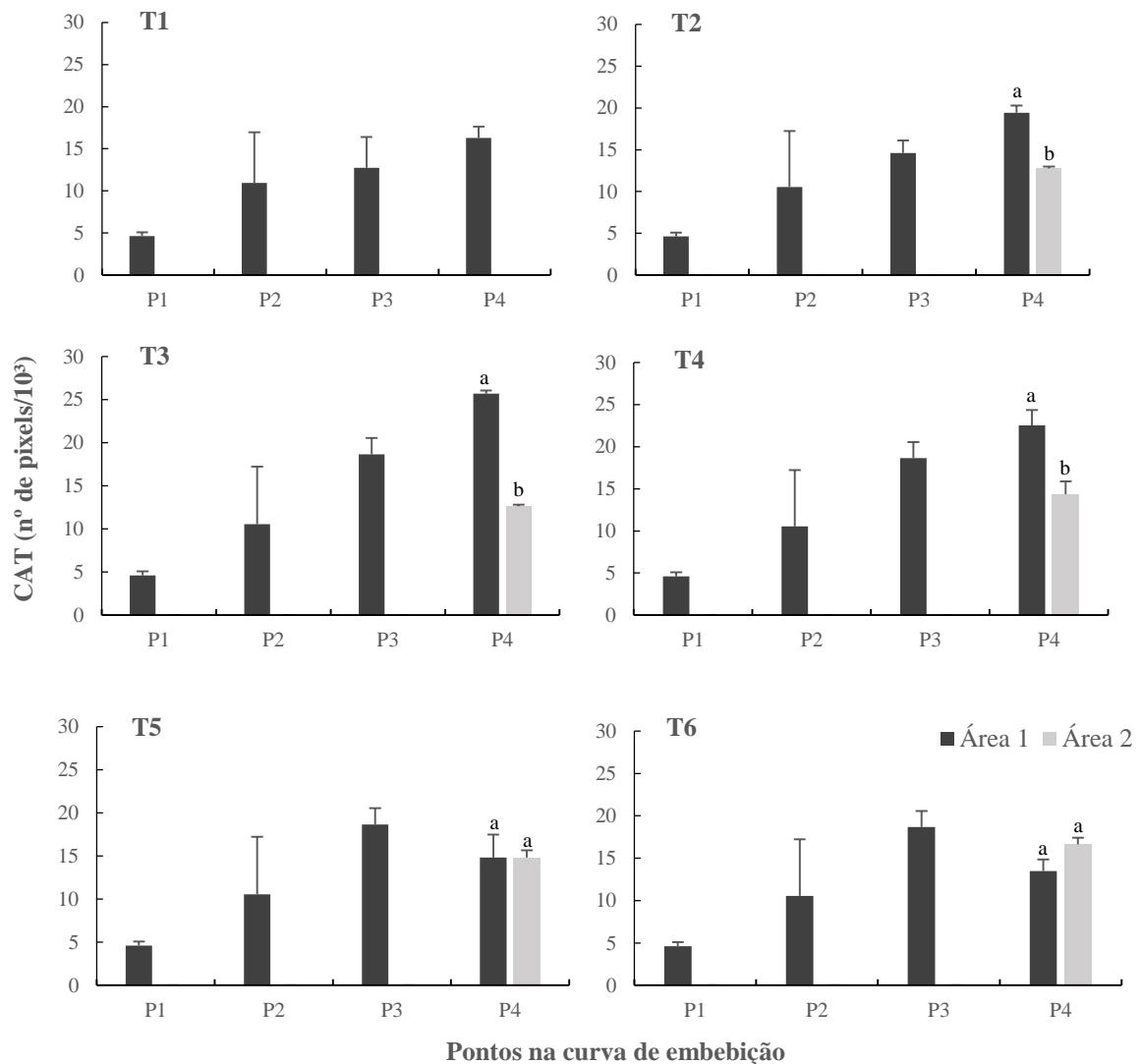


Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Scheffé ( $\alpha=0,1$ )

P: pontos na curva de imbebição com relação a umidade das sementes (Área 1 - P<sub>1</sub>: 8,9% - sementes não imbebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 30% - fase II; P<sub>4</sub>: 45% - Fase III; e Área 2 - P<sub>1</sub>: 9,2% - sementes não imbebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 40% - fase II; P<sub>4</sub>: 55% - fase III; Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T3 - dois dias; T4 - três dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias).

Figura 18 - Índices quantitativos da enzima catalase (CAT) durante a germinação de *Gymnanthes klotzschiana* sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

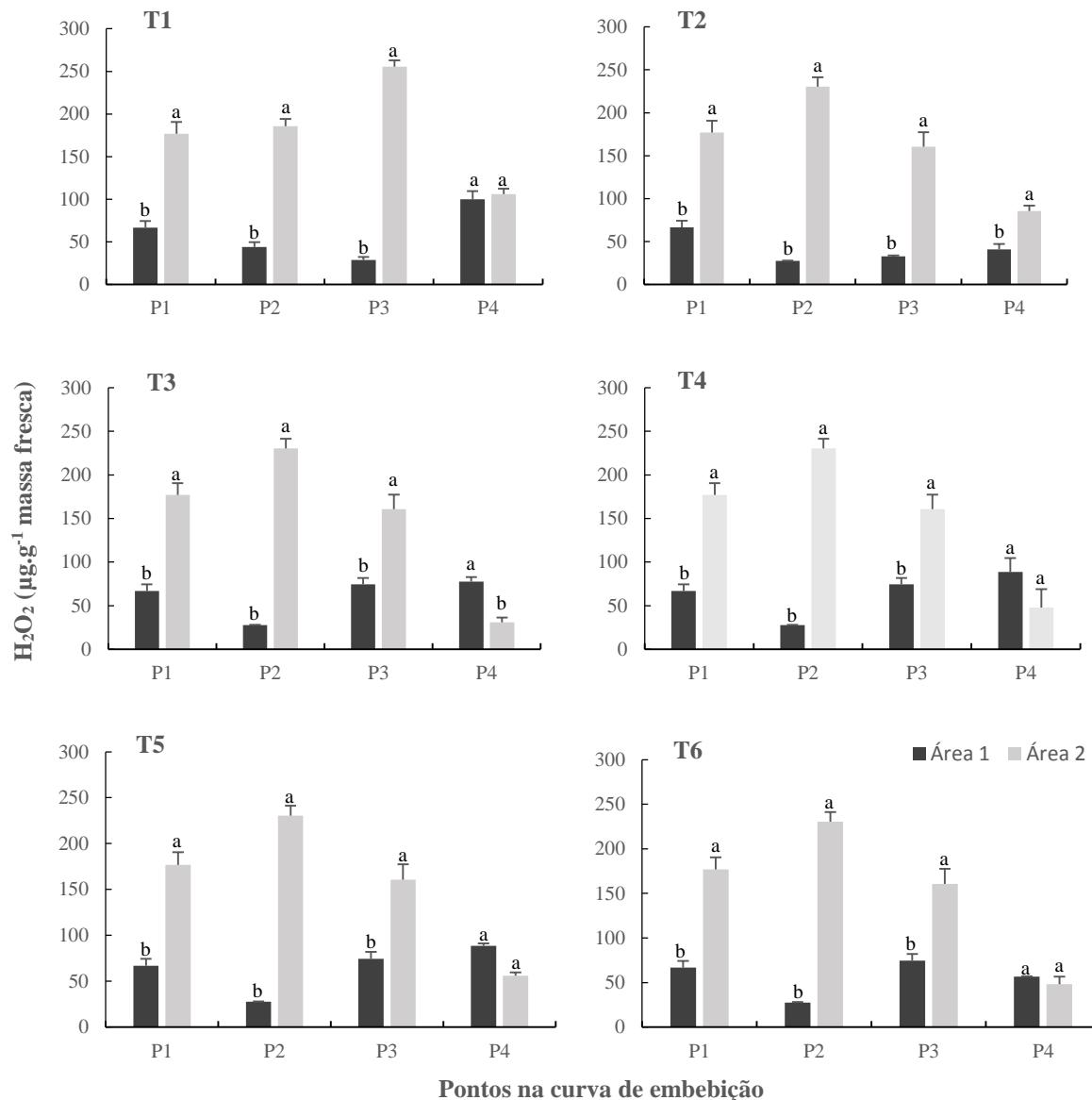
Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Scheffé ( $\alpha=0,1$ )

P: pontos na curva de embebição com relação a umidade das sementes (área 1 - P1: 8,9% - sementes não embebidas; P2: 21% - fase I; P3: 30% - fase II; P4: 45% - Fase III; e área 2 - P1: 9,2% - sementes não embebidas; P2: 21% - fase I; P3: 40% - fase II; P4: 55% - fase III; Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T3 - dois dias; T4: três dias; T5: cinco dias; T6 - dez dias; e T6 - vinte dias.

### 3.3 Conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peroxidação lipídica (MDA)

Nas sementes provenientes da área 2, foi constatado nos três primeiros pontos da curva de embebição, valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significativamente maiores, especialmente no P2, quando ultrapassaram 250 µg.g<sup>-1</sup> de massa fresca. Já no ponto quatro (P4), esses índices diminuíram e ficaram abaixo de 100 µg.g<sup>-1</sup> de massa fresca (exceto nas testemunhas), os quais foram semelhantes nos tratamentos nas duas áreas (Figura 19). O peróxido de hidrogênio é uma molécula moderadamente reativa com longa meia-vida celular, tendo a capacidade de se difundir livremente entre as membranas celulares através das aquaporinas (KOVALCHUK, 2010). Essas características fazem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser um importante sinalizador intracelular e ao mesmo tempo responsável pela tolerância a distintos estresses ambientais (WAHID et al. 2007; MITTLER et al., 2011). Antes do efeito do estresse pelo alagamento, bem como durante esse efeito hipóxico, foram as sementes de área de Capão Alto (área 2) que apresentam os maiores valores de MDA, ou seja, uma maior peroxidação lipídica. Esses maiores índices de MDA para a área 2 coincidiram com aqueles observados com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, antes do início da germinação, assim como na fase I e II do processo germinativo (Figura 20).

Figura 19 - Índices quantitativos do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) durante a germinação de *Gymnanthes klotzschiana* sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes

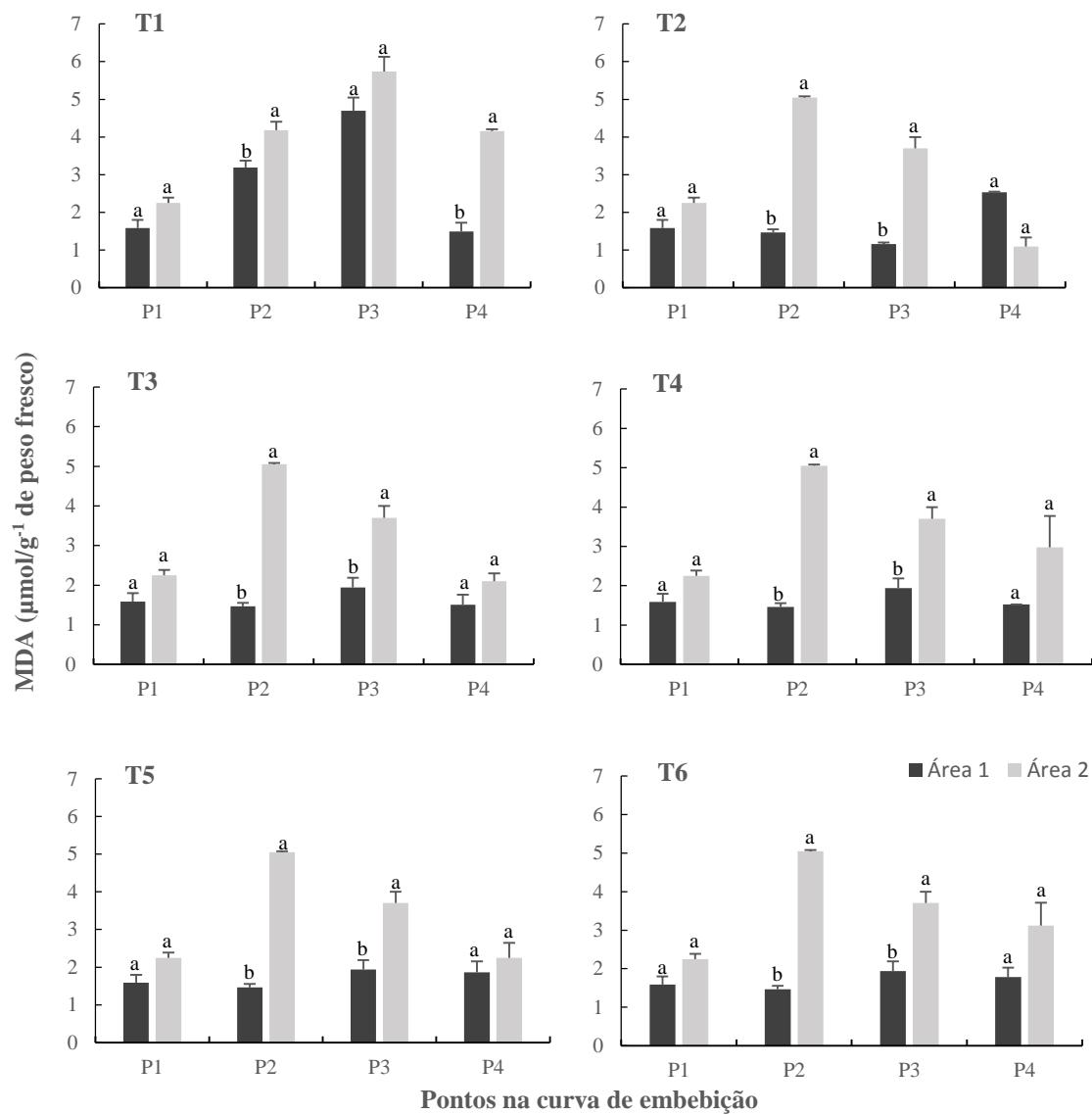


Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Scheffé ( $\alpha=0,1$ )

P: pontos na curva de embebição com relação a umidade das sementes (área 1 - P<sub>1</sub>: 8,9% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 30% - fase II; P<sub>4</sub>: 45% - Fase III; e área 2 - P<sub>1</sub>: 9,2% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 40% - fase II; P<sub>4</sub>: 55% - fase III; Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T2 - dois dias; T3: três dias; T4 - cinco dias; T5 - dez dias; e T6 - vinte dias.

Figura 20 - Índices quantitativos da peroxidação lipídica (MDA) durante a germinação de *Gymnanthes klotzschiana* sob diferentes períodos de estresse por alagamento em duas áreas de coleta de sementes



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Scheffé ( $\alpha=0,1$ )

P: pontos na curva de embebição com relação à umidade das sementes (área 1 - P<sub>1</sub>: 8,9% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 30% - fase II; P<sub>4</sub>: 45% - Fase III; e área 2 - P<sub>1</sub>: 9,2% - sementes não embebidas; P<sub>2</sub>: 21% - fase I; P<sub>3</sub>: 40% - fase II; P<sub>4</sub>: 55% - fase III); Tratamentos com o número de dias sob alagamento controlado: T1 - testemunha; T2 - um dia; T3 - dois dias; T4 - três dias; T5 - cinco dias; T6 - vinte dias.

Durante a germinação, o nível de estresse oxidativo pode ser mensurado pela presença de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e catalase (DEUNER et al., 2008). A expressão/atividade da SOD independeu do efeito do alagamento, sugerindo que sua expressão é pré-programada. Entretanto, foi maior nas sementes provenientes do local com efeito natural de inundações periódicas (área 1), especialmente durante a fase II e III da germinação. A ação

da SOD produz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, deste modo necessitando a atuação da CAT para neutralizar essa molécula. O peróxido de hidrogênio é precursor do OH°, que por sua vez é a espécie reativa de oxigênio mais tóxica para as células vegetais (VRANOVÁ et al., 2002).

A CAT atua em altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo indispensáveis para a homeostase celular (GILL e TUTEJA, 2010). Para os tratamentos da área 2, onde houve estresse por hipoxia, essa enzima esteve presente apenas no final da germinação. Isso poderia ser uma das explicações para a menor germinação e vigor das sementes proveniente dessa local (Tabela 5), pois nas sementes desse lote o combate contra os radicais livres não foi efetivo como evidenciando nas sementes da área 1, que apresentou a atividade da catalase em todos os tratamentos e pontos avaliados. Duas variedades de trigo, uma tolerante ao alagamento e outra intolerante foram avaliadas por Cheng et al. (2016) e concluíram que no genótipo sensível houve redução da atividade da CAT e aumento das EROs, incluído o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fato inversamente observado no genótipo tolerante. Enzimas como SOD e CAT são importantes na germinação sob estresse, o que já foi comprovado em diversas espécies incluindo as florestais, tais como: *Hordeum vulgare* L. (MEI e SONG, 2010), *Medicago sativa* L. (CAKMAK et al., 2010), *Jatropha curcas* L. (CAI et al., 2011) e *Sesbania virgata* (CAV.) PERS (ALVES et al., 2012).

Como as sementes, especialmente durante a fase II, ficaram por um longo período sob estresse, principalmente os tratamentos T5 e T6, esta etapa pode ter gerado grandes quantidades de EROs e o complexo de enzimas antioxidantes, possivelmente não foram eficaz em seu controle, diminuindo a germinação no T6 da área 1 e no T5 e T6 da área 2 (Cap. II, Tabela 5). Entretanto, o vigor das sementes demonstrado principalmente pela primeira contagem de germinação é que apresentou o maior efeito do estresse nas sementes da área 2 (Cap. II, Tabela 5). Hernandez et al. (2010) salientam que os vegetais que apresentam maior atividade do sistema antioxidante são mais resistentes a ambientes estressantes. Segundo Prodanović et al. (2007), as enzimas SOD e CAT podem manter a viabilidade e proteger as membranas das sementes contra as EROs produzidas durante a germinação, desde que essas enzimas estejam presentes em quantidades suficientes. Assim como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o íon superóxido também pode difundir-se através da bicamada de lipídios (HAYAKAWA et al., 1984) e causar sua peroxidação (BAILLY et al., 2006) e por fim a inviabilidade das sementes (MARCOS FILHO, 2015).

Elevadas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causam maior estresse oxidativo, como observado nas sementes da área 2 nas duas primeiras fases da germinação, justificando a maior peroxidação lipídica nesses momentos. Cabe salientar que nos tratamentos controles, antes do início da germinação, ocorreram valores significativamente maiores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para a área 2, mas o MDA

não diferiu entre as áreas no P1, entretanto foram numericamente maiores para a área 2. O maior conteúdo inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na área 2 pode estar relacionado a atividade da SOD e a não atividade da CAT. Contudo, o efeito da peroxidação lipídica foi similar ao da área 1, possivelmente porque o estresse oxidativo estava iniciando e ao final da fase I da germinação (P2) isso foi verificado. A maior peroxidação lipídica no P4 da área 2 (numericamente), também pode ser explicada pela não identificação da catalase nas duas primeiras fases das germinação, sendo que sua expressão apenas no P4 não foi efetiva ou suficiente para manter a integridade das células, principalmente nos tratamentos que ficaram por um tempo maior sob estresse. ELLA et al. (2009) relatou uma diminuição da germinação sob imersão e verificou aumento da peroxidação lipídica com a diminuição das atividades da superóxido dismutase e da catalase.

O peróxido de hidrogênio é uma das EROs mais estáveis, não apresenta carga e não é um radical livre. Além disso e por ser bastante móvel, é um componente vital para desenvolvimento, metabolismo e homeostase (BIENERT et al., 2006), agindo na aclimatação e defesa dos organismos (SLESAK et al., 2007). Em *Oryza sativa* durante a germinação sob temperatura extremas (máximas e mínimas), o tratamento com peróxido de hidrogênio durante a fase inicial de embebição causou uma reversão significativa nos danos oxidativos ao sistema de membrana. Isso acarretou uma regulação positiva da defesa antioxidante, com o aumento da atividade da superóxido dismutase e da catalase (BHATTACHARJEE, 2013). Obviamente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em elevadas concentrações é danoso e um equilíbrio com os mecanismos de eliminação das EROs se torna necessário e indispensável. Bienert et al. (2006) comentam que as EROs e os antioxidantes poderiam ter surgido nos primórdios da evolução das plantas, dada a importância do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o reino vegetal.

Outros estudos mais recentes apontam que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é considerado um molécula sinalizadora do ambiente (LIU et al., 2010; BAILEY-SERRES et al., 2012; HILL, 2012). Ele está envolvido na percepção de múltiplos estresses bióticos e abióticos, incluindo a tolerância ao alagamento (RUTSCHOW et al., 2011), sendo benéfico em baixas concentrações e prejudicial em excesso (GECHEV e HILLE, 2005; QUAN et al., 2008). Cheng et al. (2015) estudaram o efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em duas cultivares de *Triticum aestivum*, uma tolerante (Hua 8) outra intolerante (Hua 9) ao alagamento, e concluíram que o encharcamento resultou em grande aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> nas membranas plasmáticas, paredes celulares, mitocôndrias e espaços intracelulares de ambos os genótipos, no entanto expressão de genes da CAT, MnSOD e SOD foram maiores nos genótipo tolerante.

Nas sementes da área 1, mesmo com expressão contínua da SOD e da CAT, elas não eliminaram por completo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provavelmente pela sua importância fisiológica nessa

condição estressante. Entretanto, nas sementes da área 2, as altas concentrações do peróxido de hidrogênio provavelmente prejudicaram o processo germinativo. Um aumento transitório do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode causar ativação dos mecanismos de proteção e redução na peroxidação lipídica (CHANG et al., 2016). Petrov e Breusegem (2012) relatam que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está relacionado com a produção de fatores de transcrição, podendo induzir a produção maciça de proteínas e enzimas, que por sua vez podem desencadear respostas contra o alagamento ou com a morte celular. Mas ainda não está claro se ele atua diretamente como sinalizador ou oxida outras moléculas para esse papel (DESIKAN et al., 2003). Muitos processos metabólicos estão envolvidos em genótipos tolerantes e são coordenados de uma maneira que facilita a germinação e o rápido crescimento do embrião a emergir de solos inundados (MIRO e ISMAIL, 2013).

#### 4 CONCLUSÃO

Pelos resultados apresentados, a expressão das enzimas ADH e CAT são fundamentais para as sementes de *G. klotzschiana* suportarem o alagamento.

O maior controle nos teores de peróxido de hidrogênio refletiu em uma menor peroxidação lipídica. Isso ocorreu quando houve ação conjunta das enzimas SOD e CAT.

Sugere-se que estudos mais aprofundados sejam realizados para melhor elucidar quais são os produtos finais dos açúcares que entram na respiração nessa condição de privação de oxigênio e os fluxos/vias preferencias, especialmente aquelas que envolvam da ALDH e a acetil CoA sintase.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fenologia é uma ferramenta importante para acompanhar as matrizes previamente selecionadas visando a coleta de sementes de maior qualidade fisiológica, já que os fatores abióticos são variáveis ao longo do ano, neste caso, especialmente, a umidade do solo. Neste estudo, ficou caracterizado que na área 1 (Lages SC) houve maior atividade e intensidade na floração e na frutificação dos indivíduos, sugerindo que a *G. klotzschiana* (branquinho) prefere solos mais enxecados para se desenvolver e se reproduzir.

No início da germinação era esperado o consumo dos açúcares solúveis totais, do amido e dos lipídios totais, no entanto o que ocorreu foi o inverso, ou seja, o acúmulo desses componentes. Outra questão inusitada foi o acúmulo dos lipídios na última fase da germinação nos tratamentos acima de três dias sob hipoxia.

Pelos resultados obtidos de germinação e vigor, da presença de enzimas do ciclo respiratório (ADH e MDH) e enzimas antioxidantes (SOD e CAT), assim como o maior controle interno no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e menor peroxidação lipídica, as sementes da área 1 (área sujeita ao alagamento periódico - Lages SC) podem ser consideradas mais adaptadas a condição de baixa disponibilidade de oxigênio durante o processo germinativo.

Diante desses resultados, ressalta-se a necessidade de estudos posteriores para tentar explicar melhor quais são as rotas preferenciais do piruvato sintetizado na etapa de glicólise, bem como elucidar quais as enzimas relacionadas ao ciclo do glioxilato, do ciclo do ácido cítrico e a gliconeogênese, bem como a utilização dos polissacarídeos de parede celular e a síntese de ácidos graxos na germinação.

Em projetos de recomposição/restauração de áreas degradadas que utilizem o branquinho (*G. klotzschiana*) em seus arranjos, sugere-se semeadura direta ou produção de mudas de sementes coletadas em áreas com influência do alagamento. Além disso, nessas áreas é que fanerófitos demonstraram maior produtividade de sementes e frutos, o que é importante na escolha de matrizes.



## REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, K. S. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* kunth.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.12-19, 2009.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell Environ.** Oxford, v.24, p.1337-1344, 2001.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. ampl. atual. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006. 627 p.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, E.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p.1331-1341, 2002.
- ALVES, J. D. et al. Antioxidative responses and morpho-anatomical adaptations to waterlogging in *Sesbania virgata*. **Trees**, v.27, p.717-728, 2012.
- ANDRADE JÚNIOR, D. R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.31, n.1, p.60-68, 2005.
- ANDRADE, D. D.; ROMEIRO, A. R. **Serviços ecossistêmicos e sua importância para o sistema econômico e o bem-estar humano**. IE/UNICAMP, Texto para Discussão.155, 2009.
- ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.79-85, 2010.
- ARAÚJO, W. S. A importância de fatores temporais para a distribuição de insetos herbívoros em sistemas Neotropicais. **Revista da Biologia**, v.10, n.1, p.1-7, 2013.
- Association Of Official Seed Analystis. **Seed vigour testing handbook**. East Lansing: AOSA, 1983. 93p. (Contribuition, 32).
- ATHAYDE, E. A. et al. Fenologia de espécies arbóreas em uma floresta ribeirinha em Santa Maria, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.7, n.1, p.43-51, 2009.

BAILEY-SERRES, J. et al. Making sense of low oxygen sensing. **Trends in Plant Science**, v.17, n.3, p.129-138, 2012.

BAILLY, C. et al. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia plantarum**, v.97, n.1, p.104-110, 2006.

BARDDAL, M. L. **A influência da saturação hídrica na distribuição de oito espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Mista Aluvial do rio Iguaçu, Paraná, Brasil**. 115 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BASAGLIA, F. Some aspects of isozymes of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucosephosphate isomerase in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.92B, n.2, p.213-226, 1989.

BAXTER-BURRELL, A. et al. RopGAP4-dependent rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. **Science**, v.296, n.5575, p.2026-2028, 2002.

BENCKE, C. S. C.; MORELLATO, L. P. C. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.3, p.269- 275, 2002.

BEWLEY, J. D. et al. **Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3 rd. New York, NY: Springer, 2013. 392 p.

BEWLEY, J. D; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 nd. Ed. New York, NY: Plenum Press, 1994. 445 p.

BHATTACHARJEE, S. Heat and chilling induced disruption of redox homeostasis and its regulation by hydrogen peroxide in germinating rice seeds (*Oryza sativa* L., Cultivar Ratna). **Physiology and Molecular Biology of Plants**. v.19, n.2, p.199-207, 2013.

BIANCHINI, E. et al. Phenology of two *Ficus* species in seasonal semi-deciduous forest in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.75, n.4, p.206-214, 2015.

BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; SANTOS, F. A. M. Fenologia de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. (Sapotaceae) em floresta semidecídua do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, n.4, p. 595-602, 2006.

BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1758, p.994-1003, 2006.

BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. **Physiologia Plantarum**, v.138, n.4, p.447-462, 2010.

BONACIN, G. A. et al. Germinação de sementes de alfafa submetidas a períodos de imersão em água. **Científica**, v.34, n.2, p.150-154, 2006.

BOREK, S.; RATAJCZAK, W.; RATAJCZAK, L. Ultrastructural and enzymatic research on the role of sucrose in mobilization of storage lipids in germinating yellow lupine seeds. **Plant Science**, v.170, n.3, p.441-452, 2006.

BOYER, J. S. Plant Productivity and Environment. **Science**, v.218 n.4571 p.443-448, 1982.

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

BRADFORD, K. J. Water Stress and the Water Relations of Seed Development: A Critical Review. **Crop Science**, v.34, n.1, p.1-11, 1994.

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

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). **Plant Science**, v.117, n.1-2, p.33-43, 1996.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.141-156, 2000.

BULLOCK, S. H.; SOLIS-MAGALLANES, J. A. Phenology of Canopy Trees of a Tropical Deciduous Forest in Mexico. **Biotropica**, v. 22, n.1, p.22-35, 1990.

CAI, F. et al. Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. **Journal of Agriculture and Biology**, v.13, n.1, p.25-30, 2011.

CAKMAK, T. et al. Natural agingrelated biochemical changes in alfalfa (*Medicago sativa L.*) seeds stored for 42 years. **International Research Journal of Plant Science**, v.1, n.1, p. 1-6, 2010.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003, 1040 p.

CASCAES, M. F.; CITADINI-ZANETTE, V.; HARTER-MARQUES, B. Reproductive phenology in a riparian rainforest in the south of Santa Catarina state, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, n.4, p.1449-1460, 2013.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. 1. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 640 p.

CHENG, W. et al. Hydrogen sulfide alleviates hypoxia-induced root tip death in *Pisum sativum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.70, p.278-286, 2013.

CHENG, X. X. et al. Reactive oxygen species regulate programmed cell death progress of endosperm in winter wheat (*Triticum aestivum L.*) under waterlogging. **Protoplasma**, v.253, n.2, p.311-327, 2016.

CLEGG, K.M. The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. **Journal of Science Food Agricultural**, v.3, n.1, p.40- 44, 1956.

COLMER, T. D. et al. Physiological Mechanisms of Flooding Tolerance in Rice: Transient Complete Submergence and Prolonged Standing Water. **Progress in Botany**, v.75, p.255-307, 2013.

COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.283, n.2, p.246-255, 2002.

CONLEY, T. T.; PENG, H. P.; SHIH, M. C. Mutations affecting induction os glycolytic and fermentative genes during germination and environmental stresses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.119, n.2, p.599-608, 1999.

COPELAND, G. L. O.; MCDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology.** Norwell, Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 2001, 488 p.

CORBINEAU, F.; CÔME, D. **Control of seed germination and dormancy by the gaseous environment.** In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed). Seed development and germination. New York: Marcel Dekker, 1995, p.397-424.

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

COSMO, N. L. et al. Morfologia de fruto, semente e plântula de *Sebastiania commersoniana*, Euphorbiaceae. **Floresta**, v.40, n.2, p.419-428, 2010.

CRAWFORD, R. M. M.; BRANDLE, R. Oxygen deprivation stress in a changing environment. **Journal of Experimental Botany**, v.47, n.2, p.145-159, 1996.

CROCE, D. M. **Caracterização espacial estrutural e fitossociológica da Reserva Genética Florestal de Caçador, SC, através da análise de componentes principais e sistemas de informações geográficas.** 120 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria, 1991.

CURCIO, G. R. **Relações entre Geologia, Geomorfologia, Pedologia e Fitossociologia nas planícies fluviais do rio Iguaçu, Paraná, Brasil.** Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

DAMASCENO, D. C. et al. Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. **Diabetes Clínica**, v.5, n.5, p.355-361, 2002.

DaMATTA, F. M. et al. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, n.4, p.485-510, 2007.

DANTAS, B. F. et al. Atividade Amilolítica de sementes das cultivares de milho Saracura BRS 4154 e CATI AL 34 submetidas ao alagamento. **XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, Florianópolis, SC, 2002.

DANTAS, B. F. et al. Efeito da duração e da temperatura de alagamento na germinação e no vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.1, p.88-96, 2000.

DAT, J. F. et al. Sensing and signalling during plant flooding. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, n.4, p.273-282, 2004.

DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T.; NEILL, S. J. Oxidative stress signaling. **Topics Current Genetics**, v.4, p.121-149, 2003.

DEUNER, S. et al. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeiro. **Ceres**, v.55, n.2, p.135-140, 2008.

DOLATABADIAN, A.; MODARRESSANAVY, S. A. M. Effect of the ascorbic acid, pyridoxine and hydrogen peroxide treatments on germination, catalase activity, protein and malondialdehyde content of three oil seeds. **Notulae botanicae Horti Agrobotanici**, v.36, n.2, p.61-66, 2008.

DOLFERUS, R. et al. Enhancing the anaerobic response. **Annals of Botany**, v.91, n.2, p.111-117, 2003.

DONALDSON, R. P.; ASSADI, M.; KARYOTOU, K.; OLCUM, T.; QIU, T. Plant peroxisomes and glyoxysomes. **eLS**, 2001.

DOWLING, D. K.; SIMMONS L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society B**, v.276, p.1737-1745, 2009.

EDWARDS, J. M.; ROBERTS, T. H.; ATWELL, B. J. Quantifying ATP turnover in anoxic coleoptiles of rice (*Oryza sativa*) demonstrates preferential allocation of energy to protein synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v.63, n.12, p.4389-4402, 2012.

ELLA, E. S.; DIONISIO-SESE, M. L.; ISMAIL, A. M. Proper Management Improves Seedling Survival and Growth during Early Flooding in Contrasting Rice Genotypes. **Crop Science**, v.50, n.5, p.1997-2008, 2009.

ELLA, E. S.; DIONISIO-SESE, M. L.; ISMAIL, A. M. Seed pre-treatment in rice reduces damage, enhances carbohydrate mobilization and improves emergence and seedling establishment under flooded conditions. **Aob Plants**, p.1-11, 2011.

ESTIOKO, L. P. et al. Differences in responses to flooding by germinating seeds of two contrasting rice cultivars and two species of economically important grass weeds. **AoB Plants**, v.6, p.1-15, 2014.

FAN, T. W. M.; LANE, A. N.; HIGASHI, R. M. *In vivo* and *in vitro* metabolomic analysis of anaerobic rice coleoptiles revealed unexpected pathways. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.50, n.6, p.787-793, 2003.

FARIAS, R. P.; XAVIER, S. R. S. Fenologia e sobrevivência de três populações de samambaias em remanescente de Floresta Atlântica Nordestina, Paraíba, Brasil. **Revista Biota**, v.24, n.2, p.13-20, 2011.

FELLE, H. H. pH regulation in anoxic plants. **Annals of Botany**, v.96, n.4, 519-532, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.1-16, 1997.

FERREIRA, C. S.; PIEDADE, M. T. F.; BONATES, L. C. Germinação de sementes e sobrevivência de plântulas de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Wood. em resposta ao alagamento, nas várzeas da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v.36, n.4, p.413-418, 2006.

FERREIRA, C. S. et al. Adaptive strategies to tolerate prolonged flooding in seedlings of floodplain and upland populations of *Himatanthus sucuuba*, a Central Amazon tree. **Aquatic Botany**, v.90, n.3, p.246-252, 2009.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v.171, p.501-523, 2006.

FLORES, A. V. et al. Atividade enzimática durante a germinação de sementes de *Melanoxylo brauna* Schott sob diferentes temperaturas. **Cerne**, v.20, n.3, p.401-408, 2014.

FOURNIER, L. A. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. **Turrialba**, v.24, p.422-423, 1974.

FOURNIER, L. A. O.; CHARPANTIER, C. El tamaño de la muestra y la frecuencia de las observaciones en el estudio da las características de los árboles tropicales. **Turrialba**, v.25, p.45-48, 1975.

FUKAO, T. et al. A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. **The Plant Cell**, v.18, n.8, p.2021–2034, 2006.

Fundação SOS Mata Atlântica/INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2015-2016: Relatório Técnico.** São Paulo, 2017. 69 p.

GALLARDO, K.; THOMPSON, R.; BURSTIN, J. Reserve accumulation in legume seeds. **C. R. Biologies**, v.331, n.10, p.755-762, 2008.

GECHIEV, T. S.; HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **Journal of Cell Biology**, v.168, n.1, p.17-28, 2005.

GIBBS, D. J. et al. Nitric Oxide Sensing in Plants Is Mediated by Proteolytic Control of Group VII ERF Transcription Factors. **Molecular Cell**, v.53, n.3, p.369-379, 2014.

GIBBS, J.; GREENWAY, H. Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. **Functional Plant Biology**, v.30, n.3, 1-47, 2003.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.12, p.909-930, 2010.

GLEASON, F. K. **Plant biochemistry**. Sudbury: Jones & Bartlett Learning, 2012. 239 p.

GONÇALVES, J. F. C. et al. Estratégias no uso da energia luminosa por plantas jovens de *Genipa spruceana* Steyermark submetidas ao alagamento. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.2, p.391-398, 2012.

GRAVOT, A. et al. Hypoxia response in *Arabidopsis* roots infected by *Plasmodiophora brassicae* supports the development of clubroot. **BMC Plant Biology**, v.16, n.1, 2-10, 2016.

GUEDES, R. S. et al. Germinação de sementes de *Cereus jamaicensis* DC. em diferentes substratos e temperaturas. **Acta Scientiarum**, v.31, n.2, p.159-164, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3ed. New York: Oxford University Press, 1999. 936 p.

HAMANN, A. Flowering and fruiting of a Philippine submontane rain Forest: climatic factors as proximate and ultimate causes. **Journal of Ecology**, v.92, p.24-31, 2004.

HARRISON, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? **Free Radical Biology & Medicine**, v.33; n.6, p.774-797, 2002.

HAYAKAWA, T.; KANEMATSU, S.; ASADA, K. Occurrence of Cu-Zn-superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol**, v.25, n.6, p.883-889, 1984.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**. New York, v. 125, p. 189-198, 1968.

HELDT, H. W. **Plant Biochemistry**, Elsevier, San Diego, 2005, 630 p.

HERNANDEZ, M. et al. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n.2, p.521-535, 2010.

HIGA, A. R. **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba, PR – FUPEF. 2006, 264 p.

HILL, R. D. Non-symbiotic haemoglobins—What's happening beyond nitric oxide scavenging? **AoB Plants**, p.1-13, 2012.

HOWELL, K. A. et al. Mapping metabolic and transcript temporal switches during germination in *Oryza sativa* highlights specific transcription factors and the role of RNA instability in the germination process. **Plant Physiology**, v.149, n.2, 961-980, 2009.

HOWELL, K. A.; MILLAR, A. H.; WHELAN, J. Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with pro mitochondrial structures rich in components of the protein import apparatus. **Plant Molecular Biology**, v.60, n.2, 201-223, 2006.

HUANG, X. et al. The earliest stages of adaptation in an experimental plant population: strong selection on QTLS for seed dormancy. **Molecular ecology**, v.19, n.7, p.1335-1351, 2010.

IANNONE, M. F. et al. Reactive oxygen species formation and cell death in catalase-deficient tobacco leaf discs exposed to paraquat. **Biological Trace Element Research**, v.146, n.2, p.246-255, 2012.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira:** Sistema fitogeográfico Inventário das formações florestais e campestres Técnicas e manejo de coleções botânicas Procedimentos para mapeamentos. 2. ed. Rio de Janeiro, 2012. 275 p.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. **Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa – BDMEP.** 2016. Disponível <<http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/>>. Acesso em 15 de julho de 2016.

ISMAIL, A. M. et al. Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*). **Annals of Botany**, v.103, n.2, p.197-209, 2009.

ISMAIL, A. M.; MACKILL, D. J. Plant genetic resources and climate change. In: ISMAIL A.I.H.; MACKILL, D. J. **Response to flooding: Submergence Tolerance in Rice**. Londres: Library British, 2013.

ISMOND, K. P. Enhanced low oxygen survival in Arabidopsis through increased metabolic flux in the fermentative pathway. **Plant Physiology**, v.132, n.3, 1292-1302, 2003.

JACKSON, M. B.; COLMER, T. D. Response and adaptation by plants to flooding stress. **Annals of Botany**, v.96, n.4, p.501-505, 2005.

JACKSON, M. B.; RAM, P. C. Physiological and molecular basis of susceptibility and tolerance of rice plants to complete submergence. **Annals of Botany**, v.91, p.227-241, 2003.

JOLY, C. A.; BRÄNDLE, R. Fermentation and adenylate metabolism of Hedychium coronarium J. G. Koenig (Zingiberaceae) and Acorus calamus L. (Araceae) under hypoxia and anoxia. **Functional Ecology**, v.9, n.3, p.505-510, 1995.

JUNK, W. J. **Wetlands of tropical South America.** In Wetlands of the world I: inventory, ecology and management (D. Whigham, S. Hejny & D. Dykyjová, eds.). Dr. W. Junk Publishing, Boston, 1993. p.679-739.

KATO-NOGUCHI, H. Pyruvate metabolism in rice coleoptiles under anaerobiosis. **Plant Growth Regulation**, v.50, n.1, p.41-46, 2006.

KIRK, G. J. D. Adaptation of Rice to Flooded Soils. **Progress in Botany**, v.75, p.215-253, 2013.

KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, v.12, n.12, p.17-44, 1960.

KLOK, E. J. et al. Expression profile analysis of the low-oxygen response in *Arabidopsis* root cultures. **The Plant Cell**, v.14, n.10, 2481-2494, 2002.

KOVALCHUK, I. "Multiple roles of radicles in plants," in Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants. New York: S. Dutta Gupta, 2010. 367 p.

KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**, v.7, n.1, p.1-29, 1997.

KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Growth control in woody plants**. San Diego, Academic Press. 1997, 489 p.

KRAFFE, E.; MARTY, Y.; GUDERLEY, H. Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. **Journal of Experimental Botany**, v.210, p.149-165, 2007.

KREUZWIESER, J.; RENNENBERG, H. Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. **Plant, Cell & Environment**, v.37, n.10, p.2245-2259, 2014.

KULICHIKHIN, K.Y. et al. Regulation of intracellular pH during anoxia in rice coleoptiles in acidic and near neutral conditions. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.7, 2119-2128, 2009.

LAKSHMANAN, M. et al. Elucidating Rice Cell Metabolism under Flooding and Drought Stresses Using Flux-Based Modeling and Analysis<sup>1,[C][W][OPEN]</sup>. **Plant Physiology**, v.162, n.4, p.2140-2150, 2013.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, SP: RiMa, 2004. 531 p.

LASANTHI-KUDAHETTIGE, R. et al. Transcript profiling of the anoxic rice coleoptile. **Plant Physiology**, v.144, n.1, p.218-231, 2007.

LEITE, P. F. Contribuição ao conhecimento fitoecológico do Sul do Brasil. **Ciência e Ambiente**, v.24, p.51-73, 2002.

LI, Z. G. et al. Hydrogen sulphide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings. **Plant, Cell & Environment**, v.36, n.8, p.1564-1572, 2013.

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Science Council**, v.25, n.3, p.148-157, 2001.

LIEBSCH, D.; MIKICH, S. B. Fenologia reprodutiva de espécies vegetais da Floresta Ombrófila Mista do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.32, n.2, p.375-391, 2009.

LIMA, R. B. S. et al. Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) seeds. **Revista Árvore**, v.32, n.1, p.19-25, 2008.

LIN, C. F. et al. Cloning and prokaryotic expression of a cDNA encoding a putative mitochondrial malate dehydrogenase in *Oryza sativa*. **DNA Sequence**, v.14, n.1, p.75-77, 2003.

LIU, Y. et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. **Journal Experimental Botany**, v.61, n.11, p.2979-2990, 2010.

LÓPEZ, M. A. et al. Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence. **The Plant Journal**, v.67, p.447-458, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 2002. 384p.

LU, Y.; WU, Y. R.; HAN, B. Anaerobic induction of isocitrate lyase and malate synthase in sub-merged rice seedlings indicates the important metabolic role of the glyoxylate cycle. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.37, n.6, p.406-414, 2005.

LUO, X. et al. Synergistic effects of *GhSOD1* and *GhCAT1* overexpression in cotton chloroplasts on enhancing tolerance to methyl viologen and salt stresses. **Plos One**, v.8, n.1, p.1-11, 2013.

LYTLE, D. A.; POFF, N. L. Adaptation to natural flow regimes. **Trends in Ecology & Evolution**, v.19, n.2, p.94-100, 2004.

MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C.; TAKAKI, M. Evaluation of naturally and artificially aged seeds of *Phaseolus vulgaris* L. **Seed Science and Technology**, v.29, n.1, p.137-149, 2001.

MAGNESCHI, L.; PERATA, P. Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen. **Annals of Botany**, v.103, n.2 p. 181–196, 2009.

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

MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase**. 147 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

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

MARCHIORETTO, M. A.; MAUHS, J.; BUDKE, J. C. Fenologia de espécies arbóreas zoocóricas em uma floresta psamófila no sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.21, n.1, p.193-201, 2007.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 2015. 659 p.

MARQUES, M. C. M. **Fenologia no limite sul da região tropical: padrões e algumas interpretações**. In: REGO GM, NEGRELLE RRB AND MORELLATO LPC (Eds), Fenologia: ferramenta para conservação, melhoramento e manejo de recursos vegetais arbóreos. Colombo: Embrapa Florestas, p. 101-110, 2007.

MARQUES, M. C. M.; JOLY, C. A. Germinação e crescimento de *Calophyllum brasiliense* (clusiaceae), uma espécie típica de florestas inundadas. **Acta Botanica Brasilica**, v.14, n.1, p.113-120, 2000.

MARQUES, M. C. M.; OLIVEIRA, P. E. A. M. Fenologia de espécies do dossel e do sub-bosque de duas Florestas de Restinga na Ilha do Mel, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.4, p.713-723, 2004.

MARQUES, M. C. M.; ROPER, J. J.; SALVALAGGIO, A. P. B. Phenological patterns among plant life-forms in a subtropical forest in southern Brazil. **Plant Ecology**, v.173, n.2, p.203-213, 2004.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 3.ed. N. York: Pergamon Press, 1989. 236 p.

McCREADY, R. M. et al. Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. **Analytical Chemistry**, v.22, n.9, p.1156-1158, 1950.

MEDINA, C. L. et al. *Erythrina speciosa* (Leguminosae-Papilionoideae) under soil water saturation: morphophysiological and growth responses. **Annals of Botany**, v.104, n.4, p.671-680, 2009.

MEDRI, C. et al. O alagamento do solo afeta a sobrevivência, o crescimento e o metabolismo de *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae)? **Semina**, v.33, n.1, p.123-134, 2012.

MEGURO, N. et al. Involvement of aldehyde dehydrogenase in alleviation of post-anoxic injury in rice. **Abiotic Stress Tolerance in Plants**, p.111-119, 2006.

MEI, Y.; SONG, S. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. **Journal of Zhejiang University Science B (Biomedicine & Biotechnology)**, v.11, n.12, p.965-972, 2010.

MELAAS, E. K; FRIEDL, M. A; RICHARDSON, A. D. Multiscale modeling of spring phenology across Deciduous Forests in the Eastern United States. **Global Change Biology**, v.22, n.2, p.792-805, 2016.

MELO, A. S. et al. Crescimento vegetativo, resistência estomática, eficiência fotossintética e rendimento do fruto da melancia em diferentes níveis de água. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.1, p.73-79, 2010.

MENEGUCCI, Z. R. H. **Estudo comparativo de respostas ao alagamento em plantas jovens de espécies arbóreas provenientes do pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2008.

MIRO, B.; ISMAIL, A. M. Tolerance of anaerobic conditions caused by flooding during germination and early growth in rice (*Oryza sativa* L.). **Frontiers in Plant Science**, v.4, n.269, p. 1-18, 2013.

MITHRAN, M. et al. Analysis of the role of the pyruvate decarboxylase gene family in *Arabidopsis thaliana* under low-oxygen conditions. **Plant Biology**, v.16, n.1, 28-34, 2014.

MITTERMEIER, R. A.; GIL, R. P.; HOFFMAN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREUX, J.; FONSECA, G. A. B. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions.** 2005. Disponível em <<http://www.biodiversityscience.org/publications/hotspots/cover.html>>. Acesso em 01 de dezembro de 2016.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v.16, n.6, p.300-309, 2011.

MOLLARD, F. P. O.; INSAUSTI, P.; SANCHEZ, R. A. Flooding induces secondary dormancy in *Setaria parviflora* seeds. **Seed Science Research**, v.17, n.1, p.55-62, 2007.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Plant Biotechnology**, v.58, p.459-481, 2007.

MORELLATO, L. P. C.; LEITÃO FILHO, H. F. Estratégias fenológicas de espécies arbóreas em floresta mesófila na Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**, v.50, p.163-173, 1990.

MORELLATO, L. P. C. et al. Estudo comparativo da fenologia de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semidecídua na Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.12, p.85-98, 1989.

MORELLATO, L. P. C. et al. Phenology of Atlantic rain forest trees: a comparative study. **Biotropica**, v.32, n.4b, p.811-823, 2000.

MONTEIRO, C. C. et al. Biochemical responses of the ethylene-insensitive *Never ripe* tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany**, v.71, p.306-320, 2011.

MUHANGUZI, H. D. R.; IPULET, P. Fruiting phenology of fig trees in Kalinzu Forest, Uganda. **African Journal od Ecology**, v.50, n.1, p.90-101, 2011.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853–858, 2000.

NAKAZONO, M. et al. Expression of a gene encoding mitochondrial aldehyde dehydrogenase in rice increases under submerged conditions. **Plant Physiology**, v.124, n.2, p.587-598, 2000.

NARSAI, R.; WHELAN, J. How unique is the low oxygen response? An analysis of the anaerobic response during germination and comparison with abiotic stress in rice and Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v.4, n.349, p.1-14, 2013.

NEWSTROM, L. E.; FRANKIE, G. W.; BAKER, H. G. A. New Classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at la selva, Costa Rica. **Biotropica**, v.26, n.2, p.141-159, 1994.

NUNES, Y. R. F.; FAGUNDES, M.; ALMEIDA, H. S.; VELOSO, M. D. M. Aspectos ecológicos da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão -anacardiaceae): fenologia e germinação de sementes. **Revista Árvore**, v.32, n.2, p.233-243, 2008.

NUNES, Y. R. S.; FAGUNDES, N.; SANTOS, R. M; DOMINGUES, E. B. S.; ALMEIDA, H. S.; GONZAGA, A. P. D. Atividades fenológicas de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) em uma floresta estacional decidual no norte de Minas Gerais. **Lundiana**, v.6, n.2, p.99-105, 2005.

OBERMULLER, E. A. et al. O contraste entre síndromes de polinização e sistemas efetivos de polinização e suas perspectivas para ecossistemas associados à Mata Atlântica. **Natureza on line**, v.6, n.1, p.42-47, 2008.

OMETTO, J. C. **Bioclimatologia vegetal**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 440 p.

PALERMO, F. F. et al. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.116, p.19-28, 2015.

PARK, M. R.; HASENSTEIN, K. H. Oxygen dependency of germinating Brassica seeds. **Life Sciences in Space Research**, v.8, p.30-37, 2016.

PAROLIN, P. Submerged in darkness: adaptations to prolonged submergence by woody species of the Amazonian floodplains. **Annals of Botany**, v.103, n.2, p.359-376, 2009.

PATRICIO, R. S. et al. Apifauna (Hymenoptera: Apidae) em área de restinga no Sul de Santa Catarina, Brasil. **Revista Tecnologia e Ambiente**, v.21, p.248-269, 2014.

PEDRONI, F., SANCHEZ, M.; SANTOS, F. A. M. Fenologia decopaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. Leguminosae, Caesalpinoideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.2, p.183-194, 2002.

PERATA, P. et al. Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. **Planta**, v.188, n.4, p.611-618, 1992.

PEREIRA, T. S. et al. Fenologia de espécies arbóreas em Floresta Atlântica da Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia**, v.63, n.2, p.329-339, 2008.

PEREIRA, M. R. N.; TONINI, H. Fenologia da andiroba (*Carapa guianensis*, Aubl., Meliaceae) no sul do estado de Roraima. **Ciência Florestal**, v.22, n.1, p.47-58, 2012.

PERNET, F. et al. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: Energetics and remodelling of membrane lipids. **Journal of Experimental Botany**, v.210, p.2999-3014, 2007.

PETROV, V. D.; BREUSEGEM, F. van. Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. **AoB Plants**, v.2012, p.1-13, 2012.

PINHEIRO, D. T. et al. Germinação e ação antioxidante em sementes de melão submetidas a estresse salino. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46, n.3, p.336-342, 2016.

PISICCHIO, C. M. et al. *Helicocarpus popayanensis* (Malvaceae) tolera a hipoxia do substrato? **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v.32, n.2, p.201-209, 2010.

POLGAR, C. A.; PRIMACK, R. B. Leaf-out phenology of temperate woody plants: from trees to ecosystems. **New Phytologist**, v.191, p.926–941, 2011.

POLLARD, A. J.; BRIGGS, D. Genecological Studies of *Urtica dioica* L. I. The nature of intraspecific variation in U. Dioica. **The New Phytologist**, v. 92, n.3, p.453-470, 1982.

PONTES, C. A. et al. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v.26, n.5, p.593-601, 2002.

POOBATHY, R. et al. Catalase and superoxide dismutase activities and the total protein content of protocorm-like bodies of *Dendrobium sonia-28* subjected to vitrification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.170, n.5, p.1066-1079, 2013.

PRITCHARD, S. L. et al. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.31, n.5, p.639-647, 2002.

PRODANOVIĆ, O. et al. Antioxidative enzymes during germination of two lines of serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. **Archives of Biological Sciences**, v.5, n.3, p.209-216, 2007.

QUAN, L. et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.50, n.1, p.2-18, 2008.

RAHMAN, A. et al. Chromosaponin I Specifically Interacts with AUX1 Protein in Regulating the Gravitropic Response of Arabidopsis Roots. **Plant Physiology**, v.125, n.1, p.990-1000, 2001.

RAHMAN, I. et al. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v.533, n.1-3, p.222-239, 2006.

RASBAND, W. S. **ImageJ – Image processing and Analysis in java**. Disponível em <<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>>. Acesso em 12 de março de 2017.

REDDY, S. J. Impact of heavy metals on changes in metabolic biomarkers of carp fish, *Cirrhinus mrigala*. **International Journal of Bioassays**, v.1, n.12, p.227-232, 2012.

REGO, G. M; LAVARONTI, O. J. Atividades Fenológicas de Imbuia (*Octea porosa* (Nees et. Martius ex. Ness) em Áreas de Floresta Ombrófila Mista, no Estado do Paraná. In: REGO, G. M (org). **Fenologia: ferramenta para conservação, 107 melhoramento e manejo de recursos vegetais arbóreos**. Dados eletrônicos. Colombo: Embrapa Florestas, p. 181-198, 2007.

REID, J. S. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *trigonella foenumgraecum* L. (Leguminosae). **Planta**, v.100, n.2, p.131-142, 1971.

REYS, P.; GALETTI, M.; MORELLATO, L. P. C.; SABINO, J. Fenologia reprodutiva e disponibilidade de frutos de espécies arbóreas em mata ciliar no rio Formoso, Mato Grosso do Sul. **Biota Neotropica**, v.5, n.2, p.1-10, 2005.

RICHARDSON, A. D.; ANDERSON, R. S.; ARAIN, M. A. Terrestrial biosphere models need better representation of vegetation phenology: results from the North American Carbon Program Site Synthesis. **Global Change Biology**, v.18, n.2, p.566–584, 2012.

ROBERTS, A. M. I. et al. Predicting a change in the order of spring phenology in temperate forests. **Global Change Biology**, v.21, p.2603–2611, 2015.

ROBERTS, J. et al. Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology**, v.98, n.2, 480-487, 1992.

RUTSCHOW, H. L.; BASKIN, T. I.; KRAMER, E. M. Regulation of solute flux through plamodesmata in the root meristem. **Plant Physiology**, v.155, n.4, p.1817-1826, 2011.

SACHS, M. M.; HO, D. T. H. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.37, p.363-376, 1986.

SANTOS, J. M. F. F. et al. Dinâmica populacional de uma espécie herbácea em uma área de floresta tropical seca no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.855-857, 2007. Suplemento 1.

SANTOS, S. B. et al. Acúmulo de matéria seca e óleo nas sementes de pinhão-manso e qualidade do óleo extraído. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.2, p.209-215, 2012.

SANTOS, S. R.; AGUIAR, I. B. Caracterização de frutos e sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (braquilho). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 50; 1999, Blumenau. **Programas e resumos**. Blumenau: Sociedade Botânica do Brasil: Universidade Regional de Blumenau, 1999. p.6-7.

SEVCIKOVA, M. et al. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v.56, n.11, p.537-546, 2011.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, p.1-26, 2012.

SHINGAKI-WELLS, R. et al. What happens to plant mitochondria under low oxygen? An omics review of the responses to low oxygen and reoxygenation. **Plant, Cell & Environment**, v.37, n.10, p.2260-2277, 2014.

SILVA NETA, I. C. **Expressão de genes relacionados à tolerância à baixa temperatura de germinação em sementes de milho**. 81 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia - Produção Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SILVA, A. C. et al. **Florestas inundáveis**: ecologia, florística e adaptações das espécies. Lavras: Editora UFLA, 2012, 167 p.

SINGH, J. S.; SINGH, V. K. Phenology of seasonally dry tropical forest. **Current Science**, v.63, p.684-688, 1992.

SINGH, K. P.; KUSHWAHA, C. P. Diversity of flowering and fruiting phenology of trees in a tropical deciduous forest in India. **Annals of Botany**, v.97, n.2, p.265-276, 2006.

SLESAK, I. et al. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta Biochimica Polonica**, v.54, p.39-50, 2007.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J.; KLEIN, R. M. **Euforbiáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1988. 408 p.

SOBRAL, M. et. al. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Carlos: Rima: Novo Ambiente, 2006. 350 p.

SONG, S.Q.; LEI, Y.B.; TIAN, X.R. Proline metabolism and cross-tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.52, n.6, p.897-904, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias das angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. **Polytechnisches Journal**, v.232, n.5, p.461-465, 1879.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TAKAHASHI, H. et al. Cell division and cell elongation in the coleoptile of rice *alcohol dehydrogenase 1*-deficient mutant are reduced under complete submergence. **Annals of Botany**, v.108, n.2, p.253-261, 2011.

TALORA, D. C.; MORELLATO, P. C. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. **Revista brasileira de Botânica**, v.23, n.1, p.13-26, 2000.

TESFAYE, G. et al. Phenology of seven indigenous tree species in a dry Afromontane forest, southern Ethiopia. **Tropical Ecology**, v.52, n.3, p.229-241, 2011.

TONINI, H. Amostragem para a estimativa de produção de sementes de castanheira-do-brasil em floresta nativa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.5, p.519-527, 2013.

TOUGOU, M. et al. Responses to flooding stress in soybean seedlings with the *alcohol dehydrogenase* transgene. **Plant Biotechnology**, v.29, n.3, 301-305, 2012.

TOZZI, H. H. **Caracterização da mobilização das reservas das sementes do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg) durante a germinação.** 55 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2010.

TSUJI, H. et al. Induction of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by submergence facilitates oxidation of acetaldehyde during reaeration in rice. **Febs Letters**, v.546, n.2/3, p.369-373, 2003.

TUNES, L. M. et al. Expressão diferencial de isoenzimas em sementes e em plântulas F1 de cevada. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.2, n.2, p.31-37, 2009.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

van DONGEN, J. T. et al. Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of *Arabidopsis* plants. **Annals of Botany**, v.103, n.2, 269-280, 2009.

van DONGEN, J. T. Phloem import and storage metabolism are highly coordinated by the low oxygen concentrations within developing wheat seeds. **Plant Physiology**, v.135, n.3, 1809-1821, 2004.

VENUGOPAL, N. B. R. K.; REDDY, S. L. N. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium in a teleost fish *Anabas scandens*: enzymological and biochemical changes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.24, n.3, p.287-293, 1992.

VIGEOLAS, H. et al. Lipid storage metabolism is limited by the prevailing low oxygen concentrations oilseed rape. **Plant Physiology**, v.133, n.4, p.2048-2060, 2003.

VILLA-HERNANDEZ, J.M. et al. Regulation of ribosome biogenesis in maize embryonic axes during germination. **Biochimie**, v.95, n.10, p.1871-1879, 2013.

VRANOVÁ, E. et al. Comprehensive analysis of gene expression. In Nicotiana tabacum leaves acclimated to oxidative stress. **Proceeding of the National Academy os Science of the United States of America**, v.99, n.16, p.10870-10875, 2002.

WAHID, A. et al. Pretreatment of seed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. **Journal of Plant Physiology**, v.164, n.3, p.283-294, 2007.

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

WEEDEN, N. F.; WENDEL, J. F. **Genetics of plant isozymes**. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S (Ed.). Isozymes in plant biology. London: Chapman and Hall, 1990. p.46-72.

WEITBRECHT, K.; MULLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.10, p.3289–3309, 2011.

XIAOLIN, W. et al. Genetic modification for improving seed vigor is transitioning from model plants to crop plants. **Frontiers in Plant Science**, v.8, n.8, p.1-7, 2017.

YAMASHITA, T.; FUJIWARA, A. Metabolism of acetate-1-<sup>14</sup>C in rice leaves. **Journal Soil Science and Plant Nutrition**, v.12, n.6, p.14-18, 1966.

YU, Y. et al. Transcriptome analysis during seed germination of elite Chinese bread wheat cultivar Jimai 20. **BMC Plant Biology**, v.14, n.20, 2014.

ZABALZA, A. et al. (2009). Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. **Plant Physiology**, v.149, n.2, 1087-1098, 2009.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1996. 662 p.

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

ZIPARRO, V. B.; MORELLATO, L. P. C. **Fenologia reprodutiva da comunidade arbórea em floresta atlântica no sudeste do Brasil: um estudo de seis anos**. In: REGO G. M.; NEGRELLE, R. R. B.; MORELLATO, L. P. C. Fenologia: ferramenta para conservação, melhoramento e manejo de recursos vegetais arbóreos. Colombo: Embrapa Florestas, p. 113-124. 2007.

ZOCCHE, J. J.; ALEXANDRE, M. R. Fenologia de espécies arbustivo-arbóreas das nascentes e margens do Rio Três Cachoeiras, Laguna/SC. **Revista de tecnologia e ambiente**, v.11, p.69-100, 2005.