

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA**

**NARA LÍDIA MENDES ALENCAR**

**FISIOLOGIA, BIOQUÍMICA E MORFOLOGIA DA**  
**GERMINAÇÃO DE MANDACARU (*Cereus jamacaru* D.C.)**

**FORTALEZA**  
**2009**

**NARA LÍDIA MENDES ALENCAR**

**FISIOLOGIA, BIOQUÍMICA E MORFOLOGIA DA  
GERMINAÇÃO DE MANDACARU (*Cereus jamacaru* D.C.)**

Dissertação submetida à Coordenação do  
Curso de Pós-Graduação em Agronomia  
/Fitotecnia, da Universidade Federal do  
Ceará (UFC), como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em Agronomia.  
Área de concentração: Fitotecnia  
Orientador: Prof. Dr. Renato Innecco

**FORTALEZA  
2009**

**NARA LÍDIA MENDES ALENCAR**

**FISIOLOGIA, BIOQUÍMICA E MORFOLOGIA DA GERMINAÇÃO DE  
MANDACARU (*Cereus jamacaru* D.C.)**

**Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Renato Innecco (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Maria Izabel Gallão (Co-orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Conselheiro)  
Universidade Federal do Ceará

---

Pesquisador. Dr. Edy Sousa de Brito (Conselheiro)  
Embrapa Agroindústria tropical

*Aos meus pais, Francisco Antônio de Alencar  
e Maria Evoneide Mendes de Sousa Alencar.*

*DEDICO.*

*É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."*

*"Martin Luther King"*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido alcançar mais essa conquista em minha vida.

Aos meus pais, Francisco Antônio de Alencar e Maria Evoneide Mendes de Sousa Alencar, por terem me deixado como maior herança a educação e pelo amor, carinho e dedicação a mim dedicados durante toda minha vida;

Ao meu noivo, Allisson dos Santos Cordeiro, pelo incentivo, apoio, amor e carinho nas situações mais difíceis e pela compreensão nos momentos de ausência;

Aos meus irmãos, Hiara Lígia Mendes Alencar e Carlos Eduardo Mendes de Alencar, por compartilharem comigo inúmeros momentos de alegria e por sempre me apoiarem.

Ao meu orientador, Renato Innecco, pela confiança, orientação, apoio e incentivo para a realização dessa dissertação;

À professora, Maria Izabel Gallão, pela inestimável contribuição para a realização dessa dissertação, desde a sugestão do tema, acompanhamento durante a realização das análises citoquímicas e pelas valorosas discussões para sua finalização.

Ao professor, *Enéas Gomes Filho*, por ter aceitado colaborar com esse trabalho, possibilitando a realização dos ensaios bioquímicos no Laboratório de Fisiologia Vegetal e pelas valorosas sugestões e críticas, que tanto enriqueceram esse trabalho.

Ao pesquisador, Edy Sousa de Brito, por ter aceitado participar da banca de dissertação e pelas críticas que contribuíram significativamente para esse trabalho.

Ao professores, José Tarquínio Prisco, pelas valorosas sugestões e discussões sobre o tema da dissertação e ao professor Joaquim Enéas Filho, pelo apoio e durante a condução do experimento.

Aos meus amigos, Elton Camelo Marques e Alexcyane Rodrigues Feijão, por terem contribuído para a realização desse trabalho e pelo apoio e carinho, nos momentos difíceis.

Ao Juan Carlos Alvarez Pizarro, pela inestimável ajuda na realização das análises bioquímicas e pelas valorosas sugestões concedidas a esse trabalho.

Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal: Aiala Amorim, Alexandre Bosco, Carlos Eduardo, Franklin Aragão, Júlio César, Michella Albuquerque, Michelle Andrade, Paulo André, Raimundo Wesley, Valdinéia Soares

Freitas e Viviane Pinho, que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho;

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, em especial, a Tennessee Nunes e Elízio Sampaio, pelo companheirismo durante o curso e pelos bons momentos;

Ao Laboratório de Análise de Sementes, representado pelo professor Sebastião de Medeiros Filho, pelo apoio e concessão para realização dos experimentos de germinação;

Ao professor, Marcos Esmeraldo, que concedeu significantes sugestões para a idealização e concretização desse trabalho;

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitotecnia, representado por seus professores, pelo incentivo e oportunidade de crescimento acadêmico;

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro fornecido para realização desse trabalho;

A todas as pessoas que contribuíram e apoiaram de alguma a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

**ALENCAR, N.L.M. FISILOGIA, BIOQUÍMICA E MORFOLOGIA DA GERMINAÇÃO DE MANDACARU (*Cereus jamacaru* D.C.). Dissertação de mestrado–UFC-111p.**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos da germinação de sementes de mandacaru. Inicialmente, foi analisado o efeito da luz e temperatura, na germinação das sementes de mandacaru, submetidas aos tratamentos de luz (branca, ausência, vermelha e vermelho-distante) associados aos de temperaturas [15, 20, 20-30 (alternada), 25, 30 e 35°C]. O índice de velocidade de germinação e a percentagem de germinação foram maiores a 25 e 30 °C associadas à luz branca, sendo o tempo médio de germinação menor sob essas condições e mais acentuado na condição de escuro a 20°C. A morfologia das sementes e as análises citoquímicas revelaram que as sementes de mandacaru apresentam paredes celulares finas quando coradas com o azul de toluidina (AT) e que se mantiveram inalteradas ao longo do processo germinativo. As células dos cotilédones e eixo hipocótilo-radícula apresentaram o mesmo tipo de parede celular, entretanto, houve diferenças no formato das células entre esses tecidos. A composição e a mobilização das reservas das sementes de mandacaru durante a germinação também foram avaliadas, através de análises citoquímicas e bioquímicas, nos diferentes períodos de germinação. Os lipídios foram detectados como a principal substância de reserva dessas sementes, correspondendo a 54,50% e 61,70%, da massa seca dos cotilédones e do eixo hipocótilo-radícula, respectivamente. A mobilização dessas reservas teve início logo depois da embebição, progredindo até o último período analisado (12 DAE). Os carboidratos representaram apenas 2,13% da massa seca da semente, correspondendo aos açúcares solúveis

(redutores e não-redutores) e amido, devido a isso tiveram pequena participação na mobilização das sementes de mandacaru. Por outro lado, as proteínas que corresponderam a cerca de 30% da massa seca das sementes de mandacaru, foram evidentemente mobilizadas, ao longo do período de germinação avaliado. Em relação às frações protéicas, as albuminas e as glutelinas foram as principais proteínas de reserva detectadas, correspondendo aos grupos que mais foram mobilizadas durante a germinação destas sementes. As análises mostraram diferentes padrões de degradação de proteínas, que foram confirmadas por eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). Apesar das globulinas e prolaminas terem sido detectadas, estas representaram uma pequena percentagem da proteína total dessas sementes. Em conclusão, as sementes de mandacaru são consideradas insensíveis à luz, embora sua germinação seja aumentada sob condições de luz e altas temperaturas, como 25 e 30°C. Os lipídios e as proteínas foram as principais substâncias de reserva detectadas nessas sementes, sendo, portanto os principais recursos fornecidos para o desenvolvimento das plântulas de mandacaru.

**Palavras-chave:** germinação, mandacaru, mobilização de reservas, morfologia e padrões eletroforéticos.

**ALENCAR, N.L.M. PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND MORPHOLOGY  
OF MANDACARU (*Cereus jamacaru* D.C.) GERMINATION.**

**ABSTRACT**

The aim of this work was to study the physiology, biochemistry and morphology of mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C) germination. Firstly, we analyzed the effects of light and temperature on mandacaru germination under four light treatments (white, dark, red and far-red) associated to six different temperatures [15, 20, 20-30 (alternated), 25, 30 and 35°C]. The germination speed index and germination percentage ratio were bigger at 25 and 30°C, associated to white light. On the other hand, the medium time germination was fewer in these conditions, and more pronounced in the dark at 20°C. Secondly, we studied seed morphology and cytochemical analyses revealed thin cell wall stained by Toluidin Blue (TB), which maintained unchanged during seed germination. Cotyledons and embryo-axes showed the same cell wall pattern, although had been observed differences in the cell form between them. Thirdly, we studied the main reserves composition and their mobilization during and following germination of *C. jamacaru* D.C seeds. We analyzed seeds in seven different periods after imbibitions, through biochemical and cytochemical analyses. Lipids were detectable as the major reserve, with 54,50% and 61,70% of seed dry mass of cotyledons and embryo-axes, respectively. This compound was one of the most involved on seed mobilization, which started after imbibition, carrying until the last stage analyzed (12 DAE). Carbohydrates represented only 2,13% of seed dry mass, comprising soluble sugars and starch, in this way, these compounds had little participation on mandacaru seed mobilization. On the other hand, proteins comprise about thirty percent of seed dry mass, playing an important role in *C.jamacaru*

germination. In concern about their fractions, albumins and glutelins were the major reserve proteins detectable in these seeds, which were mobilized during seed germination. These results showed different protein degradation, which were confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE). In spite of globulins and prolamins had been observed on *C. jamacaru* seeds, they represent a little percentage of this seeds, did not play essential role in these seeds. In conclusion, seeds of *C. jamacaru* are insensitive to light, although their germination increases under light and high temperature conditions, as 25 and 30°C. Lipids and proteins are the major reserves of *Cereus jamacaru* seeds, therefore corresponding to the main sources involved in the initial seedling development.

Key words: germination, mandacaru, reserve mobilization, morphology and eletrophoretic patterns.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Análise estrutural das sementes de mandacaru coradas com Azul de Toluidina .....	68
<b>Figura 2</b> – Seções transversais da semente de mandacaru, coradas com Azul de Toluidina .....	67
<b>Figura 3</b> – Cortes transversais de sementes de mandacaru coradas com Azul de toluidiana.....	69
<b>Figura 4</b> – Sementes de mandacaru vistas na lupa. ....	70
<b>Figura 5</b> – Estádios de desenvolvimento das sementes de mandacaru .....	72
<b>Figura 6</b> – Matéria seca das sementes de mandacaru, ao longo do seu processo germinativo.....	73
<b>Figura 7</b> – Médias dos teores lipídicos das sementes de mandacaru, ao longo do processo germinativo. ....	76
<b>Figura 8</b> – Cortes transversais das sementes de mandacaru coradas com Sudan IV. ...	78
<b>Figura 9</b> – Médias dos teores de açúcares solúveis, redutores e não-redutores, das sementes de mandacaru, durante sua germinação. ....	80
<b>Figura 10</b> – Médias dos teores de amido das sementes de mandacaru, ao longo do processo germinativo. ....	83
<b>Figura 11</b> – Seções transversais da semente de mandacaru ( <i>Cereus jamacaru</i> D.C.), durante a germinação.....	84
<b>Figura 12</b> – Médias dos teores das frações protéicas: albuminas, globulinas e prolaminas das sementes de mandacaru, durante processo germinativo. ....	87
<b>Figura 13</b> – Médias dos teores de glutelinas, proteínas totais e N-aminossolúveis, dos cotilédones e hipocótilos, das sementes de mandacaru durante processo germinativo..	90
<b>Figura 14</b> – Padrões eletroforéticos das frações protéicas albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), durante a germinação de sementes de mandacaru ( <i>Cereus jamacaru</i> D.C.).....	93

<b>Figura 15</b> –Padrões eletroforéticos das albuminas, em cotilédones e hipocótilos, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), durante a germinação de sementes de mandacaru ( <i>Cereus jamacaru</i> D.C.).....	94
<b>Figura 16</b> – Padrões eletroforéticos das globulinas, em cotilédones e hipocótilos, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), durante a germinação de sementes de mandacaru ( <i>Cereus jamacaru</i> D.C.).....	95
<b>Figura 17</b> – Padrões eletroforéticos das prolaminas, em cotilédones e hipocótilos, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), durante a germinação de sementes de mandacaru ( <i>Cereus jamacaru</i> D.C.).....	95
<b>Figura 18</b> – Padrões eletroforéticos das glutelinas, em cotilédones e hipocótilos, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), durante a germinação de sementes de mandacaru ( <i>Cereus jamacaru</i> D.C.).....	96
<b>Figura 19</b> – Cortes transversais de sementes de mandacaru ( <i>Cereus jamacaru</i> D.C.) coradas com Xylidine Ponceau.....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Resumo da análise de variância para os efeitos das diferentes temperaturas e tipos de luz nos parâmetros germinativos, IVG e TMG, das sementes de mandacaru...	56
<b>Tabela 2</b> – Valores médios do índice de velocidade de germinação das sementes de mandacaru, sob diferentes tipos de luz e temperatura. ....	57
<b>Tabela 3</b> – Valores médios do tempo médio de germinação das sementes de mandacaru, sob diferentes tipos de luz e temperatura. ....	58
<b>Tabela 4</b> – Resumo da análise de variância para os efeitos das diferentes temperaturas e tipos de luz nos parâmetros germinativos, percentagem de germinação, das sementes de mandacaru. ....	60
<b>Tabela 5</b> – Valores dos percentuais de germinação aos 7 dias, das sementes de mandacaru, sob diferentes tipos de luz e temperatura. ....	60
<b>Tabela 6</b> – Valores dos percentuais de germinação aos 14 dias das sementes de mandacaru, sob diferentes tipos de luz e temperatura. ....	61
<b>Tabela 7</b> – Resumo da análise de variância para os efeitos das diferentes temperaturas e tipos de luz sobre as variáveis, altura das plântulas e matéria seca. ....	64
<b>Tabela 8</b> – Valores médios da altura das plântulas de mandacaru, sob diferentes tipos de luz e temperatura.....	64
<b>Tabela 9</b> – Valores médios da matéria seca das plântulas de mandacaru, sob diferentes tipos de luz e temperatura.....	65
<b>Tabela 10</b> – Resumo da análise de variância para as médias de Matéria seca dos cotilédones e eixo hipocótilo-radícula, ao longo do processo germinativo. ....	73
<b>Tabela 11</b> – Composição centesimal dos componentes, cotilédones e eixo hipocótilo-radícula, das sementes quiescentes de mandacaru.....	74
<b>Tabela 12</b> – Resumo da análise de variância das médias dos teores de lipídios dos cotilédones e eixo hipocótilo-radícula, ao longo do processo germinativo. ....	75
<b>Tabela 13</b> – Resumo da análise de variância das médias dos açúcares solúveis(redutores e não-redutores), das sementes de mandacaru, nos diferentes períodos de germinação avaliados.....	79

**Tabela 14** – Resumo da análise de variância dos teores de amido das sementes de mandacaru, ao longo do período de germinação avaliado. .... 82

**Tabela 15** – Resumo da análise de variância das médias dos teores de albuminas, globulinas e prolaminas das sementes de mandacaru, ao longo do período de germinação avaliados. .... 86

**Tabela 16** – Resumo da análise de variância das médias dos teores de glutelinas, proteínas totais e N-aminossolúveis das sementes de mandacaru, ao longo do período de germinação avaliados. .... 89

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1. Justificativa</b> .....	19
<b>1.2. Objetivo geral</b> .....	22
<b>1.3. Objetivos específicos</b> .....	22
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
<b>2.1. Formação das sementes e seu papel no ciclo reprodutivo das plantas</b> .....	23
<b>2.1.1. Aspectos gerais da germinação</b> .....	24
<b>2.1.2. Fatores ambientais que controlam a germinação das sementes</b> .....	25
<b>2.1.3. O papel da água na germinação</b> .....	26
<b>2.1.4. O papel da temperatura na germinação</b> .....	26
<b>2.1.4.1. Influência da temperatura na germinação de cactáceas</b> .....	27
<b>2.1.5. O papel da luz na germinação</b> .....	28
<b>2.1.5.1. Influência da luz na germinação de cactáceas</b> .....	29
<b>2.1.6. Influência da interação da luz e temperatura na germinação de cactáceas</b> .....	29
<b>2.1.7. Medidas de avaliação da germinação</b> .....	30
<b>2.2. Acúmulo e mobilização das principais substâncias de reservas das sementes</b> .....	31
<b>2.2.1. Acúmulo e utilização de lipídios</b> .....	33
<b>2.2.2. Acúmulo e utilização de carboidratos</b> .....	34
<b>2.2.3. Acúmulo e utilização de proteínas</b> .....	35
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
<b>3.1. Coleta dos frutos e descrição da área</b> .....	38
<b>3.2. Obtenção e armazenamento das sementes</b> .....	38
<b>3.3. Experimento 1: Avaliação do efeito de diferentes tipos de luz e temperaturas sobre a germinação de mandacaru</b> .....	39
<b>3.3.1. Local de condução dos experimentos</b> .....	39
<b>3.3.2. Condições experimentais</b> .....	39
<b>3.3.3. Medidas de germinação e desenvolvimento de plântulas</b> .....	40
<b>3.3.4. Descrição da morfologia das sementes e dos estádios de desenvolvimento</b> .....	42

3.3.5. Descrição da morfologia das sementes .....	42
3.3.6. Análise morfológica das sementes de mandacaru .....	43
3.3.6.1. Condições experimentais .....	43
3.3.6.2. Fixação e processamento pós-fixação.....	43
3.3.6.3. Coloração com Azul de Toluidina.....	44
3.3.7. Descrição dos estádios de desenvolvimento .....	44
3.3.8. Experimento 2: Avaliação morfológica e bioquímica da mobilização das reservas das sementes de mandacaru, durante o seu processo germinativo.....	45
3.3.8.1. Local de condução dos experimentos.....	45
3.3.9. Avaliação da mobilização das reservas por métodos bioquímicos .....	45
3.3.9.1. Condições experimentais .....	45
3.3.9.2. Extração e dosagem de lipídios .....	46
3.3.9.3. Preparação dos extratos etanólicos.....	47
3.3.9.4. Determinação dos teores de açúcares solúveis.....	47
3.3.9.5. Determinação dos açúcares redutores .....	48
3.3.9.6. Determinação dos açúcares não-redutores .....	48
3.3.9.7. Extração e determinação de amido.....	49
3.3.9.8. Determinação dos teores de N-aminossolúveis .....	49
3.3.9.9. Extração e determinação das frações protéicas das proteínas.....	50
3.3.9.10. Delineamento experimental e análise dos dados.....	51
3.3.10. Padrões eletroforéticos das frações protéicas das proteínas de sementes de mandacaru .....	52
3.3.11. Avaliação da mobilização das reservas por métodos citoquímicos.....	53
3.3.11.1. Condições experimentais.....	53
3.3.11.2. Colorações.....	54
3.3.11.2.1. Xylidine Ponceau (XP).....	54
3.3.11.2.2. Reação do PAS (Periodic Acid-Schiff) .....	54
3.3.11.2.3. Reação com Lugol.....	55
3.3.11.2.4. Reação com Sudan IV.....	55
3.3.11.2.5. Observação dos cortes histológicos .....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
4.1. Análise da germinação .....	56
4.1.1. Medidas de IVG e TMG.....	56
4.1.2. Germinação (%).....	59

<b>4.1.3. Medidas de crescimento .....</b>	<b>63</b>
<b>4.2. Descrição morfológica e dos estádios de desenvolvimento.....</b>	<b>65</b>
<b>4.2.1. Análise estrutural das sementes.....</b>	<b>65</b>
<b>4.2.2. Descrição morfológica das sementes.....</b>	<b>69</b>
<b>4.2.3. Descrição dos estádios de desenvolvimento das sementes.....</b>	<b>71</b>
<b>4.2.4. Determinação da matéria seca dos cotilédones e do eixo hipocótilo-radícula das sementes de mandacaru durante o seu processo germinativo .....</b>	<b>73</b>
<b>4.2.5. Análise da mobilização das reservas das sementes de mandacaru durante seu processo germinativo.....</b>	<b>74</b>
<b>4.2.5.1. Composição das sementes de mandacaru .....</b>	<b>74</b>
<b>4.2.5.2. Mobilização das reservas lipídicas .....</b>	<b>75</b>
<b>4.2.5.3. Mobilização de carboidratos .....</b>	<b>78</b>
<b>4.2.5.3.1. Mobilização de açúcares solúveis, redutores e não-redutores.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2.5.3.2. Mobilização de amido .....</b>	<b>82</b>
<b>4.2.5.4. Mobilização das reservas protéicas.....</b>	<b>85</b>
<b>4.2.5.4.1. Análise por métodos bioquímicos.....</b>	<b>85</b>
<b>4.2.5.4.2. Análise eletroforética das frações protéicas.....</b>	<b>92</b>
<b>4.2.5.4.3. Análise por métodos citoquímicos.....</b>	<b>97</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>100</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Justificativa

A família Cactaceae se constitui de aproximadamente 124 gêneros e 1438 espécies, distribuídas nas regiões tropicais do Novo Mundo, ocorrendo principalmente em áreas quentes e secas (HUNT; TAYLOR; CHARLES, 2006). O centro de origem das cactáceas é o continente americano, sendo estas encontradas desde o Norte do Canadá até a Patagônia na Argentina (RÓJAS-ARÉCHIGA; VÁSQUEZ-YANES, 2000).

O Brasil é considerado o terceiro maior centro de diversidade das Cactaceae, onde cerca de 3/4 das espécies são endêmicas, totalizando 162 espécies nativas, sendo que a maioria se encontra na Caatinga nordestina, de acordo com Taylor e Zappi (2004), muitas das quais endêmicas e que necessitam de maiores estudos.

As Cactaceae possuem importância econômica principalmente pelo valor ornamental, forrageiro, medicinal e alimentar (ROCHA; AGRA, 2002; ROCHA *et al.*, 2006). Com relação à agropecuária, algumas espécies servem para alimentação de bovinos e caprinos, principalmente na época da estiagem. A predominância de espécies de cactáceas na fisionomia vegetacional da caatinga nordestina, principalmente dos gêneros *Cereus*, *Opuntia* e *Pilosocereus*, tem papel fundamental na alimentação de fauna local (ANDRADE; MARQUES; ZAPPI, 2006 a,b).

Dentre as espécies nativas da Caatinga, o mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.) apresenta grande potencial econômico devido à sua rusticidade e às suas aplicações como forrageira. O mandacaru também pode ser utilizado como recurso madeireiro para reflorestamento, recurso medicinal e ornamental, sendo também considerada uma planta símbolo do Nordeste Brasileiro (ANDRADE LIMA, 1989).

O mandacaru é um arbusto grande ou arvoreta de 3 a 8 metros de altura, suculento, espinhento, de caule multiarticulado em ramificações candelabrifformes, distribuído em toda a Caatinga do Nordeste Brasileiro e do Vale do Rio São Francisco, ocorrendo em abundância em diferentes tipos de solos bem como sobre afloramentos rochosos (BRITO *et al.*, 2007). As folhas são substituídas pelos ramos articulados de cor verde, com espinhos nos vértices, que fazem o papel destas. As flores são solitárias, grandes (12-15 cm de comprimento), fixadas nos vértices dos ramos, apresentando cor branca e amarela, que se abrem a noite. Os frutos são bagas deiscentes carnosas de 10-12 cm de comprimento, com superfície glabra e cor vermelho-lilás, contendo muitas sementes pretas dispersas na polpa branca (LORENZI; MATOS, 2002).

Na região semi-árida do Nordeste Brasileiro, os caules suculentos do mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.) são amplamente utilizados na alimentação de bovinos, ovinos e caprinos (LIMA, 1998). O mandacaru, dentre outras cactáceas nativas da caatinga, tem sido utilizado nos períodos de seca prolongada como um dos principais suportes forrageiros dos ruminantes (SILVA *et al.*, 2005).

Cavalcanti e Resende (2004), avaliando a utilização das plantas nativas da caatinga pelos pequenos agropecuaristas para alimentação dos animais na seca, em áreas do sertão nordestino, registraram que o mandacaru é utilizado por 46,25% dos agropecuaristas, enquanto o xiquexique é utilizado por 10,51%, a coroa-de-frade por 6,96% e o facheiro por 12,28 %.

Além das aplicações do mandacaru na forragicultura, existe também a possibilidade de sua utilização na alimentação humana, principalmente no uso de seus frutos que são bastante atrativos em cor e sabor. O uso de cactáceas na alimentação humana já é bastante difundido em alguns países, como México e Peru, onde os frutos e cladódios de cactus são considerados iguarias (NOBEL, 2002).

Análise da composição química da planta e dos frutos de mandacaru realizada por Barbosa *et al.* (2007) mostraram que os frutos apresentam teores de proteínas em torno de 5%, que é o aceitável para uma alimentação humana saudável, e a planta apresenta níveis de proteínas brutas e fibras indicadas para a alimentação animal.

O mandacaru também tem uma promissora aplicação ornamental, tendo em vista o seu exuberante caule que se mantém esverdeado durante todo o ano, mesmo sob condições de pouca disponibilidade de água, permitindo uma ornamentação mais rústica e característica da região Nordeste (ANDRADE-LIMA, 1989).

Com relação às suas aplicações na medicina popular, os ramos e raízes do mandacaru são empregados como remédio caseiro em todo o Nordeste. Agra (1996) cita para os Cariris Velhos (PB), o infuso ou o decoto da raiz no tratamento de problemas renais (principalmente “pedra nos rins”) e um xarope para o tratamento de tosses, bronquites e úlceras. O suco dos ramos é utilizado em uso interno no tratamento de problemas do pulmão, escorbuto e infecções de pele (MORS *et al.*, 2000).

Apesar da importância ecológica e econômica das espécies tropicais e nativas como o mandacaru, são poucas as informações sobre os fatores envolvidos na sua germinação, nas rotas bioquímicas e nos mecanismos de mobilização de reservas de suas sementes (LIMA *et al.*, 2008).

A inexistência de estudos básicos sobre a biologia dessa planta, no que se referem às suas formas de propagação, principalmente a sexuada, dificulta os estudos com essa espécie. Dessa maneira, torna-se relevante obter informações sobre: o comportamento germinativo das sementes de mandacaru, os fatores requeridos para iniciar a germinação, como luz e temperatura, bem como os componentes envolvidos na mobilização de suas reservas.

Estudos sobre os aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação das sementes de mandacaru podem também ser usados para prever a viabilidade das suas sementes e quais dos seus componentes poderiam ser utilizados economicamente.

O preenchimento dessa lacuna sobre as etapas iniciais do desenvolvimento da espécie *Cereus jamacaru* D.C. propiciará uma melhor exploração dos seus potenciais usos. Da mesma forma, possibilitará a geração de conhecimentos agrônômicos sobre plantas adaptadas ao Nordeste, bem como novas alternativas de atividades agrícolas para os produtores rurais do semi-árido, os quais incrementarão o desenvolvimento sócio-econômico da região.

Essas informações poderão também fornecer subsídios para o melhor conhecimento dos aspectos reprodutivos e ecológicos de plantas de regiões áridas e semi-áridas, bem como subsídios taxonômicos para a identificação de novas espécies de cactáceas, particularmente aquelas do gênero *Cereus*.

## **1.2. Objetivo geral**

Estudar os aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C), durante o seu processo germinativo.

## **1.3. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito de diferentes tipos de luz e temperaturas sob as variáveis germinativas: índice de velocidade de germinação (IVG), percentagem de germinação (% G) e tempo médio de germinação (TMG).
- Avaliar o efeito de diferentes tipos de luz e temperaturas sobre o desenvolvimento das plântulas, determinando a matéria seca e altura das plântulas.

- Descrever a morfologia das sementes e das plântulas através da análise estrutural das sementes e de sua morfologia interna.
- Determinar os estádios de desenvolvimento das sementes e das plântulas, ao longo do período de germinação.
- Determinar os principais componentes de reserva das sementes de mandacaru.
- Analisar a mobilização das reservas durante a germinação das sementes de mandacaru, utilizando de métodos bioquímicos e citoquímicos.
- Verificar as mudanças nos padrões eletroforéticos das frações protéicas das sementes de mandacaru, durante o processo germinativo

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Formação das sementes e seu papel no ciclo reprodutivo das plantas**

As plantas superiores apresentam como uma das suas principais características a formação das sementes, as quais contêm o embrião protegido por tegumentos derivados de tecidos de origem materna (FERREIRA; BORGUETTI, 2004; RAVEN; EVERT; CURTIS, 2001).

O desenvolvimento das sementes pode ser dividido aproximadamente em três estágios: a morfogênese inicial, que é a fase onde o embrião sofre as primeiras divisões celulares e adquire a arquitetura básica de uma planta, ocorrendo logo após a dupla-fecundação; a formação do endosperma triplóide, que inicialmente se apresenta em um estágio cenocítico, e logo em seguida adquire um estágio celularizado e diferenciado e a fase de maturação das sementes, onde as células do embrião continuam em expansão e

diferenciação celular, concomitantemente com a síntese de proteínas de reserva e o armazenamento de compostos de carbono (carboidratos e lipídios) no embrião. (RAVEN; EVERT; CURTIS, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2002).

Durante a última fase da formação das sementes, o embrião se torna metabolicamente quiescente e tolerante à dessecação, através da supressão da germinação precoce, perda de água e da indução da dormência, mecanismos estes que impedem a germinação das sementes sob condições desfavoráveis (OLSEN, 2001).

A semente, contendo o embrião com a nova planta em miniatura, é estruturalmente e fisiologicamente equipada para desempenhar o seu papel como unidade dispersora das plantas espermatófitas e manter a diversidade de muitas espécies vegetais (AL-HELAL, 1996). Estas estruturas também são providas de reservas alimentares para sustentar o crescimento da plântula até o momento que a mesma, alcance sua capacidade autotrófica. O sucesso reprodutivo de muitas espécies em qualquer habitat depende do controle e da duração da germinação (OLSEN, 2001).

### **2.1.1. Aspectos gerais da germinação**

A germinação corresponde ao conjunto de processos fisiológicos que começam com a hidratação das sementes secas quiescentes, terminando com o alongamento do eixo embrionário e protrusão da radícula (BEWLEY, 1997).

O processo germinativo se inicia com a absorção de água e embebição das sementes secas, sendo que essa absorção tem um comportamento trifásico. A fase I é caracterizada pela reativação do metabolismo acompanhada do rápido aumento da respiração, proporcional ao aumento da hidratação dos tecidos das sementes. A fase II é uma fase de plateau, onde a atividade respiratória se estabiliza (MEI YU-QIN; SONG SONG-QUAN, 2008). A fase III corresponde ao maior incremento da absorção da água

e a um segundo aumento na atividade respiratória, que se relaciona ao alongamento do embrião e a penetração nas estruturas que o envolvem, culminando na protrusão da radícula e completando a germinação (BEWLEY; BLACK, 1994; FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Iniciada a germinação das sementes, estas passam por processos envolvendo mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas no metabolismo (BEWLEY; 1997), as quais podem ser detectadas *in situ* por processos citoquímicos e histoquímicos (SILVA; CORTELAZZO; DIETRICH, 1998; GALLÃO; DAMASCENO; SOUSA DE BRITO, 2006). Tais processos incluem numerosos eventos como reparo de DNA, a síntese de proteínas, a formação de enzimas que atuam nos processos respiratórios e na mobilização das reservas (BEWLEY; BLACK, 1994; BEWLEY, 1997).

### **2.1.2. Fatores ambientais que controlam a germinação das sementes**

A germinação é um processo complexo que se relaciona diretamente aos constituintes genéticos das sementes e a vários fatores ambientais como luz, temperatura, umidade, oxigênio e substâncias químicas (BEWLEY, 1997). Muitas vezes o embrião é impedido de germinar por fatores inerentes a ele próprio ou por fatores ambientais, que atuam diretamente no controle do tempo e local corretos para ocorrência da germinação (OLSEN, 2001).

As sementes de diferentes espécies apresentam comportamento variável com relação às condições necessárias à sua germinação. Portanto, tais conhecimentos são de suma importância para fornecer informações de interesse biológico e ecológico sobre determinadas espécies (LABORIAU, 1983).

### **2.1.3. O papel da água na germinação**

O processo de embebição da água pelas sementes é dependente da temperatura e da água disponível, sendo que a capacidade de retenção de água durante o processo determinará o sucesso da germinação (FERRAZ-GRANDE; TAKAKI, 2006).

Entre os fatores que influenciam o processo germinativo, a água é, sem dúvida, o mais importante. Quando removida, abaixo do limite suportado pela célula, pode promover o aumento da concentração dos solutos, a alteração do pH da solução intracelular, a aceleração de reações degenerativas, a desnaturação de proteínas e a perda da integridade das membranas (SUN; LEOPOLD, 1997). Desta forma, o estresse hídrico, geralmente, atua diminuindo a velocidade e a percentagem de germinação das sementes, sendo que, cada espécie, responde diferentemente ao estresse hídrico, pois existem valores específicos de potenciais hídricos abaixo do qual a germinação não ocorre (FERREIRA; BORGUETTI, 2004).

### **2.1.4. O papel da temperatura na germinação**

A temperatura exerce influência determinante no processo germinativo, podendo agir sobre a velocidade da absorção de água, bem como sobre as reações bioquímicas que determinam todo o processo, afetando, portanto, não só o total da germinação (porcentagem), mas como também a velocidade e a uniformidade da germinação (BEWLEY; BLACK, 1994; MENEZES *et al.*, 2004; ZAIDAN; BARBEDO, 2004).

O período de germinação pode mudar completamente devido à temperatura, pois a germinação será mais rápida e o processo mais eficiente quanto maior for a temperatura, dentro de certos limites (LABORIAU, 1983). A temperatura ótima para a germinação varia de acordo com as espécies, sendo esta definida geneticamente e,

também, em função das condições fisiológicas das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). A faixa de temperatura na qual as sementes germinam refletem muitas vezes as características térmicas do habitat onde tais espécies ocorrem (FERRAZ-GRANDE; TAKAKI; 2006). A temperatura ótima para a maioria das espécies tropicais está situada entre 15 e 30°C e a máxima entre 30 e 40°C, podendo a mínima aproximar-se do ponto de congelamento (STEFANELLO *et al.*, 2006). Abaixo da temperatura ótima, há redução da velocidade do processo, o que pode também levar a uma redução no total da germinação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

#### **2.1.4.1. Influência da temperatura na germinação de cactáceas**

A germinação das cactáceas ocorre em uma ampla média de temperatura variando de 10 a 40 °C (NOLASCO *et al.*, 1996), como a maioria das espécies de habitats tropicais. Para as sementes de cactus, as médias de temperaturas favoráveis estão entre 15 e 35° C, sendo que alguns trabalhos têm verificado que a temperatura ótima para a germinação de sementes de cactus é normalmente de 25° C (ROJAS-ARÉCHIGA; VÁSQUEZ-YANES, 2000).

Alguns estudos têm mostrado que a temperatura pode afetar a germinação das cactáceas das seguintes formas: temperaturas extremas não favorecem a germinação, principalmente as inferiores a 12°C e superiores a 28°C; as diferentes espécies apresentam respostas específicas às mudanças de temperaturas; o tempo médio necessário para o início da germinação é reduzido com o aumento da temperatura; as respostas à temperatura dependem da idade das sementes: sementes mais jovens iniciam sua germinação mais rapidamente, que as mais velhas; temperaturas alternadas apresentam maiores percentuais de germinação que temperaturas constantes (NOBEL, 2002; ROJAS-ARÉCHIGA, 2002).

### 2.1.5. O papel da luz na germinação

A luz é determinante na germinação das sementes de várias espécies. No entanto, a sensibilidade da semente ao efeito da luz varia de acordo com a qualidade, a intensidade luminosa e o tempo de irradiação, bem como com a temperatura e o período de embebição (LABORIAU, 1983; ZAIDAN; BARBEDO, 2004).

O estímulo da germinação pela luz é relacionado a um sistema de pigmentos denominado fitocromo, que ao absorver luz num determinado comprimento de onda, muda de estrutura bioquímica e permitem, ou não, a resposta fotomorfogenética (KRAEMER; KÂMPF; ÁQUILA, 2000). Aparentemente, o fitocromo está sempre associado ao funcionamento das membranas biológicas, regulando, provavelmente, sua permeabilidade e controlando dessa maneira, o fluxo de inúmeras substâncias dentro das células e entre elas (TAIZ; ZEIGER, 2002).

Em resposta à luz, as espécies podem ser classificadas em fotoblásticas positivas, ou seja, aquelas que necessitam de luz para germinar; fotoblásticas negativas, que germinam melhor na ausência de luz ou fotoblásticas neutras que são insensíveis à luz (LABORIAU, 1983). As sementes fotoblásticas positivas apresentam o estímulo positivo da germinação quando o Fv (fitocromo vermelho é ativado pela luz vermelha, com o pico de absorção máximo em 660 nm), convertendo-se na segunda forma, no Fve, que é a forma ativa (pico de absorção máxima em 730 nm) induzindo a germinação de suas sementes (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

A germinação das sementes de algumas espécies pode ser inibida pela exposição contínua à luz branca, à ausência de luz, à iluminações prolongadas ou à exposições a curtos períodos de luz vermelho-distante (ZAIDAN; BARBEDO, 2004).

### **2.1.5.1. Influência da luz na germinação de cactáceas**

Estudos pioneiros sobre a germinação de cactáceas, como os realizados por Alcorn; Kurtz (1959) descreveram que a luz tem efeito estimulante na germinação de cactáceas como *Carnegiea gigantea*. De forma contrastante, Zimmer (1969) apud Rojas-Aréchiga; Vásquez- Yanes (2000), trabalhando com várias espécies de cactus, encontraram que algumas germinam no escuro enquanto outras precisam de luz para germinar. Estudos recentes têm demonstrado que a luz estimula a germinação de algumas sementes de cactáceas, indicando que estas são fotoblásticas positivas (ROJAS-ARÉCHIGA; VASQUEZ- YANES, 2000; ORTEGA-BAES; ROJAS-ARÉCHIGA, 2007).

Algumas sementes de cactus têm sua germinação estimulada quando são expostas à luz vermelha, como as sementes de *Stonecereus griseus*, mas o efeito dessa luz é reversível pela luz vermelho-distante, sugerindo a participação do fitocromo no controle da germinação (PIMIENTA-BARRIOS; DEL CASTILLO, 2002).

A alta percentagem de germinação das sementes de cactáceas está associada com uma testa fina e com a presença de grânulos de amido. Da mesma forma, as sementes de muitas espécies selvagens que respondem à luz são também ricas em lipídios, o que pode estar relacionado ao seu pequeno tamanho, a exigência da luz, bem como a proximidade das sementes a superfície do solo (NOBEL, 2002).

### **2.1.6. Efeitos da interação da luz e temperatura na germinação de cactáceas**

A distribuição das espécies de plantas em seus ambientes naturais é determinada por variações em fatores ambientais de seu hábitat, como luz e temperatura, sendo estas variações preponderantes para o estabelecimento das cactáceas em seu hábitat

(RAMÍREZ-PADILLA; VALVERDE, 2005). A alta sensibilidade das sementes às condições ambientais é resultado de maior probabilidade de germinação quando a sobrevivência de suas plântulas é elevada (SIMÃO; SOCOLOWSKY, TAKAKI, 2007).

Rojas-Aréchiga e Vásquez-Yanes (2000) sugerem que para as sementes de cactus, o requerimento à luz pode estar associado à sua forma de vida, devido a efeitos maternos, que são influenciados diretamente pela temperatura. De forma geral, os cactus globosos como, *Mammillaria*, *Echinocactus* e *Ferocactus* requerem a luz para germinar, sendo considerados então fotoblásticos positivos, enquanto que os cactus colunares, como *Cephalocereus* e *Pachycereus*, são indiferentes à luz ou podem ser fotoblásticos positivos (ROJAS-ARÉCHIGA; OROZCO-SEGÓVIA; VÁSQUEZ-YANES, 1997).

As condições ambientais necessárias para a germinação são também influenciadas pela massa das sementes. De acordo com Pearson *et al.*, (2003) pequenas sementes respondem positivamente a influência da luz, enquanto sementes grandes respondem positivamente a flutuações de temperatura.

### **2.1.7. Medidas de avaliação da germinação**

As medidas de germinação ainda são determinadas precisamente em um único estágio o da germinação: o seu término. A emergência de uma das estruturas do eixo embrionário, usualmente a radícula, nos permite reconhecer quando a germinação tem sido finalizada (BEWLEY; BLACK, 1994).

Múltiplas formas de medir a germinação foram desenvolvidas por diversos autores (LABORIAU, 1983; BEWLEY; BLACK, 1994; FERREIRA; BORGUETTI, 2004). Dentre elas, a germinabilidade (% G) é a mais utilizada por ser a medida mais simples, representando a porcentagem de sementes germinadas em relação ao número

de sementes dispostas a germinar sob determinadas condições experimentais. Entretanto essa medida informa apenas o número total de sementes germinadas, não refletindo quanto tempo foi necessário para que as sementes atingissem tal percentagem de germinação (FERREIRA; BORGUETTI, 2004).

Para avaliar o tempo e a distribuição da germinação de um ponto de vista cinético existem outras medidas de germinação, como o tempo médio de germinação (TMG), desenvolvido por Laboriau, (1983). O TMG corresponde ao tempo necessário para as sementes germinarem, sendo que essa variável, tanto fornece informações sobre as vias metabólicas envolvidas no processo, como também as estratégias de germinação de determinados lotes ou espécies sob determinadas condições ambientais (FERREIRA; BORGUETTI, 2004; LIMA *et al.*, 2006).

Tendo em vista que a germinação é um processo dinâmico que envolve a atuação de várias vias metabólicas, outras medidas da cinética da germinação foram desenvolvidas, como o índice de velocidade de germinação (IVG) descrito por Maguire (1962), amplamente conhecido na área agrônômica.

## **2.2. Acúmulo e mobilização das principais substâncias de reservas das sementes**

As proteínas, os lipídios e os carboidratos são os principais compostos de reserva estocados durante os estádios tardios do desenvolvimento das sementes. Em geral, essas substâncias são acumuladas nos cotilédones, ou no endosperma e, menos freqüentemente, no perisperma (BEWLEY; BLACK, 1994). A composição química das sementes é determinada por fatores genéticos e, portanto, varia bastante entre as espécies e mesmo entre suas variedades e cultivares (BEWLEY, 1997).

O acúmulo das substâncias de reservas durante a formação das sementes tem basicamente duas funções, que se relacionam com a manutenção e o desenvolvimento

do embrião, sendo fonte de energia para manter processos metabólicos em funcionamento e/ou fonte de matéria para a construção de tecidos vegetais que irão constituir as plântulas (BUCKERIDGE *et al.*, 2004; GALLÃO *et al.*, 2007).

Os carboidratos e os lipídios servem como fonte de energia e de carbono para a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas, enquanto que as proteínas têm como função armazenar nitrogênio e enxofre essenciais para a síntese de proteínas e compostos essenciais para a plântula em crescimento (CORTE *et al.*, 2006).

De maneira geral, durante a formação da semente, observa-se inicialmente, um acúmulo de compostos derivados de carboidratos tais como sacarose, glucose e frutose (BUCKERIDGE *et al.*, 2004), bem como compostos nitrogenados como aminoácidos e amidas. Essas substâncias drenadas da planta-mãe são os principais metabólitos para a formação das substâncias de reservas que serão acumuladas para o fornecimento de energia e substâncias básicas para os processos envolvidos com a germinação e o desenvolvimento das plântulas (DANTAS *et al.*, 2008).

Muitos estudos têm mostrado que o controle da mobilização de reservas é realizado por hormônios e pelo efeito fonte-dreno exercido pelo eixo-embrionário, baseado nisso duas hipóteses foram propostas para explicar o papel do eixo nesse processo (BEWLEY, BLACK, 1994; BEWLEY, 1997). A primeira hipótese ressalta que o eixo em crescimento pode agir como dreno, direcionando os produtos da degradação, podendo também inibir a síntese de enzimas e as suas atividades. A segunda hipótese mostra que o crescimento do eixo pode levar a produção de hormônios, estes por sua vez, podem estimular a síntese de enzimas hidrolíticas necessárias para a mobilização das reservas dos cotilédones, favorecendo o crescimento das plântulas (DAVIS; SLACK, 1981; RAMAKRISHNA; RAMAKRISHNA RAO, 2005; RAMAKRISHNA, 2007).

Como a mobilização de reservas tem a finalidade de subsidiar o crescimento e o desenvolvimento da plântula, é essencial que tais processos sejam sincronizados, e isso depende de um sistema de comunicação entre os tecidos de reserva e o embrião, cujos mecanismos parecem ser diferentes daqueles que controlam a germinação (PRITCHARD *et al.*, 2002). Os sinais, nesse caso, são químicos, e normalmente envolvem os níveis internos e o transporte de hormônios, carboidratos e compostos nitrogenados (BUCKERIDGE *et al.*, 2004b).

### **2.2.1. Acúmulo e utilização de lipídios**

As sementes são os principais locais de acúmulo de lipídios, com funções de reserva em plantas. De modo geral, as sementes acumulam lipídios em corpos lipídicos no citoplasma, até mesmo as sementes, que não são oleaginosas, apresentam cerca de 2% do peso compostos por lipídios neutros, enquanto que algumas sementes de oleaginosas podem apresentar até 76 % desses componentes, como para as amêndoas de castanhas de caju (MURPHY; HERNÁNDEZ-PIZÓN; PATEL, 2001).

Os óleos, estocados na forma de triacilglicerol, correspondem a uma das principais fontes de reserva de muitas espécies de plantas, incluindo oleaginosas, como girassol, rabanete, soja e algodão (BAUD *et al.*, 2002). Os triacilgliceróis são sintetizados durante a fase de desenvolvimento do embrião das sementes oleaginosas, acumulando-se durante a fase de maturação das sementes, e logo em seguida são estocados até a sua germinação, sendo posteriormente utilizados como fonte de energia para o desenvolvimento da plântula (CHIA *et al.*, 2005; GRAHAN, 2007). Durante a maturação das sementes, os triacilgliceróis são sintetizados pelo retículo endoplasmático e posteriormente são armazenados em corpos lipídicos (GRAHAN, 2007).

Os lipídios, na forma de triacilgliceróis, são degradados para providenciar carbono e energia durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas, via sucessivas atividades da  $\beta$ -oxidação, ciclo do glioxalato, ciclo do ácido tricarbóxico e gliconeogênese (EASTMOND; GRAHAN, 2001; CHIA *et al.*, 2005).

Consistente com essas observações sobre a degradação de lipídios durante a maturação das sementes, alguns estudos têm indicado que o embrião tem o potencial de degradar os ácidos graxos durante o crescimento, bem como durante a germinação e estabelecimento das plântulas (GRAHAN, 2007).

### **2.2.2. Acúmulo e utilização de carboidratos**

Os principais compostos derivados dos carboidratos, que atuam como reserva em sementes são a sacarose, os oligossacarídeos da série rafínósica, o amido e os polissacarídeos da parede celular (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). A sacarose é uma reserva universal para todas as sementes, enquanto os oligossacarídeos da série rafínósica são abundantes em dicotiledôneas (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

Os polissacarídeos de parede celular ocorrem em alguns grupos taxonômicos, apresentando além das funções de reserva outras funções secundárias, como o controle da absorção e distribuição da água nos diferentes tecidos das sementes (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Os oligossacarídeos da série rafínósica são amplamente encontrados em sementes ortodoxas, que são expostas a períodos constantes de dessecação. Esses oligossacarídeos são degradados logo no início da germinação, e por isso são considerados compostos de reserva. Porém, sua principal função tem sido atribuída à

propriedade das sementes ortodoxas de estabilizarem suas membranas, e com isso, poderem permanecer secas por um longo período, após o qual germinam normalmente (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

A sacarose pode ser acumulada em quantidades apreciáveis em várias partes da semente (cotilédones, endosperma ou eixo embrionário), assim como os oligossacarídeos da série rafínosica. Juntos representam os primeiros compostos a serem mobilizados, antes mesmo que a germinação (emersão da radícula) se complete (BEWLEY; BLACK, 1994; PETERBAUER; RICHTER, 2001).

O amido é uma das principais fontes de reserva de carbono encontradas nas plantas, em termos de quantidade, universalidade de sua distribuição e importância comercial (AMARAL *et al.*, 2007). Ao longo da evolução, tem sido usado não somente como reserva pela própria planta, mas também como fonte de energia para os níveis subsequentes, da cadeia alimentar, nos ecossistemas (ZEEMAN *et al.*, 2004).

O amido é formado por unidades de glucose, constituídos por dois polissacarídeos: a amilose e a amilopectina. (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). A amilose é composta por unidades de glucose, que são conectadas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  (1,4) e a porcentagem de ramificações  $\alpha$  (1,6) é menor que 1% (BALL *et al.*, 1998). A amilopectina é altamente ramificada e possui cadeias de resíduo de glucose ligados entre si por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1,4) com aproximadamente 5%, das ramificações  $\alpha$  (1,6) (MYERS *et al.*, 2000).

### **2.2.3. Acúmulo e utilização de proteínas**

As proteínas de reserva correspondem àquelas que são acumuladas em grandes quantidades durante o processo de maturação das sementes e que são degradadas

durante o processo de germinação, fornecendo nitrogênio na forma de aminoácidos, os quais são precursores de proteínas estruturais e metabólicas e de outros constituintes celulares usados no desenvolvimento da plântula. Essas proteínas são armazenadas em organelas celulares, encontradas no citoplasma das células vegetais de sementes maduras, denominadas de corpos protéicos (RAMAKRISHNA; RAMAKRISHNA; RAO, 2005).

Segundo Osborne (1924), as proteínas de reserva podem ser classificadas segundo a sua solubilidade: em albuminas, proteínas solúveis em água ou em soluções tampões de pH neutro; globulinas, proteínas solúveis em soluções salinas, mas insolúveis em água; glutelinas, proteínas solúveis em soluções diluídas de ácidos e bases, e prolaminas, proteínas solúveis em soluções aquosas de etanol a 70-90%.

As albuminas estão amplamente presentes em sementes de dicotiledôneas, sendo uma das mais abundantes a albumina 2S, que além das funções de reserva, também desempenha funções de defesa (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). As globulinas estão presentes, tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas, dividindo-se em dois grupos: as vicilinas (7-8 S) e as leguminas (11-12 S), que são classificadas dessa forma de acordo com o seu coeficiente de sedimentação (BEWLEY; BLACK, 1994; MUNTZ *et al.*, 2001). As prolaminas estão presentes, principalmente, em cereais e em gramíneas selvagens, nas quais podem se apresentar como metade do nitrogênio armazenado no peso total do grão, sendo reconhecidas pela capacidade de armazenamento de nitrogênio e pelos elevados níveis de resíduo de glutamina e prolina (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). As glutelinas estão presentes no milho, no trigo e em outros cereais, sendo bastante relacionadas com as prolaminas, porém são insolúveis em álcool por conterem resíduos de enxofre (SUDA; GIORGINI, 2000; LIMA *et al.*, 2008).

Durante a maturação das sementes, as proteínas de reservas não são apenas armazenadas nos tecidos de reserva dos cotilédones e mesófilos das dicotiledôneas ou nos endospermas de cereais, mas também no eixo embrionário (MUNTZ *et al.*, 2001). Em todos esses órgãos, a estocagem das proteínas é feita nos corpos protéicos (MUNTZ, 1998).

Em endospermas de cereais e cotilédones de leguminosas, a mobilização das proteínas de reserva se inicia com a protrusão da radícula através do tegumento, quando a germinação conduz ao crescimento da plântula. Entretanto, a biossíntese de proteínas, nos órgãos dos eixos e nos cotilédones das dicotiledôneas, começa muito mais cedo (BEWLEY; BLACK, 1994).

A mobilização das proteínas de reserva é um dos eventos pós-germinativos mais importantes no crescimento e desenvolvimento das plântulas (BEWLEY, 1997). Durante o período de germinação, as proteínas de reserva são degradadas pela ação de um grande número de proteases, que convertem as proteínas de reserva insolúveis em peptídeos solúveis, os quais, por sua vez são hidrolisados a aminoácidos livres e transportados para o eixo embrionário para suportar seu crescimento e também fornecer energia pela oxidação dos esqueletos de carbono (MUNTZ *et al.*, 2001; RAMAKRISHINA, 2007).

Mudanças metabólicas nos compostos de reserva podem ser detectadas durante a germinação das sementes, com o uso de processos histoquímicos apropriados e específicos. Em soja, por exemplo, alterações quantitativas e morfológicas nos corpos protéicos foram detectadas *in situ*, nas células cotiledonares (CORTELAZZO; VIDAL, 1991). Por outro lado, para *Dalbergia miscolobium*, os resultados das análises histoquímicas, sugeriram um padrão similar de eventos para as proteínas e lipídios

durante a germinação e as fases iniciais do crescimento das plântulas (SILVA *et al.*, 1998).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta dos frutos e descrição da área**

Frutos maduros de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.) foram coletados de três plantas adultas de uma área de vegetação da caatinga, do Campo Experimental da antiga Epace, situado na cidade de Crateús-Ce, entre os meses de fevereiro a abril de 2008. A cidade está situada a 5° 10' 42" S e 40° 40' 40" O e a 274 m de altitude em relação ao nível do mar. As suas condições climáticas são: clima tropical quente semi-árido, pluviosidade média de 731,2 mm anuais, temperaturas médias de 26 a 28°C, apresentando períodos chuvosos entre os meses de janeiro a abril (Fonte: IPECE, 2008 e FUNCEME, 2008).

#### **3.2. Obtenção e armazenamento das sementes**

Os frutos de mandacaru foram seccionados longitudinalmente para retirada da sua polpa e obtenção das sementes. Para o desprendimento da mucilagem das sementes, utilizou-se cal hidratada e friccionou-se a sua polpa sobre uma peneira de malha de alumínio. Posteriormente as sementes foram lavadas em água corrente em abundância e postas para secar a sombra por um período de 24 h. Após a obtenção das sementes, estas foram armazenadas em frascos de vidro, contendo sílica gel, sendo mantidas a 8°C.

### **3.3. Experimento 1: Avaliação do efeito de diferentes tipos de luz e temperaturas sobre a germinação de mandacaru**

#### **3.3.1. Local de condução dos experimentos**

Os experimentos para avaliação dos efeitos da luz e temperatura sobre a germinação das sementes de mandacaru foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes (LAS), pertencente ao Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará, durante os meses de abril a julho de 2008, tendo cada experimento duração de 14 dias.

#### **3.3.2. Condições experimentais**

Antes da implementação dos experimentos, as sementes foram previamente tratadas com hipoclorito de sódio comercial a 1% através de duas lavagens de 5 minutos nessa solução, seguidas de lavagens rápidas em água destilada. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar sobre 1 folha de papel germitest, como substrato, umedecida com 5 mL de água destilada, em caixas plásticas tipo gerbox de dimensões de 14 x 14 x 3,5 cm. As caixas foram mantidas em câmaras de germinação do tipo BOD com fotoperíodo de 12/12h, como utilizado por Lone *et al.* (2007).

Para avaliar a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas de mandacaru, aplicaram-se como tratamentos as temperaturas 15, 20, 25, 30 e 35°C e alternadas de (20-30°C) associadas aos de luz: branca, vermelha, vermelho-distante e ausência de luz.

O fornecimento da luz foi obtido por lâmpadas fluorescentes de 20 W, fixadas internamente na porta da BOD, proporcionando uma intensidade de fluxo de aproximadamente  $0,012 \text{ w.m}^{-2}.\text{nm}^{-1}$  (CARDOSO, 1995). Os tipos de luz utilizados

foram: branca, nas quais as caixas gerbox ficaram expostas à luz; ausência de luz, nas quais as caixas gerbox foram cobertas com papel alumínio; vermelha, nas quais as caixas gerbox foram envolvidas com duas folhas de papel celofane de cor vermelha e vermelha-distante, obtidas com a utilização de duas folhas de papel celofane vermelho colocadas externamente às duas folhas de papel celofane azul, conforme indicações de Almeida e Mundstock (2001).

As contagens da germinação foram realizadas diariamente durante o período experimental de 14 dias, sob condições de luz verde de segurança, para evitar a influência da luz na germinação durante as contagens. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam protrusão evidente da radícula.

### 3.3.3. Medidas de germinação e desenvolvimento de plântulas

a) **Índice de velocidade de germinação (IVG)**- foi determinado de acordo com a expressão abaixo proposta por Maguire (1962).

$$IVG = \frac{\sum G_1}{N_1} + \frac{\sum G_2}{N_2} + \dots + \frac{\sum G_n}{N_n} \text{ onde:}$$

IVG = índice de velocidade de germinação

$G_1, G_2, G_n$  = Número de sementes germinadas, sendo esse valor acumulado, ao longo do período de contagem da germinação

$N_1, N_2, N_n$  = Número de dias após a semeadura

O índice de velocidade de germinação é adimensional

b) **Percentagem de germinação (% G)** – Foram determinados os percentuais de germinação aos 7 dias (% G 7), que correspondeu ao pico de germinação para a maioria dos tratamentos e a percentagem de germinação aos 14 dias (% G 14), que correspondeu

ao término da germinação. Essa variável determina a quantidade de sementes germinadas, no tempo de germinação avaliado.

A porcentagem de germinação foi determinada pela expressão desenvolvida por Laboriau (1983).

$$%G = \frac{(\sum n_i)}{N} \times 100, \text{ onde:}$$

% G = Porcentagem de germinação

$\sum n_i$  = Número total de sementes germinadas

N = Número de sementes postas para germinar,

**c) Tempo médio de germinação (TMG)** foi determinado pela expressão desenvolvida por Laboriau (1983).

$$\bar{t} = \frac{\sum (n_i \times t_i)}{\sum n_i}$$

-

t = Tempo médio de germinação, expresso em número de dias

$n_i$  = número de sementes germinadas, em um intervalo de tempo

$t_i$  = intervalo do tempo, expresso em dias

**d) Altura das plântulas (AP) e a massa seca das plântulas (MSP)** - A AP e a MSP foram determinadas utilizando-se 20 plântulas normais de cada uma das 4 repetições por tratamento, retiradas ao acaso, após a finalização do teste de germinação, que corresponderam as medidas de germinação avaliadas. A altura das plântulas normais foi determinada utilizando-se uma régua milimetrada. Posteriormente, esse material foi secado em estufa a 60 °C até atingir temperatura constante, para obtenção da MSP. A AP e a MSP foram expressas em cm/plântula e mg/plântula, respectivamente.

### **e) Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos arranjados em um esquema fatorial do tipo (6 x 4), sendo que o primeiro fator correspondeu às diferentes temperaturas e o segundo fator aos tipos de luz testados. Para cada tratamento foram utilizadas 4 repetições contendo 50 sementes. Os valores médios da porcentagem de germinação foram transformados em arco seno  $(x/100)^{0,5}$  para a realização da análise estatística, sendo, ao final, apresentados os valores médios originais. As médias das variáveis analisadas foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). O software utilizado para a análise estatística foi o SANEST, desenvolvido pelo IAC (Instituto Agrônomo de Campinas).

#### **3.3.4. Descrição da morfologia das sementes e dos estádios de desenvolvimento**

#### **3.3.5. Descrição da morfologia das sementes**

A descrição da morfologia das sementes de mandacaru foi realizada a partir de descrições das características de sementes de plantas pertencentes à ordem Caryophyllales, a qual a família Cactaceae está inserida, realizada por Beltrati (1995). Utilizou-se para essa descrição sementes quiescentes (com e sem tegumento) e sementes apresentando protrusão da radícula. As características das sementes descritas se referiram aos tecidos de reserva, formato, testa, embrião e outras características peculiares das sementes de mandacaru. As descrições foram feitas com o auxílio de uma lupa de mesa e microscópio estereoscópico binocular.

### **3.3.6. Análise morfológica das sementes de mandacaru**

#### **3.3.6.1. Condições experimentais**

Para a descrição da análise estrutural das sementes, foram colocadas para germinar quatro subamostras de 50 sementes, que foram mantidas em BOD a 25°C, com fotoperíodo de 12h. Posteriormente, sementes quiescentes, aos 2, 4 e 6 DAE foram coletadas, para realização dos cortes transversais. Enquanto que para a realização dos cortes longitudinais foram utilizadas sementes no estado quiescentes e aos 4 DAE, sendo utilizada 10 sementes para cada período de germinação avaliado.

#### **3.3.6.2. Fixação e processamento pós-fixação**

As sementes coletadas foram submetidas à fixação em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 1%, em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,2, por 24 h, sendo posteriormente mantidos a 4°C (KARNOVSKY, 1965).

Completado o tempo de fixação em solução de paraformaldeído/glutaradeído, o excesso de fixador foi removido através de três lavagens de 10 min cada, em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2. Logo em seguida, as amostras foram lavadas, rapidamente, com água destilada, por três vezes. Posteriormente, as amostras foram expostas à desidratação em bateria crescente de etanol, iniciando em álcool a 40% e terminando em álcool a 100% de concentração, com duração de 1 h de exposição para cada solução.

Após a desidratação, os cortes foram primeiramente pré-infiltrados por embebição em resina-álcool etílico 1:1 por 24 h. Em seguida, o material foi incluído em

resina pura (Historesin Embedding Kit – Jung). Ao final da preparação do material, foram feitos cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$ , em micrótomo automático Leica RM 2065.

### **3.3.6.3. Coloração com Azul de Toluidina**

O azul de toluidina é um corante metacromático utilizado para detectar radicais aniônicos totais, como componentes da parede celular. A coloração pelo Azul de Toluidina (AT) a 0,025%, pH 4,0, ocorreu durante 15 min, à temperatura ambiente. Seguidamente os cortes foram submetidos à lavagens rápidas em água destilada e secagem ao ar livre (VIDAL, 1977). Ao final, os cortes foram montados entre lâmina e lamínulas, utilizando em entelan.

### **3.3.7. Descrição dos estádios de desenvolvimento**

Para a descrição dos estádios de desenvolvimento das sementes, utilizaram-se quatro subamostras de 80 sementes, as quais foram colocadas para germinar sobre papel germitest e mantidas sob condições de BOD, a 25 ° C e fotoperíodo de 12 h. As sementes foram coletadas nos tempos de germinação de 0, 2, 4, 5, 6, 8 e 12 DAE, sendo cada período correspondente a um estágio de desenvolvimento.

Os aspectos morfológicos descritos foram: semente quiescente, intumescimento da semente, abertura do opérculo, ruptura do tegumento, protrusão da radícula, saída dos cotilédones do tegumento, saída do hipocótilo do tegumento, estabelecimento da postura ereta, esverdeamento dos cotilédones e hipocótilo e surgimento de espinhos entre os cotilédones.

Os caracteres morfológicos foram ilustrados em escala 1:1 (quando necessários foram ampliados e reduzidos). As ilustrações foram feitas manualmente com o auxílio de lupa de mesa e microscópio estereoscópico binocular. As descrições foram feitas de acordo com Barroso *et al.*, (1999) e Beltrati (1995).

### **3.3.8. Experimento 2: Avaliação morfológica e bioquímica da mobilização das reservas das sementes de mandacaru, durante o seu processo germinativo**

Esse experimento teve por objetivo avaliar a mobilização das reservas das sementes de mandacaru durante o processo germinativo, utilizando-se métodos bioquímicos e citoquímicos.

#### **3.3.8.1. Local de condução dos experimentos**

Os experimentos de avaliação da mobilização das reservas das sementes de mandacaru foram conduzidos no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, juntamente com os ensaios bioquímicos, enquanto que as análises citoquímicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular Vegetal, do Departamento de Biologia, ambos pertencentes à Universidade Federal do Ceará.

### **3.3.9. Avaliação da mobilização das reservas por métodos bioquímicos**

#### **3.3.9.1. Condições experimentais**

As sementes de mandacaru, previamente tratadas com hipoclorito de sódio a 1%, foram postas para germinar sobre duas folhas de papel germitest umedecidos com 5 mL de água destilada, em caixas do tipo gerbox, sendo estas mantidas em BOD, sob condições de luz branca, temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro.

Foram utilizadas sementes em sete períodos de germinação: sementes quiescentes e com 2, 4, 5, 6, 8 e 12 DAE. Cada tempo avaliado foi composto por cinco repetições de 100 sementes, sendo coletadas cerca de 30 sementes ou plântulas de cada repetição.

Para as análises bioquímicas, as sementes foram divididas em cotilédones e eixo hipocótilo-radícula, nos tempos de germinação avaliados, sendo posteriormente submetidos à liofilização até a retirada total da água. O pó liofilizado obtido foi utilizado para a determinação da matéria seca das estruturas das sementes, cotilédones e eixo hipocótilo-radícula, e ao final, o material foi armazenado a -20 °C, até a sua posterior utilização.

### **3.3.9.2. Extração e dosagem de lipídios**

A extração lipídica foi realizada a partir de modificações do método proposto por Bligh; Dyer (1959). Os extratos lipídicos foram preparados utilizando-se 15 mg de matéria seca das estruturas das sementes (cotilédones e hipocótilos), aos quais foram acrescidos de 1,5 mL da mistura da solução clorofórmio: metanol na proporção (2:1).

O material foi homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador para eppendorffs e os tubos eppendorffs foram, logo em seguida, com agitação em vortex a cada 5 min, por um período de 30 min, à temperatura ambiente.

Após esse período, o material foi centrifugado a 12000 g por 10 min, e posteriormente o sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos de ensaio. Esse procedimento foi repetido por duas vezes consecutivas e ao final de três extrações, os sobrenadantes obtidos foram juntos e armazenados no mesmo tubo de ensaio.

Posteriormente, foram acrescentados aos extratos lipídicos, 1 mL de água destilada para auxiliar a separação das fases orgânicas e aquosas.

Após a obtenção de uma mistura bifásica, a inferior, que correspondia à fração clorofórmica, foi coletada e armazenada em tubos de ensaio, com pesos determinados previamente. Os tubos com as fases clorofórmicas, contendo os lipídios, foram mantidos a temperatura ambiente ou secados em nitrogênio gasoso, para evaporação do clorofórmio. Ao final do procedimento, os lipídios foram determinados por gravimetria, através do peso dos lipídios obtidos nos tubos de ensaio.

#### **3.3.9.3. Preparação dos extratos etanólicos**

Os extratos etanólicos foram preparados utilizando-se o material remanescente da extração dos lipídios, o qual correspondia inicialmente a 15 mg, sendo a essa massa acrescentada 1,5 mL de etanol a 80%. Esse material foi homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador de eppendorff, sendo em seguida deixados em banho-maria a 75 °C por 1 hora, com agitação em vortex a cada 15 min. Posteriormente, os tubos eppendorffs foram centrifugados a 12000 g por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi submetido ao procedimento citado acima por mais duas vezes, no entanto, a exposição ao banho-maria foi de apenas 30 min. Ao final das três extrações, os sobrenadantes foram reunidos e armazenados a -20 °C, até sua posterior utilização.

#### **3.3.9.4. Determinação dos teores de açúcares solúveis**

Os carboidratos solúveis foram determinados de acordo com Dubois *et al.* (1956). Em uma alíquota de 0,5 mL dos extratos etanólicos, convenientemente diluídos,

foram adicionados 0,5 mL de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso por 10 min. Em seguida, as amostras foram submetidas à quantificação dos carboidratos solúveis por meio de leituras de absorvância em 490 nm, utilizando-se como branco: a mesma mistura de reação contendo água deionizada, em substituição ao extrato. A curva padrão foi obtida utilizando-se a D (+) glicose anidra.

#### **3.3.9.5. Determinação dos açúcares redutores**

Os açúcares redutores foram determinados nos extratos etanólicos descritos no item 3.3.9.3, segundo o método de Miller (1959). Em uma alíquota de 0,3 mL dos extratos etanólicos, convenientemente diluídos, foram adicionados 0,3 mL da mistura de reação (ácido dinitrossalicílico a 1%, fenol a 2% e de sulfito de sódio a 0,05% dissolvido em hidróxido de sódio a 1%). Logo em seguida, a mistura foi agitada vigorosamente e mantida em banho-maria a 85 °C por 15 min. Imediatamente, ao retirarem-se os tubos do banho, adicionaram-se 100 µL da solução de tartarato de potássio a 40%, sendo os tubos vigorosamente agitados.

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada por meio de leituras de absorvância em 575 nm, utilizando-se como branco, água deionizada em substituição ao extrato. A dosagem de carboidratos teve como base a curva padrão de açúcares redutores que foi obtida utilizando-se a D (+) glicose anidra como padrão.

#### **3.3.9.6. Determinação dos açúcares não-redutores**

Os teores dos açúcares não-redutores foram determinados pela diferença entre os açúcares solúveis e os açúcares redutores.

### 3.3.9.7. Extração e determinação de amido

Os extratos para determinação de amido foram preparados utilizando-se o precipitado remanescente da extração dos carboidratos, sendo a esse adicionado 1,5 mL de ácido perclórico a 30% (PCA). Esse material foi homogeneizado com o auxílio de homogeneizador de eppendorff, agitado durante 30 min, com intervalos de 5 min, e em seguida centrifugado a 12000 g a 10°C, por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi submetido ao mesmo procedimento citado acima, por mais duas vezes. Posteriormente, ao final das três extrações, todo o sobrenadante coletado foi reunido e armazenado em vidros a -20° C, até a sua posterior utilização.

A determinação do amido foi feita utilizando-se o reagente da antrona, obtido dissolvendo-se 200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico, de acordo com McReady *et al.* (1950). Para a dosagem, uma alíquota de 1 mL de cada extrato foi convenientemente diluído para resultar na concentração de ácido perclórico em 6,9%, ao qual foi adicionado 1 mL do reagente de antrona. A mistura foi agitada vigorosamente, sendo em seguida mantida a 100° C por 5 min e resfriada em água. Ao final, as amostras foram submetidas à quantificação do amido por meio de leituras de absorbância em 620 nm. A curva padrão de amido foi obtida utilizando-se a D (+) glicose anidra.

### 3.3.9.8. Determinação dos teores de N-aminossolúveis

Os N-aminossolúveis foram determinados de acordo com o método de Yemm; Cocking (1955). Em tubos de ensaios, foram adicionados a 0,5 mL dos extratos etanólicos, convenientemente diluídos, 0,25 mL de tampão citrato a 0,2 M (pH 5,0), 0,5 mL de KCN a 0,2 mM, em metilcelosolve a 100%, e 0,1 mL de ninhidrina a 5%, em

metilcelosolve a 100%. Em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente e colocados em banho-maria a 100°C por 20 min. A reação foi interrompida abruptamente colocando-se os tubos em banho de gelo e, após resfriamento, foram adicionados aos mesmos 0,65 mL de etanol a 60%. Os teores de N-aminossolúveis foram estimados através de leituras de absorbância em 570 nm, com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de glicina.

### **3.3.9.9. Extração e determinação das frações protéicas das proteínas**

As frações protéicas foram obtidas conforme suas solubilidades de acordo com o descrito por Osborne (1924).

Para a extração seqüencial das proteínas de reserva, a 10 mg de matéria seca dos cotilédones ou eixo hipocótilo-radícula, acrescentou-se 1 mL de água destilada, para extração das albuminas. Após maceração e agitação vigorosa durante 20 min, à temperatura ambiente, as amostras armazenadas em tubos de eppendorfs, foram centrifugadas a 12000 g, a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi, então, coletado e o precipitado ressuspendido com o mesmo volume do extrator, repetindo-se por mais duas vezes a extração, centrifugação e coleta dos sobrenadantes.

O precipitado resultante da obtenção das albuminas foi submetido à extração da fração globulínica, em procedimento semelhante ao descrito anteriormente, utilizando como extrator uma solução de cloreto de sódio a 5%. O mesmo ocorreu para as extrações da prolamina e glutelina, utilizando como extratores o etanol a 70% e NaOH a 0,4%, repectivamente (SUDA; GIORGINI, 2000). Ao final da obtenção dos extratos, estes foram armazenados a -20°C, até sua posterior utilização.

A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o reagente Comassie Blue G-250. Em uma alíquota de 0,1 mL de cada extrato das frações protéicas, devidamente diluídos, foram adicionados 1 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada vigorosamente e mantida à temperatura ambiente para que ocorresse a reação durante 15 min, sendo posteriormente, as leituras realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, tendo como referência uma curva padrão utilizando a albumina sérica bovina (BSA).

As proteínas totais foram determinadas pela soma das várias frações protéicas, nos correspondentes períodos de germinação avaliados.

#### **3.3.9.10. Delineamento experimental e análise dos dados**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, tendo como tratamentos, os tempos de germinação e os diferentes teores de reserva das sementes analisados.

Os valores médios dos tratamentos foram obtidos a partir de quatro repetições, sendo cada repetição dosada em triplicata. As médias obtidas foram submetidas à análise de variância (teste F), utilizando-se o software SANEST/ IAC-Campinas desenvolvido por Zonta (1984), realizando-se análise de regressão para o ajustamento da média aos modelos apropriados.

Os teores das substâncias de reserva foram expressos em mg/ g de MS de semente (cotilédone ou eixo hipocótilo-radícula).

### **3.3.10. Padrões eletroforéticos das frações protéicas das proteínas de sementes de mandacaru**

O método utilizado para eletroforese unidimensional, sob condições desnaturantes, na presença de SDS (PAGE-SDS), foi o desenvolvido por Laemmili (1970). Amostras de cada um dos extratos das frações protéicas de albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas, obtidas como o descrito no item 3.3.9.9, foram precipitadas com acetona na proporção de 1:4, à temperatura de -20 °C, durante 24 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12000xg por 10 min, sendo a acetona descartada. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em tampão da amostra composto por 0,125 M de TRIS-HCl, a pH 6,8, SDS a 10%, glicerol a 20%, azul de bromofenol a 0,02%, e mercaptoetanol a 5% e logo em seguida aquecidos a 100°C por 5 min. Em seguida, 20 µL dos extratos, contendo 12 µg de proteína, foram aplicadas nos poços com auxílio de pipeta automática.

O gel de aplicação das amostras foi preparado com acrilamida a 4% em tampão TRIS-HCl a 0,5 M a pH 6,8, SDS a 10% e persulfato de amônio a 10%. A eletroforese foi conduzida em gel de separação com acrilamida a 10% em TRIS-HCl a 1,5M, pH a 8,8, SDS a 10% e persulfato de amônio a 10%. A solução tampão de corrida foi preparada com Tris a 0,025 M, Glicina a 0,192 M e 0,1% de SDS. A separação das proteínas foi realizada à temperatura ambiente, com polaridade normal, sob voltagem constante de 200 V.

A corrida da eletroforese começou com a corrente de 20 mA, e após a amostra ter penetrado completamente no gel de aplicação (aproximadamente meia hora), esta foi modificada para 40 mA. Considerou-se terminada a corrida quando o corante azul de bromofenol chegou próximo ao final do gel de separação.

Para revelação das bandas protéicas, o gel de separação foi submetido à solução de fixação, contendo Comassie Brilliant Blue R250 (Sigma@), metanol a 40% e ácido acético a 7%, durante 1 h, sob agitação constante em agitador de mesa. Ao final desse tempo, o gel foi exposto à solução descorante contendo apenas metanol: ácido acético nas mesmas proporções citadas acima, deixando-o em agitação por 30 min. Em seguida, o gel foi deixado na solução descorante composta por metanol a 10% e ácido acético a 4%, na qual permaneceu por uma noite. Ao final, o gel foi mantido em água até serem escaneados, para serem avaliados.

### **3.3.11. Avaliação da mobilização das reservas por métodos citoquímicos**

#### **3.3.11.1. Condições experimentais**

As sementes de mandacaru, previamente tratadas com hipoclorito de sódio a 1%, foram postas para germinar sobre duas folhas de papel germitest umedecidos com água destilada, em caixas do tipo gerbox, sendo mantidas em BOD, sob condições de luz branca a 25°C e fotoperíodo de 12 h, durante sete dias.

Para obtenção do material, foram utilizadas 5 caixas com 100 sementes, sendo retiradas 3 sementes diariamente, para cada período de germinação avaliado, juntamente com a semente no estado quiescente.

A fixação e os processos de pós-fixação foram realizados, de acordo com o item 3.3.6.2 em secções transversais das sementes quiescentes e embebidas aos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 DAE.

### **3.3.11.2. Colorações**

#### **3.3.11.2.1. Xylidine Ponceau (XP)**

Um dos corantes utilizados para a coloração dos tecidos foi o Xylidine Ponceau (XP) a 0,1% pH 2,5, que é um corante utilizado para detectar proteínas, devido a sua capacidade de se ligar a radicais catiônicos totais (VIDAL, 1970).

A solução de XP a 0,1% foi preparada em ácido acético glacial a 3%, sendo o seu pH ajustado para 2,5. A coloração com XP foi realizada durante 15 min a temperatura ambiente, seguindo-se de lavagem em solução de ácido acético a 3%, por 15 min, e duas lavagens rápidas em água destilada, secagem ao ar e montagem em entellan (CORTELAZZO; VIDAL, 1991).

#### **3.3.11.2.2. Reação do PAS (Periodic Acid-Schiff)**

A reação de PAS permite a detecção de polissacarídeos neutros, sendo utilizado para detecção de amido e polissacarídeos da parede celular (MAIA, 1979). Os cortes foram oxidados com ácido periódico 0,5%, durante 9 min, lavados em água destilada e secados levemente. Em seguida, os cortes foram colocados em reativo de Schiff por 30 min, à temperatura ambiente e no escuro. Então, foram lavados com água sulfurosa, composta de água destilada, HCl e metabissulfito de sódio a 10% na proporção 18:1:1, respectivamente, sendo realizados três banhos de 3 min cada. Ao final, os cortes foram montados em entellan.

### **3.3.11.2.3. Reação com Lugol**

A reação com Lugol é utilizada para detecção de amido, apresentando como resultado positivo a identificação de grânulos de amido com uma coloração azul-negra ou marrom muito escuro (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

A solução de lugol foi preparada utilizando 10 g de iodeto de potássio e 10 g de iodo para o volume final de 100 mL. Após a preparação da solução, pingou-se 1 gota da solução de lugol sobre os cortes, após o tempo de 5 minutos.

### **3.3.11.2.4. Reação com Sudan IV**

O reagente Sudan IV detecta a presença de corpos lipídicos, de acordo com método proposto por Gerlach (1984). Para a reação com Sudan IV, foram feitos cortes à mão livre de materiais frescos, e logo em seguida foram colocados em etanol a 70%. Os cortes foram transferidos para vidro de relógio, onde se aplicou o Sudan IV a 2% dissolvido em etanol a 92%, de forma a recobrir os cortes, deixando-o reagir por 20 min. O vidro de relógio foi mantido coberto para evitar a evaporação. Em seguida, os cortes foram lavados em etanol a 90% e montados entre lâminas e lamínulas, sendo retirado o excesso de etanol antes da observação em microscópio óptico.

### **3.3.11.2.5. Observação dos cortes histológicos**

Os cortes preparados com as diferentes colorações foram observados em microscópio óptico em aumento de 400 vezes, sendo fotografados em câmaras acopladas com os aumentos apropriados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise da germinação

#### 4.1.1. Medidas de IVG e TMG

A tabela 1 mostra a análise de variância das médias do índice de velocidade de germinação (IVG) e do tempo médio de germinação (TMG), tendo sido verificadas interações significativas entre os fatores luz e temperatura, a nível de 1 % de probabilidade.

**Tabela 1** – Resumo da análise de variância para os efeitos das diferentes temperaturas e tipos de luz nos parâmetros germinativos, IVG e TMG, das sementes de mandacaru.

Fonte de variação	g.l	Q.M (característica)	
		IVG	TMG
Temperatura (A)	5	195,65**	246,09**
Luz (B)	3	46,30**	18,58**
Int AxB	15	11,59**	5,98**
Resíduo	72	0,57**	2,17**
C.V(%)		17,17	30,68

\*\* Significância ao nível de 1% de probabilidade.

Os maiores valores de IVG foram observados nas condições de luz branca associada às temperaturas de 25°C (10,24) e 30°C (10,46) e luz vermelho-distante a 25 °C (9,49), os quais podem ser observados na Tabela 2. Analisando-se a condição ausência de luz, os maiores valores foram observados nas temperaturas alternadas de 20-30°C (5,74) e 25°C (4,69), já para a condição de luz vermelha, os maiores valores dessa variável foram observados nas temperaturas de 25°C (8,63) e 30°C (7,89). Por outro lado, nas temperaturas extremas a 15 e 35°C, esses valores foram nulos, tendo em vista que não foram observadas germinação nessa condição (Tabela 2).

**Tabela 2** – Valores médios do índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.) sob diferentes tipos de luz e temperatura.

Índice de velocidade de germinação (IVG)				
Temperaturas	Tipos de Luz			
	Branca	Ausência de luz	Vermelha	Vermelho-distante
15°C	0 dA	0 cA	0 dA	0 dA
20°C	5,55 bA	3,34 bB	6,01 bcA	5,70 bA
20-30°C	8,19 bA	5,74 aB	5,88 cB	7,63 abA
25°C	10,24 aA	4,69 abC	8,63 aB	9,49 aAB
30°C	10,46 aA	1,01 cD	7,89 abB	4,44 cC
35°C	0 dA	0 cA	0 dA	0 dA

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam as temperaturas e as maiúsculas os tipos de luz.

Concordando ao presente experimento, Lone *et al.*(2007), em seus estudos com a cactácea *Melocactus bahienses*, obtiveram maiores percentuais de germinação e valores de IVG na temperatura de 25 °C, enquanto os menores valores foram observados a 20 e 30°C. Por outro lado, Menezes *et al.* (2004), verificaram o aumento do IVG com o incremento da temperatura em *Salvia splendens* Selow, porém não observaram diferenças significativas no IVG, nas temperaturas de 20 e 25°C.

O aumento do IVG, acompanhando o incremento da temperatura, foi concordante com os resultados obtidos por Carvalho; Nakagawa (2000), que observaram que a germinação será tanto mais rápida e o processo mais eficiente, quanto maior a temperatura, dentro de certo limite. Com relação à luz, muitos autores têm verificado que os efeitos das diferentes qualidades de luz dependem da temperatura de incubação a que as sementes são submetidas, indicando a participação do fitocromo no controle da germinação das sementes (TAKAKI, 2001; FERRAZ-GRANDE; TAKAKI, 2006).

Os valores médios da variável TMG estão apresentados na Tabela 3, sendo os maiores valores verificados para a temperatura de 20°C associada aos quatro tipos de luz analisados: branca (9,23 dias), ausência de luz (10,63 dias), vermelha (8,85 dias) e vermelho-distante (9,15 dias). Os menores valores da variável IVG foram observados na temperatura alternada de 20-30°C (5,24 dias), 25°C (4,83 dias), 30°C (4,43 dias) para luz branca e luz vermelho-distante na temperatura a 25°C (5,15 dias), enquanto que, nas temperaturas extremas a 15 e 35°C, os valores foram nulos, já que a germinação foi totalmente inibida.

**Tabela 3** – Valores médios do tempo médio de germinação em dias das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), sob diferentes tipos de luz e temperatura.

Tempo médio de germinação (TMG) (dias)				
Temperaturas	Tipos de Luz			
	Branca	Ausência de luz	Vermelha	Vermelho - distante
15°C	0 cA	0 cA	0 cA	0 cA
20°C	9,23 aA	10,63 aA	8,85 aA	9,15 aA
20-30°C	5,25 bB	8,86 abA	6,61 aAB	5,73 abAB
25°C	4,83 bB	9,94 abA	6,53 aAB	5,15 bB
30°C	4,43 bB	6,24 bAB	8,94 aA	6,19 abAB
35°C	0 cA	0 cA	0 cA	0 cA

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste F ( $p < 0,01$ ). Letras minúsculas representam as temperaturas e as maiúsculas os tipos de luz.

Analisando-se a condição de temperatura alternada 20-30°C, os maiores valores foram associados à luz vermelha (6,61 dias), vermelho-distante (5,73 dias) e a ausência de luz (8,86 dias). Para a temperatura de 25°C, os maiores valores foram observados na condição de ausência de luz (9,94 dias) e luz vermelha (6,53 dias), e para temperatura de 30 °C associada às luzes: vermelha (8,94 dias) e vermelho-distante (6,19 dias).

Também, como observado na Tabela 3, temperaturas baixas e ausência de luz prolongam o início da germinação das sementes de mandacaru, aumentando o TMG, indicando que essas condições podem afetar as reações metabólicas envolvidas nesse processo e que, por outro lado, temperaturas mais elevadas e a presença de luz estimulam o início da germinação.

Concordando com os resultados obtidos no presente experimento, De La Barrera e Nobel (2003), em seu estudo com a cactácea *S. queretaroensis*, observaram que o início da germinação foi acelerado por altas temperaturas, sendo que os menores tempos necessários, para o início da germinação, foram verificados nas temperaturas 25/ 25°C constante e 35/25°C e 45/55°C, alternadas. Da mesma forma, Araújo Neto *et al.* (2003), avaliando a germinação das sementes de acácia, também observaram maior TMG para a menor temperatura utilizada (15°C), sendo a melhor condição observada para a germinação a temperatura de 25°C.

O tempo médio de germinação pode fornecer tanto informações quanto as vias metabólicas envolvidas no processo germinativo, como pode permitir a realização de inferências sobre estratégias de germinação de diferentes espécies sob diferentes condições ambientais (FERREIRA; BORGUETTI, 2004).

#### **4.1.2. Germinação (%)**

Na tabela 4, é apresentada a análise de variância dos percentuais de germinação aos 7 dias (% G7) e aos 14 dias (% G14 ), sendo observadas interações significativas entre os fatores luz e temperatura, a nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

**Tabela 4** – Resumo da análise de variância para os efeitos das diferentes temperaturas e tipos de luz nos parâmetros germinativos, % G14 e % G7, das sementes de mandacaru.

Fonte de variação	g.l	Q.M (característica)	
		% G14	% G7
Temperatura (A)	5	26351,54 **	15478,84 **
Luz (B)	3	3493,60 **	4938,84 **
Int AxB	15	920,70 **	1370,07 **
Resíduo	72	98,24	118,90
C.V(%)		19,35	32,22

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

A análise dos percentuais de germinação aos 7 dias (Tabela 5), mostra que nesse período, alguns tratamentos já alcançaram o máximo de germinação, enquanto outros alcançaram 50,00 % da germinação.

**Tabela 5** – Valores dos percentuais de germinação aos 7 dias, das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), sob diferentes tipos de luz e temperatura.

Temperaturas	Percentagem de germinação aos 7 dias (%)			
	Tipos de Luz			
	Branca	Ausência de luz	Vermelho	Vermelho distante
15°C	0 dA	0 cA	0 cA	0 dA
20°C	16,50 cAB	9,25 bcB	33,50 bA	21,00 cAB
20-30°C	60,50 bA	28,50 abB	37,00 bB	72,50 bA
25°C	90,00 aA	26,50 aB	92,50 aA	95,00 aA
30°C	89,50 aA	8,50 abcC	78,50 aA	45,00 cB
35°C	0 dA	0 cA	0 cA	0 cA

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam as temperaturas e as maiúsculas os tipos de luz.

Os maiores valores percentuais aos 7 dias (% G7) foram observados nas temperaturas de 25°C associadas às luzes branca (90,00%), vermelha (92,5%) e vermelho-distante (95,00%) e na temperatura de 30°C associada às condições de luz branca (89,50%) e vermelha (78,50%). Resultados concordantes foram observados por

Andrade *et al.*, (2005) que relataram que as sementes da cactácea *Hylocereus undatus* apresentam alto percentual de germinação a 25°C, atingindo um máximo em um período de 7 dias de embebição.

Os valores percentuais, de germinação aos 14 dias (Tabela 6), variaram em função da temperatura e dos diferentes tipos de luz analisados, não sendo observada germinação nas temperaturas de 15°C e 35°C.

**Tabela 6** – Valores dos percentuais de germinação aos 14 dias (% G14) das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), sob diferentes tipos de luz e temperatura.

Percentagem de germinação aos 14 dias (% G14)				
Temperaturas	Tipos de Luz			
	Branca	Ausência de luz	Vermelha	Vermelho-distante
15°C	0 cA	0 cA	0 dA	0 dA
20°C	97,00 aA	69,50 aA	99,50 aA	99,50 aA
20-30°C	64,50 bB	58,00 aB	65,00 cAB	82,00 bA
25°C	93,50 aA	57,00 aB	97,00 abA	98,00 aA
30°C	89,50 aA	13,00 bC	88,00 bA	50,50 cB
35°C	0 cA	0 cA	0 dA	0 cA

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey. Letras minúsculas representam as temperaturas e as maiúsculas os tipos de luz.

Os maiores percentuais de germinação aos 14 dias foram verificados nas temperaturas de 20°C associadas às luzes branca (97,00%), vermelha e vermelho-distante (99,00%), 25°C associadas à luz branca (93,50%), vermelha (97,00%) e vermelho-distante (97,00%) e 30 °C associado à luz branca (89,50%) e luz vermelha (88,00%). Verificou-se também que, sob condição de ausência de luz, os maiores % G 14 foram observados nas temperaturas constantes de 20°C (69,50%) e 25°C (57,00%) e alternada de 20-30 °C (58,00%). Por outro lado, o menor percentual de germinação foi observado na condição de ausência de luz associado a 30°C (13,00%).

Nobel *et al.* (1988) descreveram que as sementes de cactus toleram amplas variações de temperaturas, como a maioria das espécies de habitats tropicais, sendo a faixa mais favorável para a germinação as temperaturas de 17 a 34°C, com valores ótimos em torno de 25°C (ROJAS-ARÉCHIGA *et al.*, 1997; ROJAS-ARÉCHIGA; VÁSQUEZ-YANES, 2000). Entretanto, alguns trabalhos têm mostrado que as temperaturas favoráveis à germinação das cactáceas estão entre 20 e 30°C, como para as cactáceas *Stenocereus stellatus* (ROJAS-ARÉCHIGA; CASAS; VÁSQUEZ-YANES, 2001) e *Stenocereus queretaroensis* (DE LA BARRERA; NOBEL, 2003).

Por outro lado, Simão *et al.* (2007) avaliando a germinação das sementes de *Hylocereus setaceus* (Salm-Dick ex DC), observaram que sob condição de luz branca, houve germinação em uma ampla faixa de temperatura, variando entre 15 e 40°C, chegando ao máximo a 100% a 25°C, resultados que também corroboram com os observados presente estudo.

É interessante salientar que a capacidade das sementes de mandacaru germinar, mesmo na ausência de luz, indica que essas sementes não são fotoblásticas positivas, ou seja, não requerem a luz para germinar, ao contrário do observado por Benítez-Rodríguez *et al.* (2004) que em seus estudos com quatro espécies de Mammillaria, verificaram que todas elas dependiam da luz para germinar.

Alguns estudos com cactáceas têm mostrado uma relação entre o fotoblastismo e a forma de vida dessas plantas. As sementes dos cactus colunares se mostram indiferentes à luz, enquanto que as sementes dos cactus globosos são normalmente fotoblásticas positivos (ROJAS-ARÉCHIGA; VÁSQUEZ-YANES, 2000). Essas informações foram comprovadas no presente estudo, onde as sementes de mandacaru, que é um cacto do tipo colunar, mostraram-se indiferentes à luz, por terem germinado mesmo na condição de ausência de luz. Entretanto, verificou-se que nesse tratamento, a

germinação foi bastante reduzida, enquanto que na presença de luz, este processo foi positivamente estimulado.

De forma semelhante ao presente estudo, em trabalho anterior realizado com *Cereus jamacaru* D.C, Prisco (1966) observou em estudo sobre a ação da luz na geminação de mandacaru, que as sementes eram sensíveis à luz, porém a ausência de luz não prevenia a ocorrência total do processo de germinação.

No presente estudo, a combinação dos fatores luz e temperatura estimularam a germinação das sementes de mandacaru, principalmente nas temperaturas entre 20 e 30 °C e alternada 20-30°C associadas a luz branca, vermelha e vermelho-distante, sendo observados os maiores percentuais de germinação a 25°C.

Os resultados de germinação aqui apresentados também foram concordantes com os de Rojas-Aréchiga; Orozco-Segovia; Vásquez-Yanes (1997), que observaram a germinação das cactáceas *Pachycereus hollianus*, *Cephalocereus chrysacanthus* e *Neobuxbaumia tetzo*, sob diferentes tratamentos de luz (branca, ausência de luz, vermelho e vermelho-distante).

#### **4.1.3. Medidas de crescimento**

Na tabela 7, apresenta-se a análise de variância dos valores médios para a altura das plântulas (AP) e matéria seca das plântulas (MSP), sendo observadas interações significativas entre os fatores luz e temperatura, pelo teste F ( $p < 0,01$ ).

Os valores médios para AP podem ser observados na tabela 8. Os maiores valores para essa variável foram observados na condição de temperatura alternada 20-30°C associada às luzes: vermelha (2,04 cm) e vermelho-distante (2,12 cm) e na temperatura de 25°C na ausência de luz (2,46 cm).

**Tabela 7** – Resumo da análise de variância para os efeitos das diferentes temperaturas e tipos de luz sobre as variáveis: altura (AP) e matéria seca (MSP) das plântulas de mandacaru, após os 14 dias de embebição.

Fonte de variação	g.l	Q.M (característica)	
		AP	MSP
Temperatura (A)	5	11,63 **	$1,8 \times 10^{-5}$ **
Luz (B)	3	0,53 **	$7 \times 10^{-7}$ **
Int AxB	15	0,23 **	$5 \times 10^{-7}$ **
Resíduo	72	0,24	$1 \times 10^{-8}$
C.V(%)		14,81	16,82

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

**Tabela 8** – Valores médios da altura das plântulas (AP) de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.) após 14 dias de embebição, sob diferentes tipos de luz e temperatura.

Temperaturas	Altura das plântulas (cm)			
	Tipos de Luz			
	Branca	Ausência de luz	Vermelha	Vermelho-distante
15°C	0 dA	0 dA	0 dA	0 cA
20°C	1,23 bB	1,43 cAB	1,23 cB	1,55 bA
20-30°C	1,74 aB	1,92 bAB	2,04 aA	2,12 aA
25°C	1,43 abB	2,46 aA	1,69 bB	1,44 bB
30°C	0,83 cC	1,58 cA	1,58 bA	1,17 abB
35°C	0 dA	0 dA	0 dA	0 cA

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey.

Letras minúsculas representam as temperaturas e as maiúsculas os tipos de luz.

Dados concordantes com relação a AP observadas foram obtidos por Lone *et al.* (2007), que em seu estudo com a cactácea *Melocactus bahiensis* obtiveram menores médias de AP na temperatura de 20°C, no substrato papel, enquanto que nas temperaturas de 25 e 35°C não foram verificados diferenças significativas nesses tratamentos. Da mesma forma, Menezes *et al.* (2004) observaram maiores valores de altura das plântulas de *Salvia splendens* Sellow na temperatura de 25°C associada à luz branca.

Com relação à massa seca das plântulas (Tabela 9), os maiores valores dessa variável foram observados no tratamento de temperatura alternada (20-30°C) para as condições de luz branca ( $3,1 \times 10^{-3}$  g), ausência de luz ( $2,8 \times 10^{-3}$  g) e vermelho ( $3,1 \times 10^{-3}$  g) e na temperatura de 30°C na condição de luz vermelho-distante ( $2,4 \times 10^{-3}$  g).

Discordando do presente experimento, Menezes *et al.* (2004) observaram pequenas alterações nos valores de matéria seca das plântulas de *Salvia splendens* Sellow, para as temperaturas de 20 e 25°C, entretanto o maior valor dessa variável foi obtida para o tratamento de luz branca associada à temperatura de 20°C.

**Tabela 9** – Valores médios da matéria seca das plântulas (MSP) de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.) após 14 dias, sob diferentes tipos de luz e temperatura.

Temperaturas	Massa seca das plântulas (g)			
	Tipos de Luz			
	Branca	Ausência de luz	Vermelha	Vermelho distante
15 °C	0 cA	0 dA	0 cA	0 cA
20 °C	$1,4 \times 10^{-3}$ bA	$1,0 \times 10^{-3}$ bcB	$1,2 \times 10^{-3}$ cA	$1,2 \times 10^{-3}$ bA
20-30 °C	$3,1 \times 10^{-3}$ aA	$2,8 \times 10^{-3}$ aAB	$3,1 \times 10^{-3}$ aA	$2,6 \times 10^{-3}$ aB
25 °C	$1,5 \times 10^{-3}$ bA	$1,4 \times 10^{-3}$ bA	$1,5 \times 10^{-3}$ cA	$1,3 \times 10^{-3}$ bA
30 °C	$1,5 \times 10^{-3}$ bB	$8 \times 10^{-4}$ cC	$2,7 \times 10^{-3}$ bA	$2,4 \times 10^{-3}$ aA
35 °C	0 cA	0 dA	0 dA	0 cA

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey.

Letras minúsculas representam as temperaturas e as maiúsculas os tipos de luz.

## 4.2. Descrição morfológica e dos estádios de desenvolvimento

### 4.2.1. Análise estrutural das sementes

A análise estrutural das sementes de mandacaru foi realizada nas células dos cotilédones e do eixo embrionário utilizando a coloração com o Azul de Toluidina (AT).

O AT é um corante catiônico metacromático, que apresenta afinidade por substratos

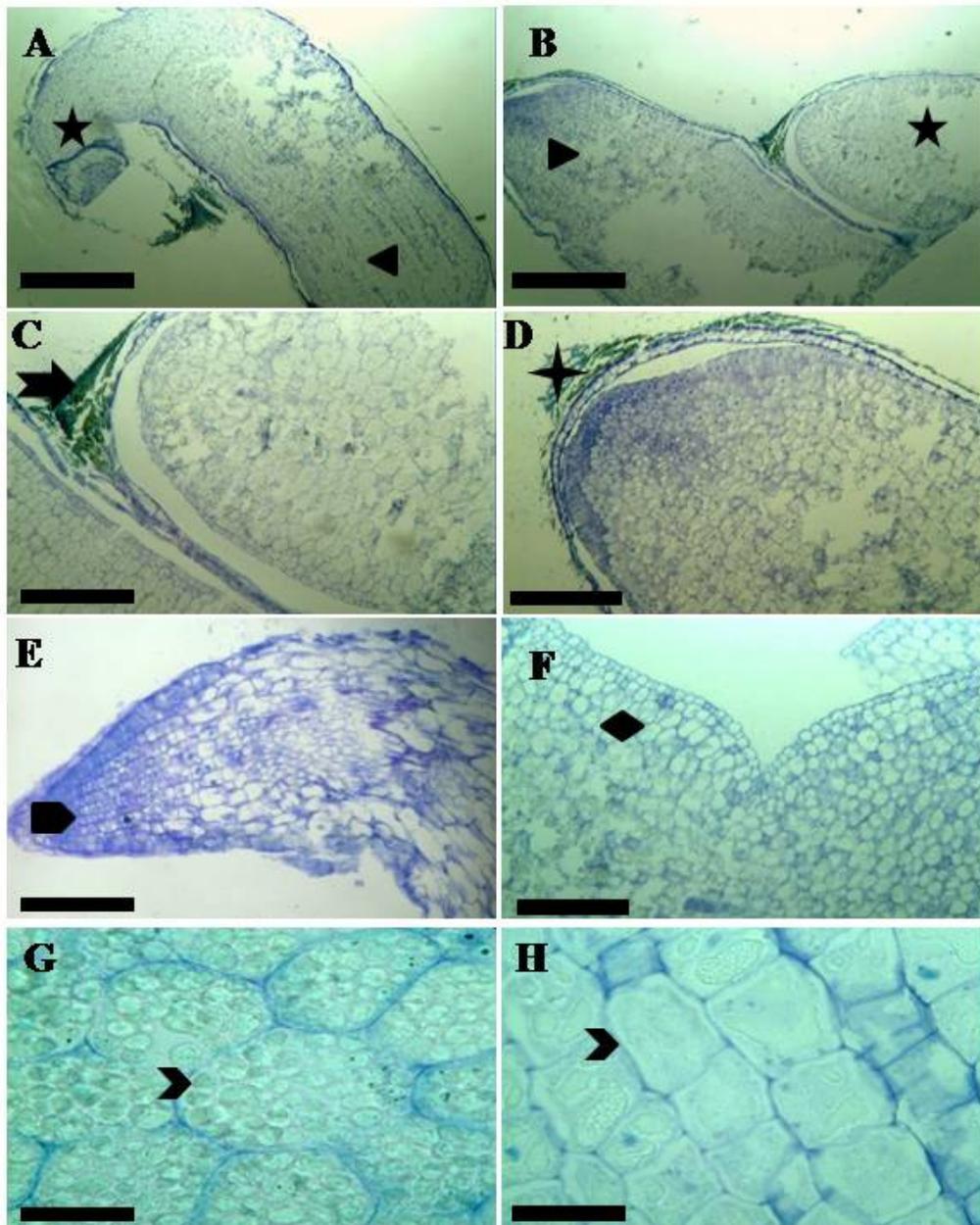
aniônicos, com a capacidade de revelar a presença dessas cargas no citoplasma e na parede celular.

A coloração com azul de toluidina foi utilizada para a análise da morfologia interna da semente inteira, em cortes longitudinais e transversais, nos quais foram verificados padrão semelhante de coloração em toda extensão da semente de mandacaru (Figuras 1 e 2). Observou-se que tanto as células dos cotilédones como as do eixo hipocótilo-radícula apresentavam também paredes finas, não havendo distinção entre os dois tecidos (Figura 1 A, B, G e H). Todavia, foram detectadas diferenças no formato das células cotiledonares e do eixo hipocótilo-radícula (Figura 1 G e H).

Nas figuras 1A e 1B, pode-se observar o formato da semente de mandacaru e as diferenças existentes entre as estruturas: cotilédones e eixo hipocótilo-radícula. Verificou-se também, nos cortes longitudinais, a coloração do perisperma, tecido de reserva remanescente da formação das sementes, entre os cotilédones e a região hipocótilo-radícula (Figura 1 A, B e C).

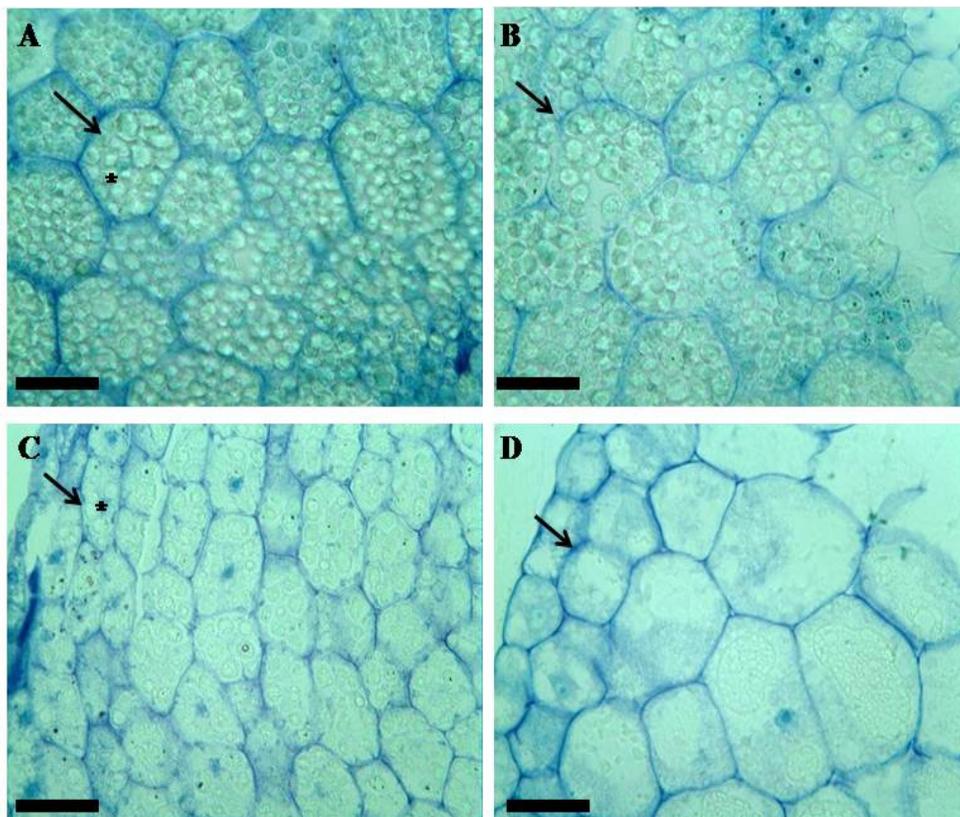
Nos cortes da região cotiledonar foram observadas células mais arredondadas e a detecção de inúmeros glóbulos translúcidos (Figura 1 G), enquanto que na região do hipocótilo-radícula, as células apresentavam um formato irregular (Figura 1 H). Nas regiões da extremidade do hipocótilo, que corresponde ao local do início do desenvolvimento e protrusão da radícula, evidenciou-se a presença de grande quantidade de núcleos corados pelo azul de toluidina (AT), indicando que essa região está em crescimento e em intensa divisão celular (Figura 1 E).

A coloração com azul de toluidina também revelou paredes celulares finas das células cotiledonares de *Copaifera langsdorfii* e *Moringa oleifera*, devido a presença de pectina, como foi verificado por Gallão; Damasceno; Sousa (2006) e Guerra; Medeiros-Filho; Gallão (2006), respectivamente.



**Figura 1** – Análise estrutural das sementes de mandacaru, coradas com Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0. Seções transversais das sementes em A, B,C, D e E. Visão geral do embrião evidenciando as estruturas: cotilédones e eixo hipocótilo-radícula (A e B). Região intermediária entre o cotilédone e o hipocótilo, com destaque para o perisperma corado em verde (C). Região posterior do eixo hipocótilo-radícula, apresentando resquício de tegumento (D). Destaque para região com protrusão da radícula,apresentando células com intensa divisão celular (E). Seção transversal do embrião aos 7 DAE. Seção transversal das sementes aos 7 DAE, evidenciando células cotiledonares (G) e região do eixo hipocótilo-radícula (H). (★) Cotilédone, (►) eixo hipocótilo-radícula, (⇨) perisperma, (⋈) região posterior ao eixo hipocótilo-radícula, (◼)protrusão da radícula, (◆) embrião aos 7 DAE, (◻) parede celular corada em azul. Barra em A e B corresponde a 250  $\mu$ m, Barra em C, D, E, F corresponde a 100  $\mu$ m e em G e H a 50 $\mu$ m.

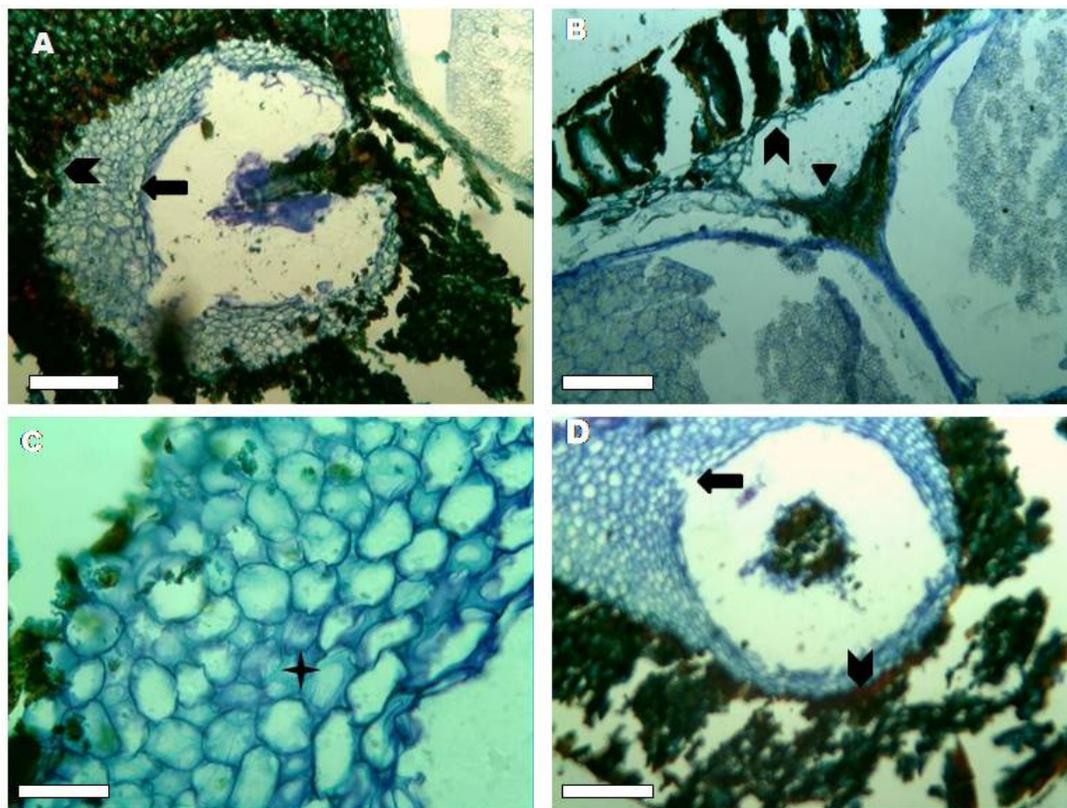
Na análise dos cortes longitudinais das sementes de mandacaru, a coloração com o azul de toluidina (AT) revelou a presença de paredes celulares finas, coradas em azul, indicando a presença de pectina (Figura 2).



**Figura 2** – Seções transversais da semente de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), em diferentes períodos de germinação, coradas com Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0. semente quiescente (A), 2 DAE (B), 4DAE (C) e 6 DAE (D) ( → ) Parede celular corada em azul, ( \* ) corpúsculos translúcidos. Barra: 25  $\mu$ m.

O citoplasma dessas células apresentou a presença de glóbulos translúcidos, em grande quantidade, que possivelmente correspondiam aos corpos protéicos ou lipídicos, ou grânulos de amido, que não foram corados pelo AT (Figura 2A). Ao longo do tempo de germinação analisado, não foram observadas diferenças nas células e na espessura de sua parede pela coloração com AT (Figura 2 A, B, C e D).

Na figura 3, pode-se observar seções transversais das sementes de mandacaru, nas quais foram verificadas a reação de metacromasia do corante azul de toluidina (AT) com as células do tegumento, pelo fato desse tecido ter se apresentado esverdeado.

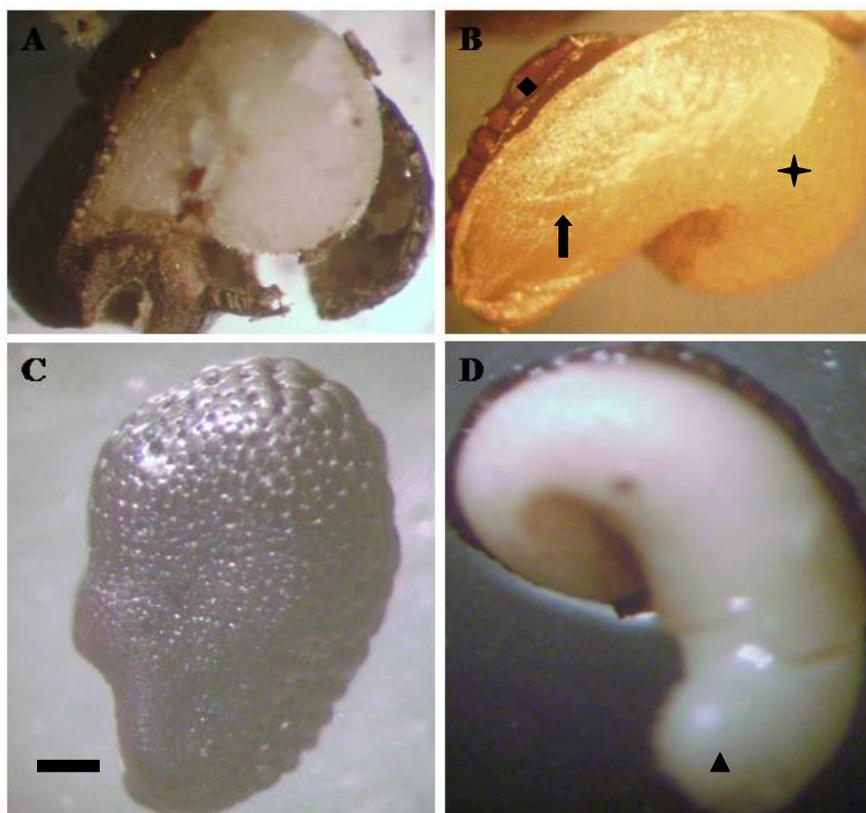


**Figura 1** – Cortes transversais de sementes de mandacaru com 4 DAE, coradas com azul de toluidina a pH 4,0. Visão das estruturas das sementes envoltas pelo tegumento corado em verde (A, B e D). Células do embrião (C). (▲) Tegumento, (↔) células do embrião, (✦) parede celular corada em azul Barra: 25 μm.

#### 4.2.2. Descrição morfológica das sementes

A descrição morfológica da semente de mandacaru foi realizada conforme Beltrati (1995). A análise mostra que a semente é exalbuminosa, sendo o seu formato

ligeiramente obovado-oblíqua, a testa é rugosa e se localiza na região lateral do embrião (Figura 4).



**Figura 2** – Sementes de mandacaru vistas na lupa. Semente quiescente recoberta parcialmente pelo tegumento (A), sementes quiescente desnuda (B), semente quiescente com tegumento (C), semente apresentando início da protrusão da radícula aos 5 dias após a embebição (DAE) (D). (★) cotilédone, (➡) eixo hipocótilo-radícula, (◆) vestígio do tegumento, (▲) início da protrusão da radícula. Barra corresponde a aproximadamente 1 cm, aumento é de aproximadamente 20 x.

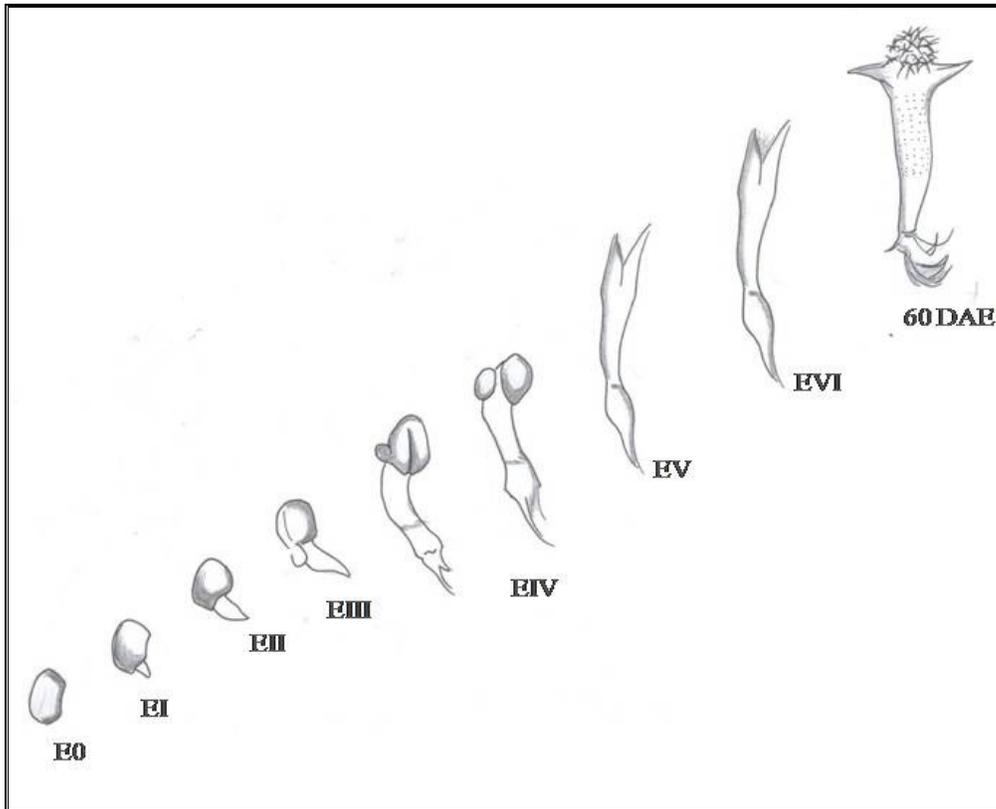
As sementes são camilótropas, exotestais, bitementadas, endospermicas e com embrião bem desenvolvido. O embrião é periférico, cilíndrico e grande, ocupando quase todo o espaço da semente, sendo em parte, contíguo à testa e freqüentemente curvados, os cotilédones são plano-convexos estreitos e expandidos (Figuras 4).

#### 4.2.3. Descrição dos estádios de desenvolvimento das sementes

Durante o período de avaliação da germinação das sementes de mandacaru foram caracterizados 7 estádios de desenvolvimento, baseando-se em diferenças morfológicas observadas nos períodos de germinação avaliados (Figura 5).

O estágio 0 (E0) corresponde as sementes quiescentes, ou seja, que não foram expostas a embebição e ainda não absorveram água. Como resultado da absorção de água das sementes, estas se tornaram intumescidas sem apresentar vestígios da protrusão da radícula, atingindo o estágio I (EI), que é a semente com 2 DAE (dias após a embebição). O estágio II corresponde ao início da abertura do opérculo, que é a região por onde sai a radícula, e da protrusão da radícula, sendo esse estágio alcançado por volta dos 4 DAE. Com a absorção da água e a retomada da reativação do metabolismo das sementes, ocorre a protrusão total da radícula a partir dos 5 DAE, correspondendo ao estágio III. Com a continuação do crescimento do embrião e o início de sua saída do tegumento, este apresenta o hipocótilo com aspecto curvado aos 6 DAE, estabelecendo-se o estágio de desenvolvimento IV. Dando continuidade ao processo de desenvolvimento da plântula, esta completa a sua saída do tegumento, liberando os cotilédones e dispendo o hipocótilo numa condição totalmente ereta, definindo o estágio de desenvolvimento V, entre 8 ° e 10 °DAE.

A análise dos estádios de desenvolvimento das sementes de mandacaru foi realizada até o 12 ° DAE, no qual se definiu o estágio de desenvolvimento VI, que se caracteriza pelo início do surgimento de um tufo de espinhos entre os cotilédones e a sua condição totalmente esverdeada pela presença de clorofila. Pode-se observar também na Figura 5, o aspecto da plântula de mandacaru aos 60 DAE.



**Figura 3** – Estádios de desenvolvimento das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C) durante o seu processo germinativo e desenvolvimento inicial das plântulas. Desenhos realizados por Raimundo Wesley, Fortaleza-CE, 2008. Escala 1:1 cm.

Anderson (2001) descreve, em seu livro *Cactus Family*, que uma semente madura de cactácea contém um embrião marcadamente curvado que é envolvido por um tecido nutritivo. Após a germinação, a semente produz uma pequena plântula, com o eixo hipocótilo-radícula suculento e duas folhas triangulares provenientes do embrião, que são originárias do cotilédone. Muitos meses são requeridos para a plântula desenvolver um corpo cilíndrico com brotações espinhosas.

#### 4.2.4. Determinação da matéria seca dos cotilédones e do eixo hipocótilo-radícula das sementes de mandacaru durante o seu processo germinativo

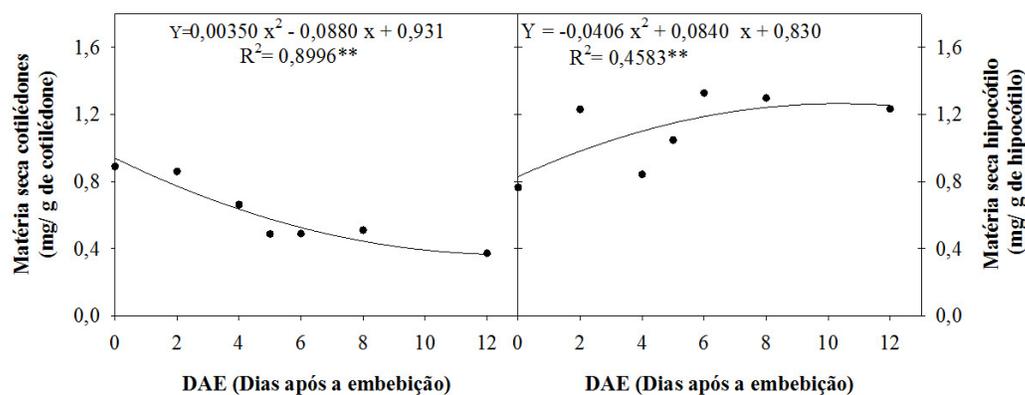
O resumo da análise de variância dos valores médios da matéria seca dos cotilédones (MSC) e do eixo hipocótilo-radícula (MSHR) está apresentado na tabela 10, mostrando mudanças significativas nessas variáveis pelo Teste F ( $p \leq 0,01$ ).

**Tabela 10** – Resumo da análise de variância para as médias de matéria seca cotilédone (MSC) e hipocótilo (MSH), ao longo do processo germinativo.

Fonte de variação	g.l	Q.M (característica)	
		MSC	MSHR
Dias após embebição	6	0,1596**	0,2042**
Regressão Linear	1	0,7863**	0,4600**
Regressão Quadrática	1	0,0753**	0,1014**
Regressão Cúbica	1	0,00156 <sup>ns</sup>	0,0051 <sup>ns</sup>
Desvios de Regressão	3	0,03154**	0,2195**
Resíduo	21	0,03287	0,0042
C.V(%)		9,39	5,85

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

As mudanças na MSC e MSH, durante a germinação, seguiram o comportamento quadrático, sendo que para os cotilédones houve tendência à redução, enquanto para o hipocótilo foi observado incremento (Figura 6).



**Figura 4** – Matéria seca dos cotilédones e eixo hipocótilo-radícula das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), ao longo do seu processo germinativo.

Analisando-se a MSC, observou-se decréscimo desse parâmetro a partir do 4 °DAE, sendo verificado no último tempo analisado redução de 59,00% em relação à semente no estado quiescente, enquanto que no eixo hipocótilo-radícula houve acúmulo de matéria seca no eixo. Resultados semelhantes foram observados em *Caesalpinia peltophoroides*, que observaram declínio significativo da MSC após o 5 °DAE, por outro lado, a plântula apresentou incremento crescente da biomassa tanto da parte aérea quanto da raiz da plântula (CORTE *et al.*, 2006).

#### 4.2.5. Análise da mobilização das reservas das sementes de mandacaru durante seu processo germinativo

##### 4.2.5.1. Composição das sementes de mandacaru

A composição química das sementes de mandacaru pode ser observada na tabela 11. Observa-se que os principais componentes das sementes quiescentes de mandacaru são os lipídios, correspondendo a 54,50% e 61,70% da massa seca dos cotilédones e do eixo-hipocótilo radícula, respectivamente.

**Tabela 11** – Composição centesimal dos componentes, cotilédones e eixo hipocótilo-radícula, das sementes quiescentes de mandacaru.

Componentes do cotilédone		Componentes do eixo hipocótilo-radícula	
	% de matéria seca *		% de matéria seca*
Lipídios	54,50	Lipídios	61,70
Açúcares solúveis	1,8	Açúcares solúveis	1,8
Amido	0,33	Amido	0,40
Proteínas	39,51	Proteínas	30,12
N-aminossolúveis	0,53	N-aminossolúveis	0,39
Outras substâncias	3,53	Outras substâncias	5,59

\*Valores percentuais da matéria seca, dos cotilédones e hipocótilos, da semente quiescente.

#### 4.2.5.2. Mobilização das reservas lipídicas

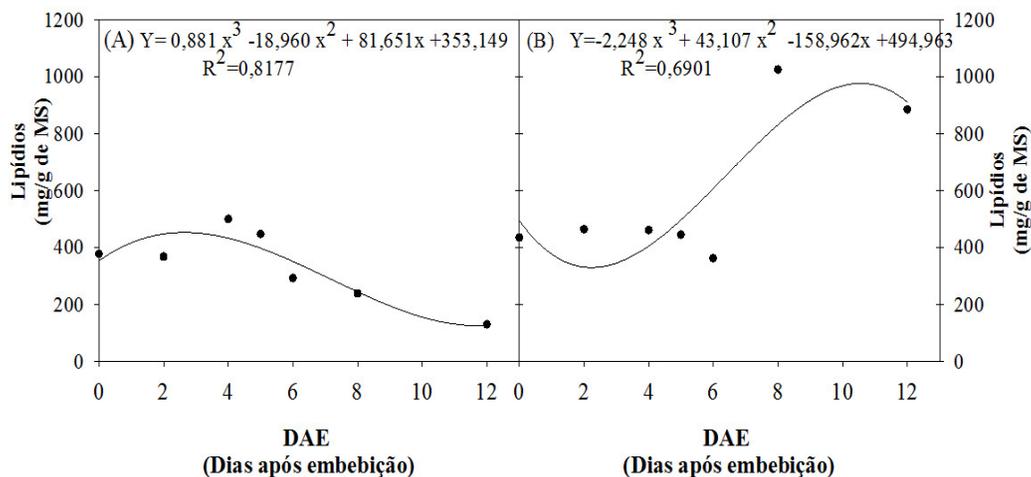
Os teores de lipídios diferiram significativamente nos tempos de germinação avaliados, o que pode ser observado no resumo da análise de variância na Tabela 12.

**Tabela 12** – Resumo da análise de variância das médias dos teores de lipídios dos cotilédones (LC) e hipocótilo (LH), ao longo do processo germinativo.

Fonte de variação	g.l	Q.M (característica)	
		MSC	MSH
Dias após embebição	6	63881,70**	270079,48**
Regressão linear	1	215344,87**	842141,04 **
Regressão quadrática	1	64174,63**	55945,41**
Regressão cúbica	1	33888,01**	220150,82**
Desvios de regressão	3	23294,25**	167413,12**
Resíduo	21	2034,05	1856,75
C.V(%)		13,41	5,85

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo Teste F.

Nos cotilédones, os teores lipídicos apresentaram um comportamento cúbico (Figura 7), observando-se maior incremento aos 4 DAE (32,53 %), acompanhado de redução nos tempos posteriores de germinação e atingindo aos 12 DAE 65,54% dos teores de lipídios dos cotilédones das sementes quiescentes. Enquanto que para o eixo hipocótilo-radícula (Figura 7), os teores de lipídios se mantiveram inalterados até o 5 °DAE, apresentando uma leve redução no 6 ° DAE (18,66 %) e um acentuado incremento no 8 °DAE (135,00 %). Até o 6 °DAE, os teores de lipídios nos cotilédones e no eixo hipocótilo-radícula foram praticamente os mesmos, por outro lado, houve incremento acentuado, aos 8 e 12 DAE, nesses teores no eixo hipocótilo-radícula, sugerindo que outras substâncias, como pigmentos, podem ter sido extraídos desses tecidos.



**Figura 5** – Médias dos teores lipídicos dos cotilédones (A) e hipocótilos (B) das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), ao longo do processo germinativo.

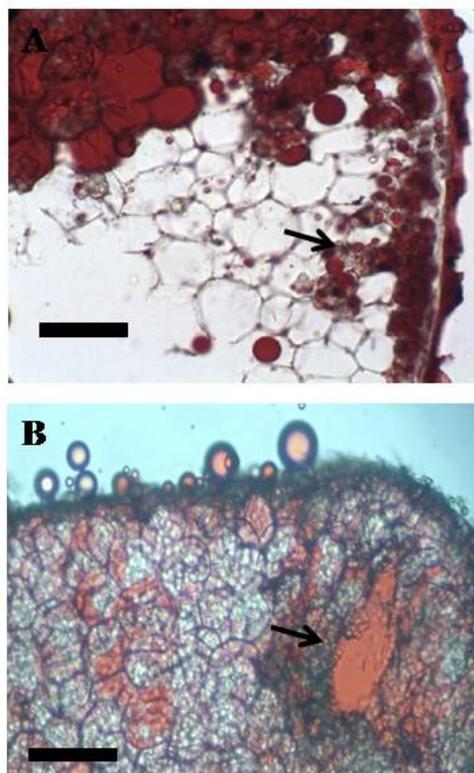
Em conformidade ao presente estudo, os lipídios também são os principais compostos de reserva das sementes de amendoim-bravo, *Euphorbia heterophylla*, correspondendo a 60 % da sua matéria seca (SUDA; GIORGINI, 2000), sendo que a sua degradação se inicia logo após a embebição das sementes, atingindo 70 %, entre 72 e 96 horas. A mobilização de reservas de sementes ricas em lipídios, como as oleaginosas, geralmente ocorre com a emergência da radícula, sendo o lipídio convertido em amido e açúcares solúveis, que se tornam fonte de recursos primários durante o crescimento heterotrófico (PONTES *et al.*, 2002). Lima *et al.*, (2008) avaliando a germinação de pau-balsa, *Aniba rosaeodora* Ducke, observaram um decréscimo de 40 % nos teores de lipídios entre o primeiro estágio (0 cm) e o último estágio (5-7 cm), após a protrusão da radícula.

Considerando-se o alto percentual de lipídios nas sementes de *Cereus jamacaru* D.C., a sua importância como fonte de energia no processo de mobilização de suas reservas, sugere-se que essa seja uma característica adaptativa dessa cactácea, que permite o estabelecimento de suas plântulas mesmo em ambientes pouco iluminados.

Relacionado a isso, Kitajima (1996) ressalta que os altos teores lipídicos nas sementes de algumas espécies devem indicar uma seleção compensatória (maior energia/volume), à medida que as sementes mais leves são fortemente selecionadas, por exemplo, para melhor dispersão.

Em concordância com as análises bioquímicas, a coloração com Sudan IV, que corresponde a um método citoquímico que detecta a presença de lipídios, também mostrou mudanças no conteúdo de lipídios nas células das sementes de mandacaru, ao longo do processo germinativo (Figura 8). Inicialmente, observou-se na semente quiescente (E0) a presença de inúmeros glóbulos vermelhos corados no citoplasma dessas células, indicando a presença de corpos lipídicos. Por outro lado, ao longo do processo germinativo, verificou-se a redução do número desses corpos lipídicos, principalmente após a protrusão da radícula (6 dias após a embebição), indicando que essa substância foi mobilizada durante a germinação dessas sementes.

Em seus estudos com *Avena sativa*, Banás *et al.* (2007) verificaram o acúmulo de corpos lipídicos no endosperma desses grãos, sugerindo que estes são acumulados durante a sua formação e desenvolvimento e correspondem a principal reserva existente nessas células. De forma semelhante, as análises histoquímicas realizadas por Suda e Giorgini (2000) em amendoim-bravo (*E.heterophylla*) mostraram que o endosperma é rico em corpos lipídicos e que sua morfologia foi modificada após a embebição das sementes, seguido de gradual desaparecimento durante a germinação das sementes.



**Figura 6** – Cortes transversais das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.) coradas com Sudan IV. Sementes quiescentes (A), sementes com 5 dias após embebição (B), período coincidente com a protrusão da radícula. ( → ) Corpos lipídicos. Barra: 25  $\mu$ m.

#### 4.2.5.3. Mobilização de carboidratos

##### 4.2.5.3.1. Mobilização de açúcares solúveis, redutores e não-redutores

Os carboidratos se constituíram em um dos componentes menos representativos encontrados nas sementes de mandacaru, correspondendo a apenas 2,20 % da sua massa, distribuídas em 1,8 % de açúcares solúveis (1,58 % de açúcares redutores e 0,22 % de açúcares não-redutores) e 0,33% de amido, nos cotilédones (Tabela 11).

Os teores de açúcares solúveis, açúcares redutores e açúcares não-redutores apresentaram mudanças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, podendo ser observado no resumo da análise de variância da Tabela 13.

**Tabela 13** – Resumo da análise de variância das médias dos açúcares solúveis (AS), açúcares redutores (AR) e açúcares não-redutores (ANR) dos cotilédones (C) e hipocótilos (H), das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), nos diferentes períodos de germinação avaliados.

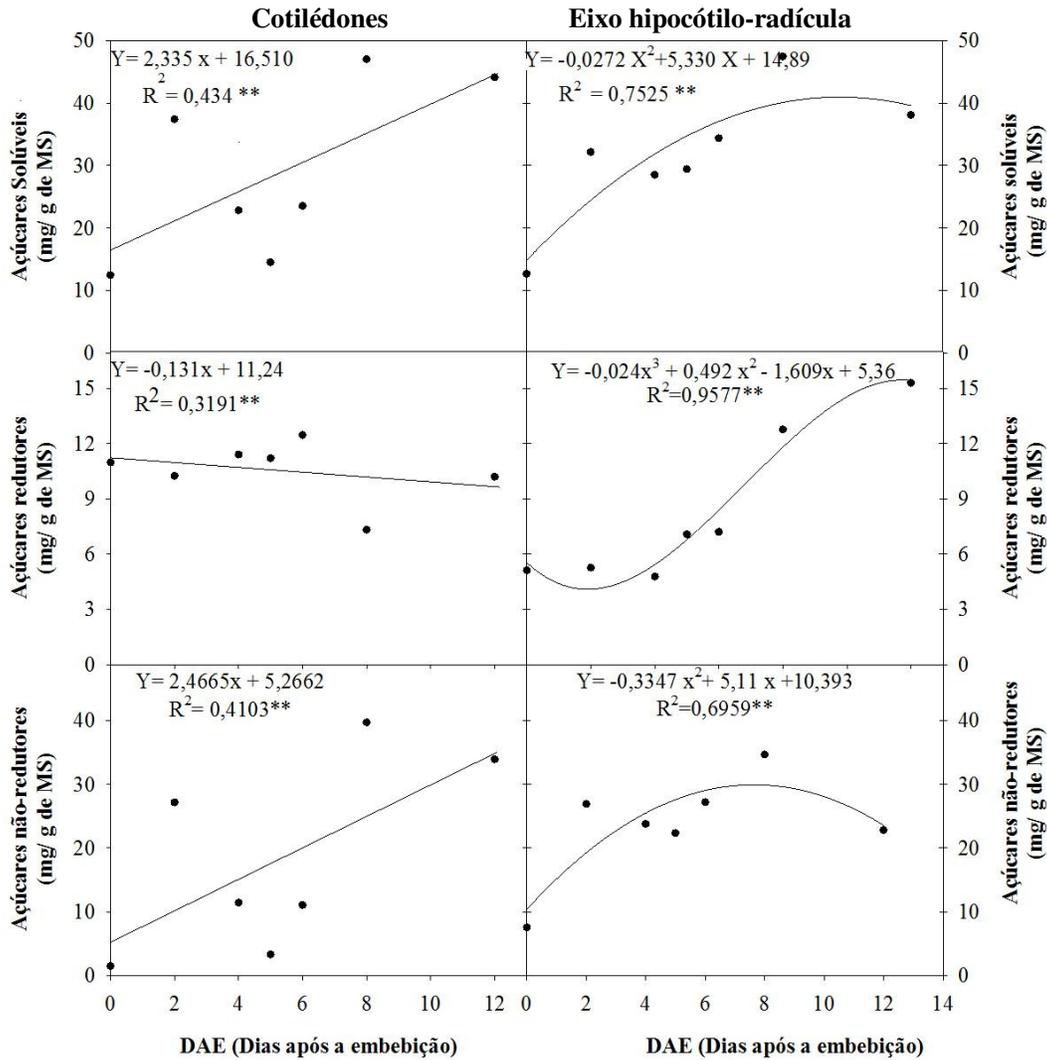
Q.M (característica)				
Fonte de variação	g.l	ASC	ARC	ANRC
Dias após embebição	6	782,15**	10,47 **	923,52**
Regressão linear	1	2038,22**	6,45 <sup>ns</sup>	2273,56**
Regressão quadrática	1	38,54 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>	45,36 <sup>ns</sup>
Regressão cúbica	1	4,31 <sup>ns</sup>	13,32*	32,85 <sup>ns</sup>
Desvios de regressão	3	870,62 **	14,25**	1063,11**
Resíduo	21	17,85	2,89	13,97
C.V(%)		14,65	16,10	20,42

Q.M (característica)				
Fonte de variação	g.l	ASH	ARH	ANRH
Dias após embebição	6	448,22**	69,03 **	270,03**
Regressão linear	1	1567,06**	347,53**	438,40**
Regressão quadrática	1	456,52**	23,77*	688,58**
Regressão cúbica	1	23,07 <sup>ns</sup>	25,34*	0,055 <sup>ns</sup>
Desvios de regressão	3	214,22**	5,85 <sup>ns</sup>	164,38
Resíduo	21	14,32	2,38	11,50
C.V(%)		11,89	18,78	14,36

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade. \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> Não significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade, pelo teste F.

As mudanças nos teores de açúcares solúveis, nos cotilédones, mostraram uma tendência linear, apesar de alguns pontos não terem se ajustado ao modelo, enquanto que no hipocótilo, os teores de açúcares solúveis seguiram um comportamento quadrático (Figura 9). Entretanto, ambos os tecidos, apresentaram a mesma tendência de mobilização dessas reservas no período de germinação avaliado.



**Figura 7** – Teores de açúcares solúveis, redutores e não-redutores, dos cotilédones e eixo hipocótilo-radícula, de sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), ao longo do período de germinação avaliado.

Analisando-os individualmente os teores de açúcares solúveis, verificou-se nos cotilédones, um incremento de 199,60 % no 2° DAE, seguido de uma leve redução aos 4° e 5 °DAE, e um aumento acentuado no 8 °DAE de 276,50 %. No eixo hipocótilo-radícula os incrementos foram de 153,54 % (2 °DAE) e 173,79 % (8 °DAE), que correspondeu ao maior incremento.

Com relação à mobilização dos açúcares redutores, estes apresentaram um comportamento linear, para os cotilédones, e cúbico para o hipocótilo (Figura 9). Para os cotilédones, os teores dos açúcares redutores apresentaram um incremento de 13,67% aos 6 DAE acompanhado de redução de 33,00% aos 8 DAE. Enquanto que para o eixo hipocótilo-radícula, observou-se incremento a partir dos 5 DAE (38,22 %), sendo mantida essa mesma tendência até o 12 °DAE com incremento de 199,16 %.

Os teores de açúcares não-redutores apresentaram sua mobilização com comportamento semelhante aos açúcares solúveis. Entretanto nos cotilédones, observou-se um comportamento linear, enquanto que o hipocótilo apresentou um comportamento cúbico (Figura 9).

Alguns autores têm discutido que a mobilização dos carboidratos, dependendo da espécie, pode ocorrer durante a germinação ou apenas no estágio de plântula (PONTES *et al.*, 2002; BUCKERIDGE *et al.*, 2004). Relacionado a isso, Stone e Gifford (1999) observaram decréscimo de 80 % dos carboidratos armazenados no megagametófito de *Pinus taeda* durante a germinação e no estágio de plântula.

Os resultados aqui observados foram semelhantes aos obtidos por Bezerra *et al.* (2003), que observaram durante a mobilização de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, um decréscimo nos teores de amido nos cotilédones, sendo observado no presente estudo comportamento semelhante para os teores de amido (Figura 10), acompanhado de um

aumento, tanto dos açúcares solúveis totais quanto dos açúcares redutores, nos eixos embrionários, o que também foi verificado para as sementes de mandacaru (Figura 9)

#### 4.2.5.3.2. Mobilização de amido

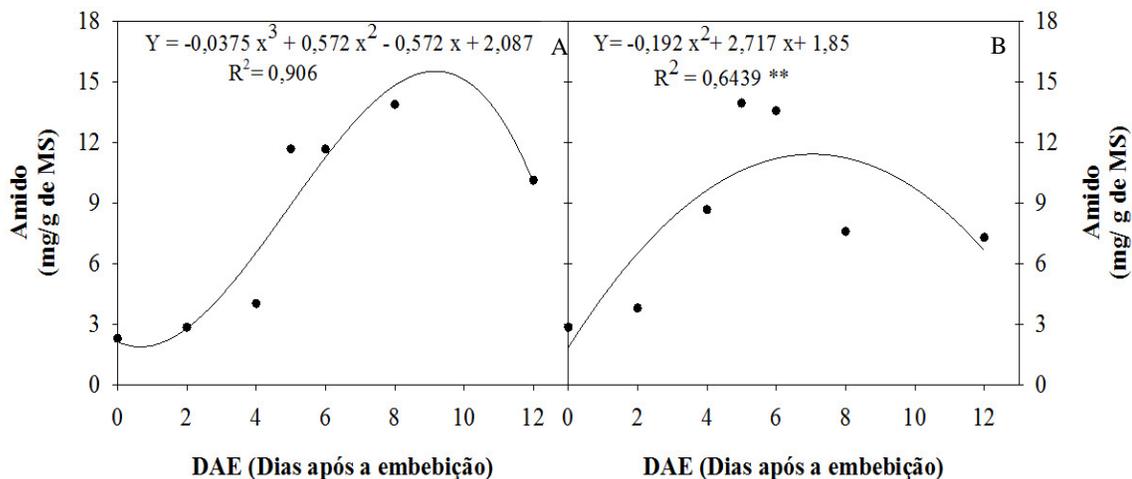
O amido também foi mobilizado durante a germinação das sementes de mandacaru, apesar dessa substância ter correspondido a apenas 0,33 % do conteúdo da matéria seca das sementes, no estado quiescente. O resumo da análise de variância das médias dos teores de amido pode ser observado na tabela 14, onde foram verificadas mudanças significativas nesses teores, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

**Tabela 14** – Resumo da análise de variância dos teores de amido do cotilédone (TAC) e do eixo hipocótilo-radícula (TAEH), nos diferentes tempos de germinação avaliados.

Fonte de variação	g.l	Q.M (característica)	
		TAC	TAEH
Dias após embebição	6	106,42**	74,15**
Regressão linear	1	456,89**	57,56**
Regressão quadrática	1	56,87**	228,92**
Regressão cúbica	1	61,25**	1,83**
Desvios de regressão	3	21,16**	52,19**
Resíduo	21	4,18	3,38
C.V(%)		24,10	22,30

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Nos cotilédones, os teores de amido (Figura 10), seguiram o comportamento de uma equação polinomial cúbica, apresentando a tendência ao aumento até o 8 °DAE seguido de redução no 12 °DAE. Enquanto que no hipocótilo, os teores de amido se ajustaram a uma equação polinomial quadrática, observando-se redução significativa a partir do 8 °DAE.



**Figura 8** – Teores de amido dos cotilédones (A) e eixo hipocótilo-radícula (B), ao longo dos diferentes períodos de germinação avaliados.

É interessante salientar que os incrementos nos teores de açúcares e amido, a partir dos 8° e 10 °DAE, podem estar relacionados não apenas aos açúcares provenientes da mobilização das reservas, como também a produtos da fotossíntese, tendo em vista que nesse período as plântulas já se apresentam clorofiladas.

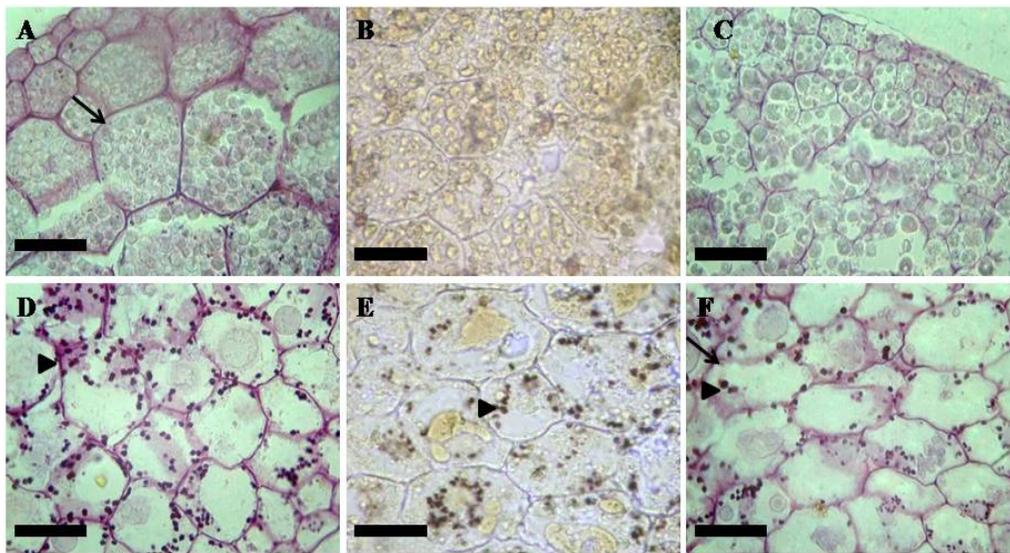
O conteúdo de amido correspondeu à pequena parcela dos componentes das sementes de *Cereus jamacaru* D.C., o que também foi observado em *Cesalpineia peltophoroides* (CORTE *et al.*, 2006) e *Euphorbia heterophylla* (SUDA; GIORGINI, 2000).

A presença de amido e sua mobilização também foram evidenciadas pelas análises citoquímicas realizadas nas sementes de mandacaru, no estado quiescente e ao longo da germinação. As mudanças nos conteúdos de amido foram evidenciadas pela reação de PAS e de Lugol, que podem ser observadas na figura 11.

A reação do PAS (Figura 11), utilizando o reagente de Schiff, evidenciou paredes celulares das células cotiledonares, devido sua afinidade por polissacarídeos neutros, revelando a presença de celulose e hemicelulose, entretanto essas paredes se

mostraram coradas da mesma forma nos diferentes tempos de germinação analisados, não sendo observadas alterações na sua espessura pela coloração com PAS.

A partir do período coincidente com a protrusão da radícula (5 DAE), foi observado a presença de grânulos escuros que reagiram positivamente com o Reativo de Schiff, correspondendo a amido no citoplasma dessas células, sendo a detecção desses grânulos mais abundantes aos 6 DAE. A presença de amido, no citoplasma das células de mandacaru, foi confirmada pela reação positiva com o lugol, verificada principalmente após a protrusão da radícula (Figura 11).



**Figura 9** – Seções transversais da semente de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.) em diferentes períodos de germinação. Sementes coradas pela Reação com PAS: sem embebição (A), aos 5 dias após a embebição DAE (C), aos 6 DAE (D) e aos 7 DAE (F). Sementes coradas com Lugol: semente sem embebição (B) e aos 5 (DAE) (E). (→) Destaque da parede celular, (▶) Grânulos de amido. Barra: 25 µm.

O amido é uma das mais importantes formas de reserva de carbono nas plantas, em termos de quantidade, universalidade de sua distribuição e importância comercial (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). Teixeira e Machado (2008) estudando a localização das reservas de *Caesalpinia echinata* e *Caesalpinia ferreae* observaram que o amido corresponde a principal reserva que se acumula nas células dos tecidos de reserva dessas espécies.

#### **4.2.5.4. Mobilização das reservas protéicas**

##### **4.2.5.4.1. Análise por métodos bioquímicos**

As proteínas de estocagem, classificadas por Osborne (1924) de acordo com sua solubilidade em albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em solução salina), prolaminas (solúveis em álcool) e glutelinas (solúveis em ácido ou solução alcalina), foram analisadas nas sementes e plântulas de mandacaru.

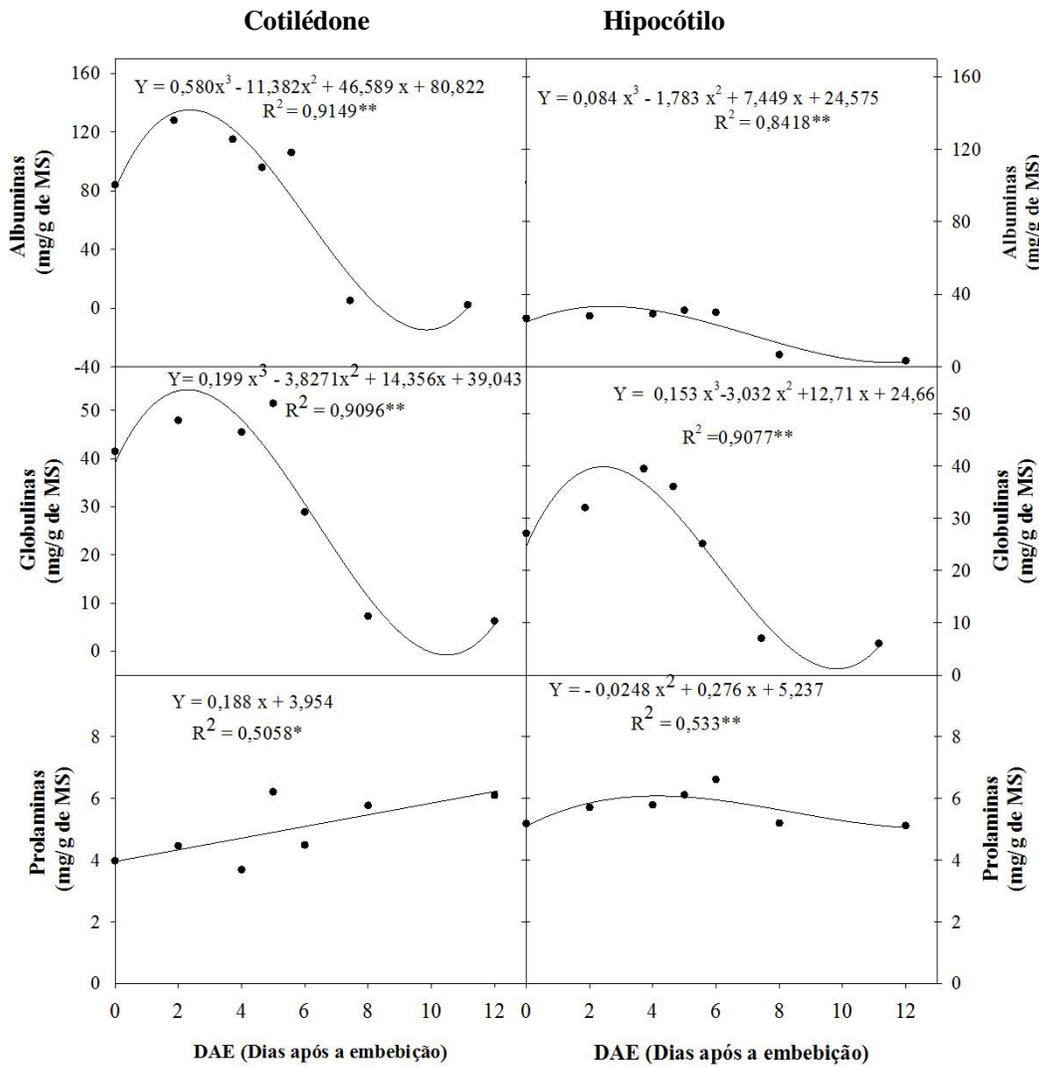
O resumo da análise de variância dos teores médios de albuminas, globulinas e prolaminas, em que mudanças significativas nesses teores, ao nível de 1% de probabilidade, pelo Teste F, podem ser observados na Tabela 15.

Os teores de albuminas, nos cotilédones e eixo hipocótilo-radícula, seguiram o comportamento de uma equação polinomial de 3º grau (Figura 12). Observando-se um incremento de 52,20% aos 2 DAE, nos cotilédones, sendo acompanhado de redução acentuada de 95,00% a partir do 8 °DAE de, em relação ao observado nas sementes quiescentes. Já para o eixo hipocótilo-radícula, os teores de albuminas foram bem menores que no cotilédone, apresentando reduções significativas 75,00 % (8 °DAE) e de 88% (12 ° DAE), quando comparados as sementes quiescentes (Figura 12).

**Tabela 15** – Resumo da análise de variância das médias dos teores de albuminas (TA), globulinas (TG) e prolaminas (TP) das estruturas, cotilédones (C) e hipocótilos (H), das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), ao longo do período de germinação avaliados.

Q.M (característica)				
Fonte de variação	g.l	TAC	TGC	TPC
Dias após embebição	6	10354,20**	1455,95 **	4,39 **
Regressão linear	1	35612,65**	5781,35**	13,32**
Regressão quadrática	1	6555,18**	424,93**	0,03 <sup>ns</sup>
Regressão cúbica	1	14673,08**	1740,10**	0,33 <sup>ns</sup>
Desvios de regressão	3	1761,43**	263,10**	4,22 <sup>ns</sup>
Resíduo	21	79,97	26,58	1,61
C.V(%)		11,61	15,79	25,62
Q.M (característica)				
Fonte de variação	g.l	TAH	TGH	TPH
Dias após embebição	6	561,04**	712,62 **	1,25 **
Regressão linear	1	2030,77**	2310,08**	0,20 <sup>ns</sup>
Regressão quadrática	1	495,01**	546,80**	3,79**
Regressão cúbica	1	308,01**	1023,98**	0,50*
Desvios de regressão	3	177,49**	131,62**	0,100*
Resíduo	21	3,13	8,85	0,086
C.V(%)		7,97	12,03	5,18

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade. \*Significativo ao nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> Não significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade, pelo Teste F.



**Figura 10** – Médias dos teores de proteínas das frações protéicas: albuminas, globulinas e prolaminas, dos cotilédones e hipocótilos, das sementes de mandacaru (*Cereus jamcaru* D.C.), analisados ao longo do processo germinativo.

Os teores de globulinas, nos cotilédones, seguiram um comportamento cúbico, sofrendo reduções significativas de 30,00%, a partir do 6 °DAE, sendo esta mais acentuada a partir do 8 °DAE, com redução de 82,53% desses teores em relação a semente quiescente. Da mesma forma para o eixo hipocótilo-radícula, esses teores também seguiram um comportamento cúbico, apresentando incremento de 45,53% aos 4 DAE, seguido de redução significativa de 73,94 % aos 8 DAE, com relação a semente quiescente (Figura 12).

Os teores de prolaminas seguiram um comportamento linear, nos cotilédones, enquanto que no eixo hipocótilo-radícula, esses teores mostraram um comportamento quadrático (Figura 12). Os teores de prolaminas apresentaram incrementos significativos ao longo do tempo de germinação avaliados, nos cotilédones e no eixo, no entanto, seus níveis foram pouco representativos quando comparados com os das outras frações protéicas analisadas.

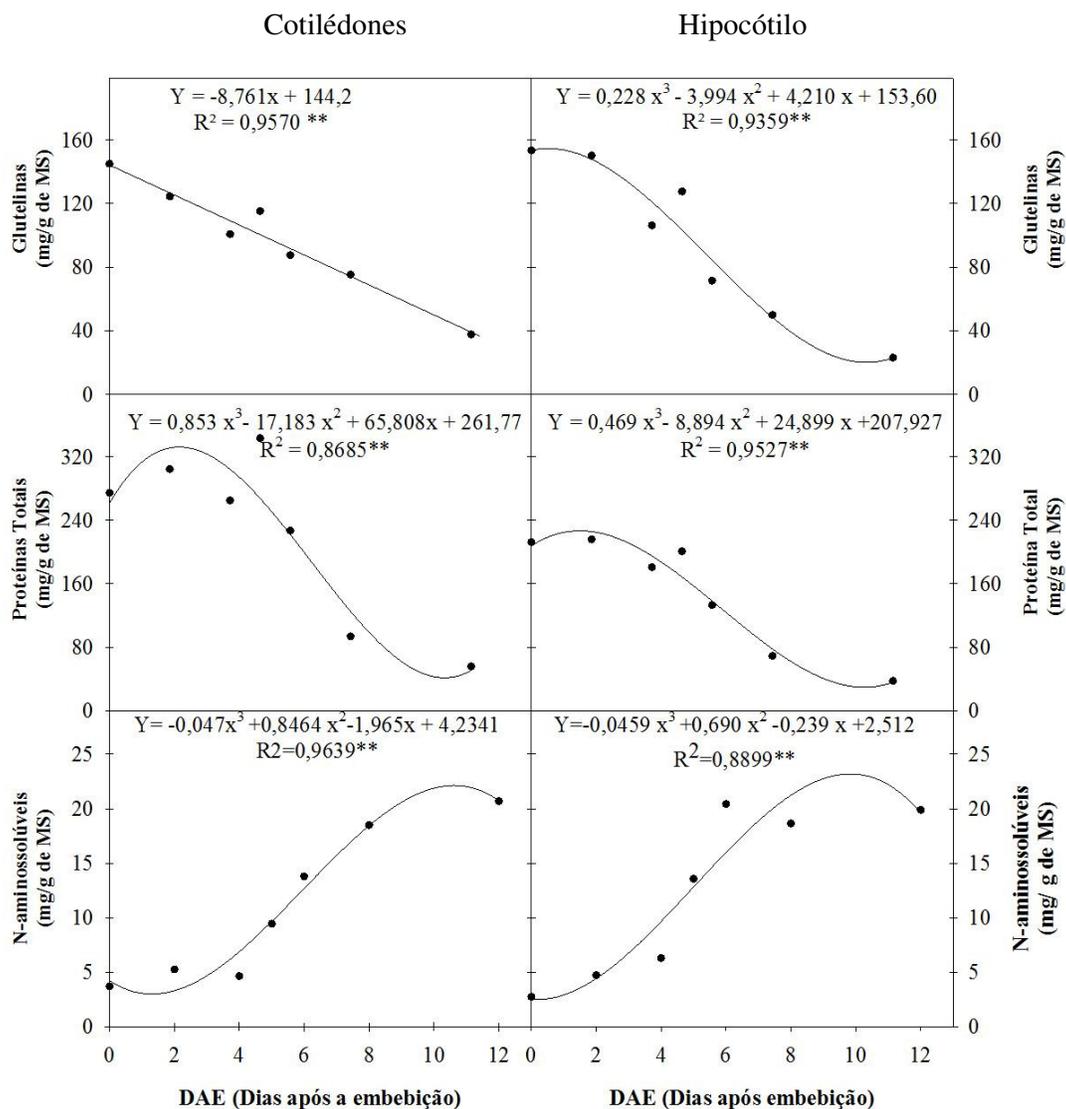
Os teores de glutelinas, proteínas totais e de N-aminossólúveis sofreram mudanças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, pelo Teste F, como pode ser observado no resumo da análise de variância das médias desses valores na tabela 16.

Os teores de glutelinas, nos cotilédones, apresentaram um comportamento linear, o que pode ser observado na Figura 13, sendo evidenciado redução de 15,00% a partir dos 2 DAE, mantendo essa tendência até o 12 °DAE com redução de 74,00%, em relação a semente no estado quiescente. Enquanto que para o eixo hipocótilo-radícula, os teores de glutelinas apresentaram comportamento cúbico, evidenciando-se redução a partir do 4 °DAE (30,00%), seguido de redução aos 6 DAE (62,33 %) e aos 12 DAE (85,02 %), quando comparado esses teores aos das sementes quiescentes.

**Tabela 16** – Resumo da análise de variância das médias dos teores de glutelinas (TG), proteínas totais (PT) e N-aminossolúveis (TN) das estruturas, cotilédones (C) e hipocótilos (H), das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), ao longo do período de germinação avaliados.

Q.M (característica)				
Fonte de variação	g.l	TGC	TPTC	TNC
Dias após embebição	6	4993,30 **	46982,38 **	191,29 **
Regressão linear	1	28687,53**	189191,37**	1008,67**
Regressão quadrática	1	15,25 <sup>ns</sup>	23954,91*	0,0294 <sup>ns</sup>
Regressão cúbica	1	30,93 <sup>ns</sup>	31682,32**	97,62**
Desvios de regressão	3	408,70 <sup>ns</sup>	12355,27*	13,81*
Resíduo	21	228,15	3846,19	2,05
C.V(%)		15,42	27,76	13,18
Q.M (característica)				
Fonte de variação	g.l	TGH	TPTH	TNH
Dias após embebição	6	10265,24**	20901,70 **	233,52 **
Regressão linear	1	55348,95**	108142,10**	1051,21**
Regressão quadrática	1	32,05 <sup>ns</sup>	1756,92**	103,53**
Regressão cúbica	1	2264,31**	9573,66**	92,13**
Desvios de regressão	3	1315,38**	1979,16**	51,42**
Resíduo	21	145,62	131,50	2,31
C.V(%)		12,39	7,65	12,34

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade. \*Significativo ao nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> Não significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade, pelo Teste F.



**Figura 11** – Médias dos teores de glutelinas, proteínas totais e N-aminossolúveis, dos cotilédones e hipocótilos, das sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), analisados ao longo do processo germinativo.

As glutelinas e as albuminas foram as principais proteínas de reserva das sementes de mandacaru, correspondendo a 52,84 % e 30,02 %, respectivamente, dos valores das proteínas totais das sementes quiescentes. Dessa forma, esses grupos de proteínas foram os que mais contribuíram para o incremento de N-aminossolúveis, tanto em cotilédones como no eixo embrionário.

As globulinas e prolaminas também foram detectadas nas sementes de mandacaru no estado quiescente, correspondendo a 15,00 e 1,44 % dos valores das proteínas totais das sementes quiescentes, respectivamente.

Os teores de proteínas totais, calculados pelas somas das frações protéicas, seguiram um comportamento cúbico, determinado pela análise de regressão, nos cotilédones e hipocótilos (Figura 13). Os teores de proteínas totais, como o das frações protéicas, também foram significativamente reduzidos nos diferentes tempos de germinação avaliados. Nos cotilédones, as reduções mais acentuadas foram observadas nos 8 ° DAE (65,97%) e 12 °DAE (80,73%). No eixo hipocótilo-radícula também foi observada tendência a redução, iniciando-se aos 6 DAE (30,00%) e sendo esta mais acentuada aos 12 DAE (85,02%).

Os teores de N-aminossolúveis apresentaram o comportamento cúbico, tanto nos cotilédones como no eixo hipocótilo-radícula (Figura 13). O aumento dos níveis de N-aminossolúveis, à medida que os níveis de proteínas se reduzem, é resultado do produto de degradação das reservas protéicas, indicando que essas foram mobilizadas durante a germinação das sementes de mandacaru, especialmente nos últimos períodos de germinação avaliados.

Resultados concordantes foram observados em sementes de pau-balsa (*Aniba rosaedora* Duke), em que os níveis de proteínas foram ligeiramente modificados durante a germinação das sementes, sendo as maiores modificações observadas no

estágio mais tardio de germinação (LIMA *et al.*, 2008). Pontes *et al.* (2002) observaram que no embrião, os teores protéicos não diferiram estatisticamente, durante a embebição das sementes, por outro lado houve acúmulo no mesmo período.

As diferenças, nos padrões de mobilização de reservas observados por diversos autores, podem estar relacionadas aos resultados obtidos por Suda e Giorgini (2000), que constataram padrões variáveis de degradação nas diferentes frações protéicas em sementes de *Euphorbia heterophylla*. Esses mesmos autores observaram que a degradação das globulinas é concomitante ao aumento nos níveis de aminoácidos no endosperma, enquanto que a degradação de albuminas não tem esse comportamento, o que comprova a existência de padrões variáveis de mobilização dos diferentes grupos protéicos.

Durante a germinação, a hidrólise enzimática das proteínas de estocagem no endosperma forma um reservatório de pequenos peptídeos e aminoácidos, que são translocados para suprir o nitrogênio orgânico para o crescimento da plântula. Essas proteínas de reserva estão envolvidas no metabolismo dos carboidratos e aminoácidos constituindo cerca de 25,00% das proteínas totais extraídas das sementes em germinação (Fu *et al.*, 2005).

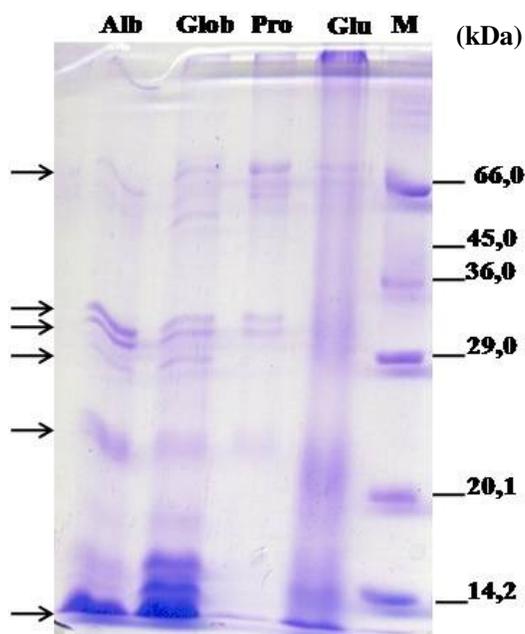
#### **4.2.5.4.2. Análise eletroforética das frações protéicas**

A análise das frações protéicas por eletroforese, em presença de SDS, dos cotilédones e do eixo hipocótilo-radícula, apresenta mudanças no padrão das proteínas e na sua mobilização durante o período de germinação avaliado. A resolução das frações protéicas das sementes quiescentes e germinadas, por PAGE-SDS, sob condições

desnaturantes, apresentou bandas protéicas de peso molecular variando de 14,2 kDa a 66,0 kDa.

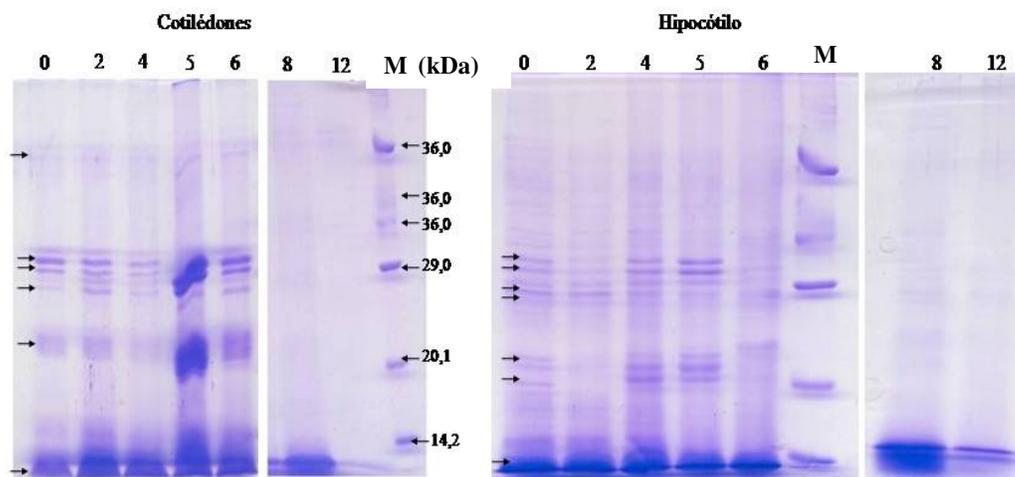
O padrão eletroforético das frações protéicas: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas, das sementes quiescentes pode ser observado na Figura 14. Observa-se no gel o maior coramento, das bandas protéicas pelo Comassie, das frações albuminas e glutelinas, resultados que coincidiram com as análises espectrofotométricas, nas quais essas frações apresentaram maior conteúdo de proteína (Figura 12 e 13).

As frações protéicas das albuminas, no gel das sementes quiescentes revelaram um padrão composto por três bandas com pesos moleculares de 30 kDa, 35 kDa e 37 kDa, um grupo de proteínas, com peso molecular de aproximadamente 24 kDa e um grupo principal composto por proteínas de baixo peso molecular, de aproximadamente 15 kDa. As outras frações protéicas apresentaram padrão semelhante ao observado ao das frações albuminas (Figura 14).



**Figura 12** – Padrões eletroforéticos das frações protéicas albuminas (Alb), globulinas (Glob), prolaminas (Pro), glutelinas (Glu), sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), das sementes quiescentes (*Cereus jamacaru* D.C.). Padrões protéicos (M).

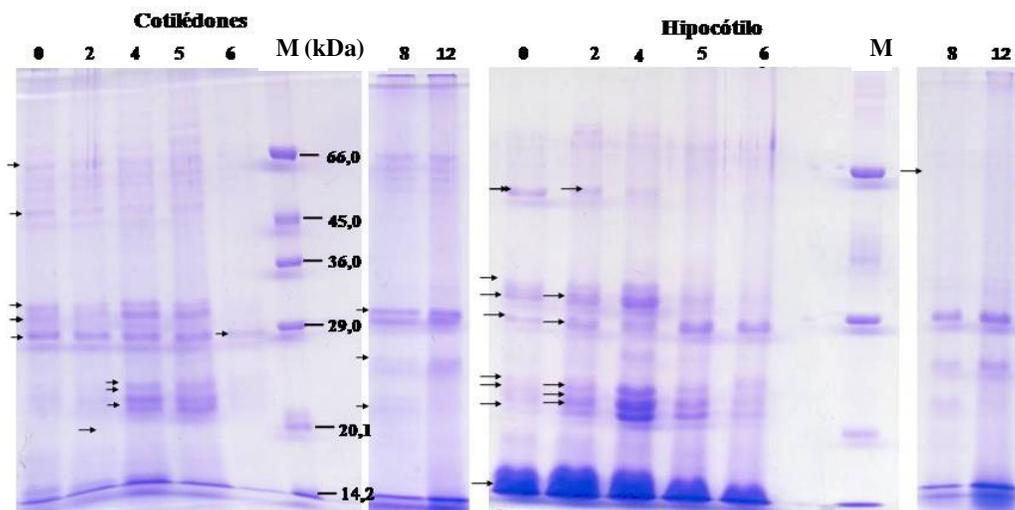
O padrão eletroforético das albuminas, ao longo dos diferentes dias de germinação avaliados (0 aos 12 DAE), apresentou redução da intensidade das bandas protéicas, especialmente nos últimos dias de germinação, porém evidenciou-se o mesmo padrão eletroforético obtido para a semente quiescente (Figura 15).



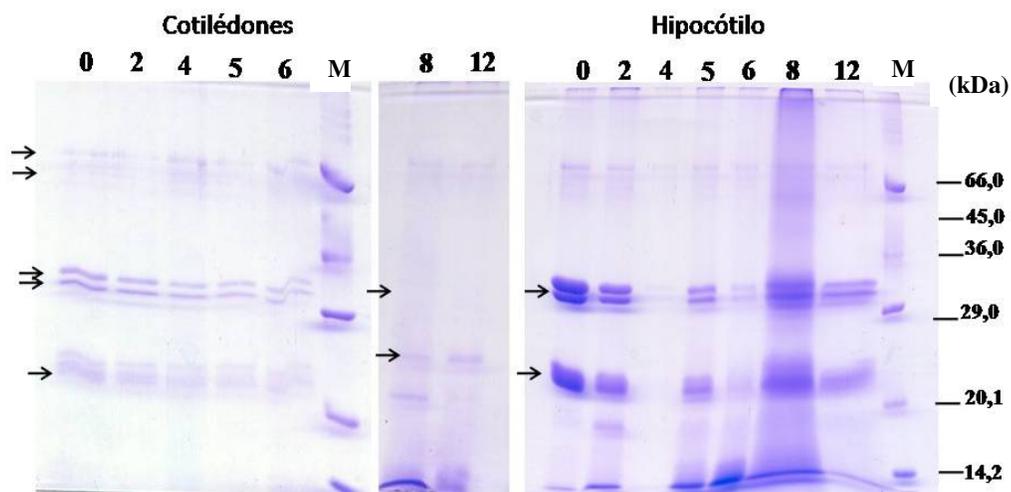
**Figura 13** – Mudanças nos padrões eletroforéticos das albuminas, em cotilédones e hipocótilos, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), durante a germinação de sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.). Padrões protéicos (M).

Com relação às globulinas, evidenciou-se três principais bandas com 26, 29 e 36 kDa no extrato da semente quiescente (Figura 16). Observou-se também nesse gel, o aparecimento de um grupo de proteínas entre 21 e 23 kDa, aproximadamente, nos 4° e 5° DAE, seguido do seu desaparecimento a partir do 6° DAE.

O padrão eletroforético das prolaminas (Figura 17), nos cotilédones, apresentou três grupos de proteínas com bandas bem definidas, sendo um grupo com peso molecular mais elevado de 58 kDa, 61 kDa e 66 kDa e outro com peso intermediário de 29, 31 e 34 kDa. Entretanto, observou-se padrão similar das bandas protéicas nos diferentes períodos de germinação avaliados.

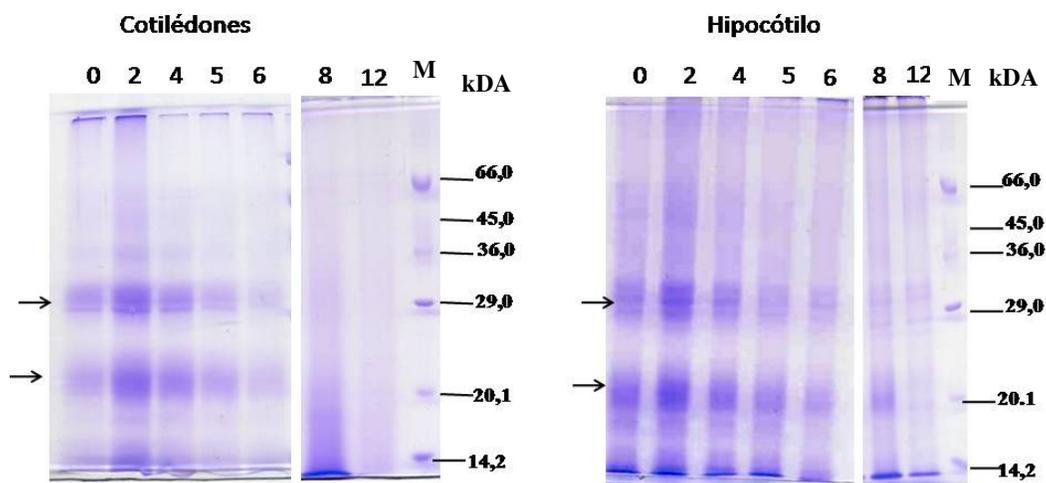


**Figura 14** – Mudanças nos padrões eletroforéticos das globulinas, em cotilédones e hipocótilos, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), durante a germinação de sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.). Padrões protéicos (M).



**Figura 15** – Mudanças nos padrões eletroforéticos das prolaminas, em cotilédones e hipocótilos, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), durante a germinação de sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.). Padrões protéicos (M).

O padrão eletroforético das glutelinas revelou grupos de proteínas, com pesos moleculares de aproximadamente 15, 23 e 36 kDa, que não se apresentavam como bandas bem definidas (Figura 18). Pode também ser observada para as frações das glutelinas, redução das bandas protéicas, ao longo do período de germinação avaliado.



**Figura 16** – Mudanças nos padrões eletroforéticos das glutelinas, em cotilédones e hipocótilos, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), durante a germinação de sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.)

Os padrões eletroforéticos dos extratos protéicos, do eixo hipocótilo-radícula, apresentaram semelhanças com os padrões dos extratos cotiledonares, tanto nas sementes quiescentes como durante a germinação. As albuminas apresentaram um padrão não muito definido, sendo as principais bandas identificadas com peso molecular de 15, 21 e 35 kDa. Por outro lado, as globulinas apresentaram bandas bem definidas, na semente no estado quiescente, mostrando o surgimento de novas bandas aos 4 DAE, seguido de redução a partir do 6ºDAE. Para as prolaminas foram observados dois grupos principais, correspondendo a 33 e 37 kDa, e um outro formado por um grupo com 23 e 16 kDa aproximadamente. Enquanto que para as glutelinas as principais bandas apresentavam pesos moleculares de 19 e 32 kDa ( Figuras 15, 16, 17 e 18).

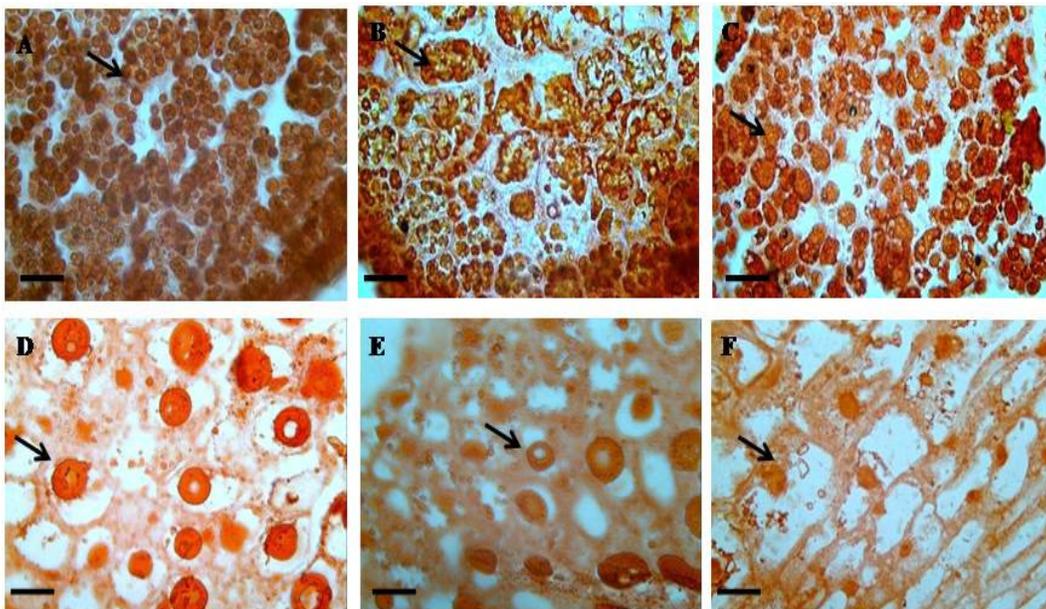
Concordando com o presente experimento, Suda e Giorgini (2000) observaram padrões diferentes de mobilização para as albuminas, globulinas e as glutelinas e as prolaminas. Neste estudo, as albuminas apresentaram predominância de proteínas de baixo peso molecular, que foram completamente degradadas entre 28 e 36 horas, as globulinas foram continuamente degradadas até 48 e o grupo das proteínas insolúveis em sal (prolaminas e glutelinas) também apresentaram tendência à mobilização.

#### **4.2.5.4.3. Análise por métodos citoquímicos**

As análises citoquímicas para detecção de proteínas, pelo método Xylidine Ponceau (XP), em conformidade com as análises bioquímicas, também detectaram a presença de proteínas nas células dos tecidos de reserva, das sementes de mandacaru, bem como mudanças nas reservas protéicas durante o tempo de germinação avaliado.

O Xylidine Ponceau (XP) revelou grande quantidade de material protéico no citoplasma das células analisadas (Figura 19). A coloração com XP mostrou a presença de inúmeros glóbulos corados em vermelho na semente de mandacaru, representando grande quantidade de corpos protéicos nos tempos de germinação estudados.

À medida que se progrediu o processo germinativo, especificamente a partir da protrusão da radícula, pode-se verificar a redução do número de corpos protéicos, devido a sua fusão, indicando o consumo dessa reserva durante a germinação (Figura 19). Após a protrusão da radícula (6 DAE), observou-se em algumas células a presença de estruturas globulares que preenchem quase todo o seu citoplasma, devido a fusão dos corpos protéicos, podendo-se verificar também a fragmentação dos corpos protéicos e a inexistência de coloração por XP, em outras células, indicando o consumo total dessas reservas.



**Figura 17** – Cortes transversais de sementes de mandacaru *Cereus jamacaru* D.C. coradas com Xylidine Ponceau. Sementes quiescentes (A), 2 dias após a embebição (DAE) (B), 4 DAE (C), 6 DAE (D), Região cotiledonar e eixo hipocótilo-radícula aos 7 DAE (E e F). (—→) material protéico. Barra 50  $\mu$ m.

A degradação ou o consumo dos corpos protéicos sugerem a mobilização das proteínas após a germinação, o que possivelmente se relaciona com o uso dessas moléculas durante o estabelecimento das plântulas. Resultados semelhantes, a esse presente estudo, foram observados por Suda e Giorgini (2000) que observaram que as sementes quiescentes de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) apresentavam corpos protéicos em abundância, que sofreram fusão protéica à medida que se progrediu a embebição dessas sementes, ocorrendo o seu desaparecimento gradual até 72 h da embebição.

A presença de proteínas, como material de reserva de sementes, também foi verificada em outras espécies tais como: moringa (GALLÃO; DAMASCENO; SOUSA DE BRITO, 2006), feijão (CORTELAZZO; COUTINHO; GRANJEIRO, 2005), soja (CORTELAZZO; VIDAL, 1991), alfafa (KROCHKO; BEWLEY, 2000).

## 5. CONCLUSÕES

As sementes de mandacaru não são fotoblásticas positivas, ou seja, não requerem a luz para germinar, entretanto na presença de luz, a germinação dessas sementes é acentuadamente estimulada.

A germinação das sementes de mandacaru, como as de outras plantas tropicais, é incrementada quando expostas a temperaturas mais elevadas, como as de 25 e 35°C, sendo inibidas em temperaturas extremas como 15 e 35°C.

As temperaturas de 25° e 30°C, associadas com a luz branca, correspondem às condições mais indicadas para os testes de germinação em laboratório com sementes de mandacaru, tendo em vista que estes foram os tratamentos que mais estimularam a germinação dessas sementes.

A germinação e o desenvolvimento das plântulas de mandacaru é caracterizada por 7 estádios de desenvolvimentos, definidos a partir das mudanças morfológicas sofridas por essa espécie.

As sementes de mandacaru são compostas por lipídios, proteínas, açúcares solúveis, açúcares redutores e não-redutores, amido e N-aminossolúveis, sendo que os seus principais componentes de reserva são os lipídios.

As proteínas de reserva das sementes de mandacaru apresentam diferentes padrões de degradação, que foram confirmadas pelas análises eletroforéticas, sendo que as albuminas e globulinas se apresentaram como as frações protéicas mais abundantes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M.F. **Plantas da Medicina Popular dos Cariris Velhos**, Paraíba. PNE, João Pessoa, 1996.

ALCORN, S.M.; KURTZ, E.B. Some factors affecting the germination of seed of the saguaro cactus (*Carnegiea gigantea*). **American Journal of Botany**, 46: 526-529, 1959.

AL-HELAL, A.A. Studies on germination of *Rumex dentatus* L. seeds. **Journal of Arid Enviroments**, v. 33, p. 39-47, 1996.

ALMEIDA, M.L.; MUNDSTOCK, C.M. A qualidade da luz afeta o afilamento em plantas de trigo quando cultivadas sob competição. **Ciência Rural**, v. 31, p. 401-408, 2001.

AMARAL, L.I.V.; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível da extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v.34, p.425-431, 2007.

ANDERSSON, E.F. **The Cactus Family**. Timber Press, 2001, 760p.

ANDRADE-LIMA D. **Plantas da Caatinga**. Rio de janeiro. Academia Brasileira de Ciências, p. 110 -115, 1989.

ANDRADE, R. A.; OLIVEIRA, I.V.M.; MARTINS, A.B.G. Influência da condição e período de armazenamento na germinação de sementes de pitaya vermelha. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.168-170, 2005.

ANDRADE, C.T.S.; MARQUES, J.G.W.; ZAPPI, D.C. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol: 8, p.36-42, 2006 a.

ANDRADE, C.T.S.; MARQUES, J.G.W.; ZAPPI, D.C. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos: tipos conexivos para definir categorias utilitárias, **Série Ciências Biológicas 6 (Etnobiologia)**, p.36-42, 2006b.

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

BALL, S.G.; WAL, M.H.B.J.; VISSER, R.G.F. Progress in understanding the biosynthesis of amylase. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 462-467, 1998.

BANÁS, A.; DEXBSKI, H.; BANAS', W.; HENEEN, W,K.; DAHLQVIST, A.; MAUREEN BAFOR, M.; GUMMESON, P.O.; MARTTILA, S.; EKMAN, A.; CARLSSON, A.S. Lipids in grain tissues of oat (*Avena sativa*): differences in content, time of deposition, and fatty acid composition. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n.10, p. 2463–2470, 2007.

BARBOSA, A.S.; ARAÚJO, A.P.; CANUTO, T.M.; BARBOSA, A.S.; DANTAS, J.P. Avaliação da composição química do mandacaru advindo da caatinga semi-árida paraibana. **In Resumos Congresso Norte-Nordeste de Química**, ANNQ, 2007.

BARROSO, G.M.; MORIN, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática dedicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 1999. 443 p.

BAUD, S.; BOUTÍN, J.P.; MIQUEL, M.; LEPINIEE, L.; ROCHAT, C. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.151-160,2002.

BELTRATI, C. M. **Morfologia e anatomia de sementes**. Rio Claro: UNESP, 1995. 112 p. Apostila.

BENÍTEZ-RODRIGUEZ, J.L.; OROZGO-SEGOVIA, A. ROJAS-ARÉQUIGA. Light effect on seed germination of four *Mammillaria* species from Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central México. **The Southwestern Naturalist**, v. 49, p. 11-17, 2004.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.

BEZERRA, M.A.; ALVES, J.D.; OLIVEIRA, L.E.M.; PRISCO, J.T. Morphologic characterization and mobilization of stored seed reserves during initial development of *Vigna unguiculata* (L.) Walp seedlings, v.34, p. 253-259, 2003.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds: **Physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BEWLEY, J.D. Seed Germination and Dormancy. **The plant cell**, vol.9, p. 1055-1066, 1997.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p. 911-917, 1959.

BORGES, E.E.L.; RENO, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PINÃ-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coord.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p.83-135.

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

BRITO, A.E.R.M.; MADEIRA, Z.R.; COSTA, F.A.P.C.; NUNES, E.P.; MATIAS, L.Q.; SILVA, F.H.M.S. **Vegetação Costeira do Nordeste Semi-árido-Guia Ilustrado**. Labomar: Coleção Habitat 1. UFC Edições, Fortaleza-CE, 2007, 274p.

BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. Mobilização de Reservas. In. FERREIRA, A.G.; BORGHETT, F (eds). **Germinação do básico ao aplicado**. Artmed: Porto Alegre, 2004, p. 251-262.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; DOS SANTOS, H.P.; LIMA, D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.137-162, 2000.

CARDOSO, V.J.M. Germinação e fotoblastismo de sementes de *Cucumis anguria*: influência da qualidade da luz durante a maturação e secagem. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.7, p. 75-80, 1995.

CARVALHO, J.E.U.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. **Jaboticabal**: Funep, 2000. 588 p.

CAVALCANTI, N.B.; RESENDE, G.M. Consumo do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.) por caprinos na época da seca do semi-árido de Pernambuco. **Revista Caatinga**, v. 19, p. 402-408. 2004.

CHIA, T.Y.P.; MARLYN, J.P.; RAWSTHONE, S. Storage oil breakdown during embryo development of *Brassica napus* (L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1285-1296, 2005.

COIMBRA, S.; SALEMA, R. *Amaranthus hypochondriacus*: Seed Structure and Localization of Seed Reserves. **Annals of Botany**, v. 74. p. 373 -379, 1994.

CORNER, E.J.H. **The seeds of dicotyledons**. London: Cambridge University, v.1, p.85, 1976.

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.A.; VENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A.A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, v.30, p.941-949, 2006.

CORTELAZZO, A.L.E; VIDAL, B.C. Soybean seed proteins: detections in situ and mobilization during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, v.14, p.7-33, 1991.

CORTELAZZO, A.L.; COUTINHO, J.; GRANJEIRO, P.A. Storage and ageing of french beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Effect on seed viability and vigor. **Brazilian Journal Morphology Science**,v.22, p. 121-128, 2005.

DANTAS, B.F.; CORREIA, J.S.; MARINHO, L.B.; ARAGAO, C.A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, p. 221-227, 2008.

DAVIS, H.V; SLACK, P.T. The control of food mobilization in seeds of dicotyledonous plants. **New Phytologist**, v.88, p. 41-51, 1981.

DE LA BARREIRA, E.; NOBEL, P. S. Physiological ecology of seed germination for the columnar cactus *Stenocereus queretaroensis*. **Journal of Arid Environments**, v. 53, p. 297-306, 2003.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

EASTMOND, P.J.; GRAHAN, I.A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oil seeds. **Trends in Plant Science**, v.6, 1360-1385, 2001.

FERRAZ-GRANDE, G; TAKAKI, M. Efeitos da luz, temperatura e estresse de água na germinação de sementes de *Caesalpinia Peltophoroides* Benth, **Bragantia**, v. 65, p. 37-42, 2006.

FERREIRA, G.F.; BORGHETTI, F. Interpretação dos resultados de germinação. In. FERREIRA A.G; BORGHETTI F (eds). **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre. Artmed., 2004, p. 251-262.

FU, Q. Proteomic analysis and extensive protein identification from dry, germinating Arabidopsis seeds and young seedlings. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, p.650-660, 2005.

GALLÃO, M.I.; DAMASCENO, L.F.; SOUSA DE BRITO, E. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, p. 106-109, 2006.

GALLÃO, M.I.; VIEIRA, I.G.P.; MENDES, F.N.P.; SOUZA, A.S.N.; DE BRITO, E.S. Reserve mobilisation in mesquite (*Prosopis juliflora*) seed (Leguminosae). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 2012-2018, 2007.

GERLACH, D. **Botanische Microtechnik**. Stuttgart: Georg Thieme, 1984.

GRAHAN, I.A. Seed storage oil mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p.115 -142, 2007.

GUERRA, M.E.C.; MEDEIROS-FILHO, S.; GALLAO, M.I. Morfologia de sementes, de plântulas e da germinação de *Copaifera langsdorfii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioidea), **Revista Cerne**, v.12, p.322-328, 2006.

IPECE, 2008. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Estado do Ceará. Disponível na internet no site: [www.ipece.ce.gov.br](http://www.ipece.ce.gov.br). Acesso em 10/08/2008.

HUNT, D.R.; TAYLOR, N.P.; CHARLES, G. **The New Cactus Lexicon**, 2 vols. (Text & Atlas). dh books, Milborne Port, U.K., 2006. 900 p.

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

KITAJIMA, K. Ecophysiology of tropical tree seedlings. In: MULKEY, S.S.; CHAZDON, R.L.; SMITH, A.P. **Tropical forest plant ecophysiology**. New York: Chapman & Hall, 1996. p.559-596.

KRAEMER, K.H.; KÂMPF, A.N.; ÁQUILA, M.E.A. Luz e temperatura na germinação de sementes de *Tibouchina urvilleana*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.6, p.39-45, 2000.

KROCHKO, J.E.; BEWLEY, J.D. Seed storage proteins in cultivars subspecies of alfafa (*Medicago sativa* L.). *Seed Science Research*, v.10, p.423-434, 2000.

LABOURIAU, L.G. **A germinação de sementes**. Washington: OEA, 1983. 174 p.

LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p.680-685, 1970.

LIMA, G.F.C. Alternativas de seleção e manejo de volumosos forrageiros para a atividade leiteira do Nordeste. In: **O Agronegócio do Leite no Nordeste: Alternativas Tecnológicas e Perspectivas de Mercado**, Natal, Anais... EMPARN/FIERN/SENAI, 1998. p.190-226.

LIMA, R.B.S.; GONÇALVES, J.F.C.; PANDO, S.C.; FERNANDES, V.; SANTOS, A.L.W. Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaedora* Ducke) seeds. **Revista Árvore**, v.32, n.1, p. 19-25. 2008.

LONE, A.B.; TAKAHASHI, L.S.A; FARIA de R.T.; UNEMOTO, LK. Germinação de *Melocactus bahiensis* (CACTACEAE) em diferentes substratos e temperaturas. **Scientia Agraria**, v. 8, p. 365-369, 2007.

LIMA, J.D.; ALMEIDA, C.C.; DANTAS, V.A.V.; SILVA, B.M.S.; MORAIS, W.S. Efeito da temperatura e do substrato na germinação de semente de *Caesalpiniae ferrea* MART. EXT TUL.(LEGUMINOSAE, CESAPINOIDEAE). **Revista Árvore**, v.30, p. 513-518, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A.M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP. 2002.

McCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H.S. Determination of starch and amylase in vegetables. **Anallitycal Chemistry**, v.22, p.1556-1558, 1950.

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

MAIA, V. Técnica histológica. Atheneu, SP, 1979.

MANDUJANO, M.C.; MONTAÑA, C. ROJAS-ARÉQUIGA. Breaking seed dormancy in *Opuntia rastrera* from the Chihuahuan desert. **Journal of Arid Enviroments**, v.62, p. 15-21, 2005.

MEI Yu-Qin; SONG Song-quan. Early morphological and physiological events occurring during germination of maize seeds. **Agricultural Sciences in China**, v.7 (8), p.950-957, 2008.

MENEZES, N.L.; FRANZINI, S.N; ROVERSI, T.; NUNES, E.P. Germinação de sementes de *salvia splendens* sellow em diferentes temperaturas e qualidades de luz. **Revista Brasileira de sementes**, v. 26, n.1, p. 32-37, 2004.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428, 1959.

MORS, W.B.; RIZINNI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal Plants of Brazil**, Reference Publications, Inc. Algonac, Michigan, 2000.

MUNTZ, K. Deposition of storage proteins. **Plant Molecular Biology**, v.38, p.77-99, 1998.

MUNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAVESKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMAN, J. Stored proteinases and the initiation of protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.1741-1752, 2001.

MURPHY, D.J.; HERNÁNDEZ-PIZÓN, I.; PATEL, K. Role of lipids bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.471-478, 2001.

MYERS, A.M.; MORELL, M.K.; JAMES, M.G.; BALL, S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology*, v.122, p. 989-997, 2000.

NOBEL, P.S. (1988). *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. New York, NY: Cambridge University Press. 270 pp.

NOBEL, P.S. **Cactus: Biology and Uses**. University of California Press, California. 304 p. 2002.

NOLASCO H; VEJA-VILLASANTE F; ROMERO-SCHIMIDT HL; DIAZ-RONDERO A. 1996. The effects of salinity, acidity, light and temperature on the germination of seeds of cardón (*Pachycereus pringlei* (S.Wats.) Britton & Rose, Cactaceae). **Journal of Arid Environments**, v. 33, p. 87-94.

OLSEN, O. A. endosperm development: cellularization and cell fate specification. **Annual Ver. Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 233-267, 2001.

ORTEGA-BAES P; ROJAS-ARÉCHIGA M. 2007. Seed germination of *Trichocereus terscheckii* (Cactaceae): Light, temperature and giberellinic acid effects. **Journal of Arid Environments**, v. 69, p. 169-176.

OSBORNE, T.B. **The Vegetable Proteins**. Monographs in Biochemistry, Longmans, Green and Co, London, 1924.

PEARSON, T. R. H.; BURSLEM, D. F. R. P.; MULLINS, C. E.; DALLING, J. W. Functional significance of photoblastic germination in neotropical pioneer trees: a seed's eye view. **Functional Ecology**, p. 394-402, 2003.

PIMIANTA-BARRIOS, E.; DEL CASTILLO, M.E.G. Ecophysiology of a wild platyopuntia exposed to prolonged drought. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47; p. 77-86, 2002.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, v. 11, p. 185-197, 2001.

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

PRISCO, J.T. Action of light on mandacaru-seed germination. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 26, n.3, p. 261-262, 1966.

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

RAMAKRISHNA, V. Mobilization of albumins and globulins during germination of Indian bean (*Dolichos lablab* L.var. *lignosus*) seeds. **Acta Bot.Croat.**, v. 66, n.2, p. 135-142, 2007.

RAMAKRISHNA, V.; RAMAKRISHNA R.; P. Axial control of protein reserve mobilization during germination of Indian bean (*Dolichos lablab* L.) seeds. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 49, p. 23-27, 2005.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 2001. 906 p.

RAMÍRES-PADILLA,C.A.; VALVERDE, T. Germination responses of three congeneric cactus species (*Neobuxbaumia*) with differing degrees of rarity. **Journal of Arid Environments**,v.61, p. 333-343, 2005.

ROCHA, E.A.; AGRA, M.F. Flora do Pico do Jabre, Paraíba, Brasil: Cactaceae Juss. **Acta Botânica Brasílica**, 16, v.1, p. 15-21, 2002.

ROCHA, E.A.; AGRA, M.F.; ZAPPI, D.C.; TAYLOR, N.P. Lista Anotada das Cactaceae no estado da Paraíba, Brasil. **Bradylea**, v.11, p. 61-68, 2006.

ROJAS-ARÉCHIGA, M., OROZCO-SEGOVIA, A.; VÁSQUEZ-YANES, C. (1997). Effect of light on the germination of seven species of cacti from the ZapotitlaHn Valley in Puebla, Mexico. **Journal of Arid Environments**, v. 36, p. 571–578, 1997.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; VÁSQUEZ-YANES, C. Cactus seed germination: a review. **Journal of Arid Enviroments**, v. 44, p. 85-104, 2000.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; CASAS, A.; VÁZQUEZ-YANES, C. Seed germination of wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central México. **Journal of Arid Environments**, v. 49, p. 279-287, 2001.

SANEST- Sistema de Análise Estatística do Instituto Agronômico de Campinas.(ano)

SILVA, T.R.G.; CORTELAZZO, A.L.; DIETRICH, M.C. Variations in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, p.119-124, 1998.

SILVA, J.G.M.; SILVA, D.S.; FERREIRA, M.A.; LIMA, G.F.C.; MELO, A.A.S.; DINIIZ, M.C.N.M. Xiquexique em substituição a silagem do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1408-1417, 2005.

SIMÃO, E.; SOCOLOWSKI, F; TAKAKI, M. The epiphytic Cactaceae *Hylocereus setaceus* (Salm-Dick ex DC.) ralf bauer seed germination is controlled by light and temperature. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p. 655-662, 2007.

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

STEFANELLO, R.; GARCIA, D.C.; MENEZES, N.L.; WRASSE, C.F. Influência da luz, temperatura e estresse hídrico na germinação e no vigor de sementes de anis. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, p. 45-50, 2006.

SUN, L.; LEOPOLD, A.C. Cytoplasmatic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 117A, p. 327-333, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002, 690 p.

TAYLOR, N.P.; ZAPPI, D.C. **Cacti of Eastern Brazil**, Royal Botanic Gardens, Kew, 2004, 499 p.

TAKAKI, M. New proposal of classification of seeds based on forms of phytochrome instead of photoblastism. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.13, p.103- 07, 2001.

TEIXEIRA, S. P.; MACHADO, S. R. Storage sites in seeds of *caesalpinia echinata* and *c. Ferrea* (leguminosae) with considerations on nutrients flow. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, v.51, p.127-136, 2008.

VIDAL BC. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. **Annalytical Histochemistry**, v. 15. p. 289-296, 1970.

VIDAL B. C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Molecular Biology**, v.22, p.45-64, 1977.

ZAIDAN, L.B.P.; BARBEDO, C.J. Quebra de dormência em sementes. In. FERREIRA, A.G.; BORGHETT, F (eds). **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed:, pp. 251-262, 2004.

ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M.; SMITH, A.M. The breakdown of starch in leaves. **New Phytologist**, v.163, p. 247-261, 2004.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. SANEST: sistema de análise estatística para microcomputadores. Campinas. Instituto Agronômico, 1984. SEI n° 066060.

YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of aminoacids with ninhidrin. **Analyst**, v.80, p.209-213. 1955.