

Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações - MCTIC
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA
Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais - PPG-CFT

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL E MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS
PRIMÁRIAS DURANTE A GERMINAÇÃO E O CRESCIMENTO INICIAL DE
PLÂNTULAS DE *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr de Juss.) Muell. Arg.**

JOSIANE CELERINO DE CARVALHO

Manaus – AM
Junho, 2017

JOSIANE CELERINO DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL E MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS
PRIMÁRIAS DURANTE A GERMINAÇÃO E O CRESCIMENTO INICIAL DE
PLÂNTULAS DE *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR de Juss.) Muell. Arg.**

Orientador: Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências de Florestas Tropicais, área de concentração Silvicultura Tropical.

**Manaus – AM
Junho, 2017**



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS

DEFESA PÚBLICA DISSERTAÇÃO / PPG-CFT - INPA

Ata da Defesa Pública da Dissertação de Mestrado de JOSIANE CELERINO DE CARVALHO aluno (a) do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS, realizada no dia 08 de junho de 2017.

Aos oito dias do mês de junho de 2017, às 14h30, na Sala de Aula do Programa de PG em Ciências de Florestas Tropicais, PPG-CFT, Campus III, INPA-V8, realizou-se a Defesa Pública da Dissertação de Mestrado intitulada: "CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL E MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS PRIMÁRIAS DURANTE A GERMINAÇÃO E O CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR de Juss.) Muell. Arg." em conformidade com o Artigo 68 do Regimento Interno do PPG-CFT e Artigo 52 do Regimento Geral da Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI-INPA) como parte final de seu trabalho para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS, área de concentração em *Manejo Florestal*. A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores doutores: WAGNER LUIZ ARAÚJO (UFV), RONISCLEY PEREIRA SANTOS (IFAM) e LARISSA RAMOS CHEVREUIL (INPA). O (a) Presidente da Banca Examinadora, Dr (a) José Francisco de Carvalho Gonçalves (Orientador/INPA), deu início à sessão convidando os senhores membros e o (a) Mestrando (a) a tomarem seus lugares e informou sobre os procedimentos a serem observados para o prosseguimento do exame. A palavra foi, então, facultada ao (à) Mestrando (a) que apresentou uma síntese do seu estudo e respondeu às perguntas formuladas pelos membros da Banca Examinadora. Depois da apresentação e arguição, a referida Banca Examinadora se reuniu e decidiu por

Aprovar

A sessão foi encerrada às *17h15*, para constar eu, Valdecira Azevedo, Secretária do PPG-CFT lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada foi assinada pelo Presidente e membros da Banca Examinadora. Banca Examinadora:

Dr (a) WAGNER LUIZ ARAÚJO

Aprovado (a) Reprovado (a)

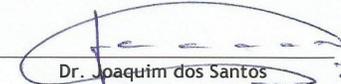
Dr (a) RONISCLEY PEREIRA SANTOS

Aprovado (a) Reprovado (a)

Dr (a) LARISSA RAMOS CHEVREUIL

Aprovado (a) Reprovado (a)


Dr. José Francisco C. Gonçalves
Presidente da Banca/Orientador


Dr. Joaquim dos Santos
Vice-Coordenador do PPG-CFT

FICHA CATALOGRÁFICA

C331 Carvalho , Josiane Celerino de

Caracterização morfofuncional e mobilização de reservas primárias durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas de *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr de Juss.) Muell. Arg. / Josiane Celerino de Carvalho . --- Manaus: [s.n.], 2017. 135 f.: il.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2017.

Orientador: José Francisco de Carvalho Gonçalves

Área de concentração: Ciências de Florestas Tropicais

1. Seringueira . 2.Morfologia . 3. Cultivo in vitro . I. Título.

CDD 633.8952

Sinopse:

Atributos morfofisiológicos, bioquímicos e propagação *in vitro* de sementes de *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. Adr de Juss.) Muell. Arg foram investigados durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas. Morfofisiologia, germinação e mobilização de reservas primárias foram analisadas com objetivo de verificar as alterações funcionais nas sementes selvagens e clone durante o processo germinativo.

Palavras-chave: Fisiologia da germinação, metabólitos primários e sementes florestais.

A DEUS

Aos meus pais, José e Rosangela

As minhas irmãs Joyce e Jovana

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais (PPG-CFT), pela oportunidade de realização dessa pesquisa.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e pelo financiamento desta pesquisa por meio do Projeto “Análises prospectivas de recursos vegetais da floresta Amazônica” Edital: 047-2012 Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade.

Ao meu orientador Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves, pelo apoio, incentivo e orientação no decorrer da condução da pesquisa e, principalmente, pelas contribuições ao meu aprendizado.

Aos meus professores Dr. Alisson Rodrigo de Souza Reis e José Wilson Pereira da Silva da Universidade Federal do Pará/Campus Altamira, pela amizade, incentivo e por acreditar no meu potencial.

A técnica Inês do Laboratório de Nutrição de peixes do INPA, pela oportunidade de desenvolver a extração de lipídeos em seu laboratório.

Ao Dr. Nivaldo e os técnicos Jhonas e Laura do Laboratório Temático de Solos do INPA, pela ajuda nas análises de macro e micronutrientes das sementes.

Aos meus amigos Daniel Anjos e Pedro Ferraz pelo apoio em adquirir as sementes de seringueira, que não mediram esforços para me ajudar nessa pesquisa.

Ao Duílio Andrade pela amizade, companheirismo e ajuda nas análises estatísticas.

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (INPA/LFBV), em especial ao Paulo Abraão, Rafaela Oliveira e Diego Souza pelo apoio em todas as análises bioquímicas, Rosineide Machado pelo apoio primordial na montagem dos experimentos de micropropagação de seringueira, Gleisson Nascimento pela amizade, companheirismo e ajuda nas análises de nutrientes, enzimas e análises estatísticas, Joelma Keith pelo apoio nas análises de histoquímica, Nayara Fonseca na montagem do experimento de sanidade, Adamir Nina Júnior pelo apoio a fisiologia, Jussara Lopes pela ajuda nas análises de carboidratos e aos estudantes de iniciação científica Leonardo Gomes e Bianca Carvalho pela ajuda no decorrer da pesquisa.

A todos (as) da secretaria do PPG-CFT em especial a Ana Clycia e Valdecira Azevêdo pela amizade.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

RESUMO

Considerando os avanços dos estudos com *Hevea brasiliensis* e a implementação de programas de melhoramento, a propagação desta espécie tem sido recomendada pelo emprego da enxertia. Entretanto, os estudos com sementes completas ou partes delas (embriões) não devem ser negligenciados uma vez que, mantendo a utilização dos clones para aperfeiçoar a produção, pesquisas de caracterização genética, bioquímica e funcional, além do vigor e da sanidade do material propagado podem contribuir para verificar a formação completa das plantas por via sexuada (germinação das sementes) e assexuada (cultivo de embrião *in vitro*) visando a seleção de indivíduos mais equilibrados em termos de rusticidade e produção. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar as implicações da morfologia e origem das sementes de *H. brasiliensis* sobre a germinação e a formação das plântulas, do ponto de vista morfológico, histoquímico, fisiológico e bioquímico. As sementes utilizadas foram categorizadas como oriundas de matrizes selvagens e de clone e foram coletadas nos municípios de Altamira-Pa e Belterra-Pa, respectivamente. As sementes após assepsia foram submetidas às análises morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, além do cultivo "*in vitro*". Do ponto de vista morfológico, as sementes de *H. brasiliensis* selvagens e de clone apresentaram diferenças quanto ao tamanho e coloração, sendo as sementes selvagens maiores e de coloração mais escuras. Quanto à morfologia da germinação, não apresentaram diferenças. Considerando a viabilidade das sementes, as mesmas não apresentaram diferenças nos teores de umidade, provavelmente, devido à alta umidade as sementes apresentaram proliferação de fungos, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., que causam deterioração em sementes. Em relação à fisiologia da germinação, as sementes apresentaram padrão trifásico, porém com diferenças em relação à velocidade de embebição, sendo que as sementes selvagens absorveram água de forma mais lenta do que o clone, quanto ao ganho de massa fresca das sementes não houve diferença. Do ponto de vista bioquímico, a constituição das reservas foi similar tanto para sementes selvagens, quanto para de clone. Dentre os metabólitos primários, os lipídeos, correspondem às reservas majoritárias estocadas no endosperma de sementes da espécie *H. brasiliensis* selvagem e clone e foram mobilizados durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas. Nas sementes selvagens e clone as proteínas também foram mobilizadas durante a germinação e crescimento inicial de plântulas. As proteínas solúveis foram mobilizadas no início da germinação e exibiram bandas proteicas nas faixas de 7 a 30 kDa que podem estar associadas as principais proteínas de síntese do látex. As reservas de açúcares solúveis foram mobilizadas mais intensamente no início da germinação e o amido no início do crescimento inicial das plântulas. Nas sementes selvagens e clone os nutrientes fósforo (P) e o potássio (K) foram mobilizados no início da germinação e crescimento inicial de plântulas, cálcio (Ca) são mobilizados no início da germinação e, nitrogênio (N) e magnésio (Mg) durante o crescimento inicial das plântulas. Quanto aos micronutrientes, o ferro (Fe) foi mobilizado no início da germinação e crescimento inicial das plântulas, manganês (Mn) é pouco mobilizado durante a germinação e o zinco (Zn) é mobilizado no início do crescimento inicial das plântulas. As sementes selvagens e clone apresentaram comportamento e estratégias distintas de

mobilização dos metabólitos primários e minerais durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. As estruturas morfológicas das plântulas *in vitro*, hipocótilo, parte radicular (raiz primária e secundária), epicótilo e eófilos apresentam tamanhos diferentes quando comparadas a estas mesmas estruturas das sementes germinadas em areia. O cultivo de embriões zigóticos apresentaram porcentagens de germinação próximas às sementes germinadas em areia, fato que pode tornar vantajosa a propagação da espécie em larga escala. Os protocolos de desinfestação foram eficazes para a baixa contaminação dos embriões. Maior média de comprimento de parte aérea foi em meio de cultivo com reguladores de crescimento BAP e parte radicular, com regulador de crescimento AIA. Os maiores teores de proteínas na parte aérea e radicular foram observadas no meio de cultivo MS e com regulador AIA. Os tecidos de plântulas de *H. brasiliensis*, parte aérea e radicular exibiram bandas proteicas nas faixas de 7 a 30 kDa, que podem estar associadas as principais proteínas de síntese do látex. Considerando os resultados obtidos neste trabalho sugere-se que é possível se produzir plântulas saudáveis e com perspectivas de inferir sobre o início da síntese de látex com foco em futuros estudos destas biomoléculas.

PALAVRAS-CHAVE: morfologia, metabólitos primários e cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Considering the advances of the studies with *Hevea brasiliensis* and the implementation of breeding programs, the propagation of this species has been recommended by the use of grafting. However, complete seed or parts thereof (embryos) should not be neglected since, while maintaining the use of clones to improve production, genetics, biochemistry and functional characterization, in addition to the vigor and sanity of the propagated material may contribute to the complete formation of the plants by sexual (seed germination) and asexual (embryo culture *in vitro*) for the selection of individuals more balanced in terms of rusticity and production. Thus, the objective of this work was to investigate the implications of the morphology and origin of the *H. brasiliensis* seeds on germination and seedling formation, from the morphological, histochemical, physiological and biochemical point of view. The acquired seeds were categorized as coming from wild and clone matrices and were collected in Altamira-Pa and Belterra-Pa city's, respectively. The seeds after asepsis were submitted to morphological, physiological and biochemical analyzes, beyond cultivation "*in vitro*". From the morphophysiological point of view, the seeds of wild and clone *H. brasiliensis* showed differences in size and color, being wild seeds larger and darker in color. There were no differences in germination morphology. Considering the viability of the seeds, they did not present differences in the moisture contents, and probably due to the high humidity the seeds showed proliferation of fungi, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., that cause deterioration in seeds. Regarding the germination physiology, the seeds showed a pattern of the three-phase model, but were different in relation to the soaking speed, and the wild seeds absorbed water more slowly than clone, but gain of fresh weight were no different between them. From the biochemical point of view, the constitution of the reserves were similar for both wild and clone seeds. Among the primary metabolites, the lipids correspond to the majority reserves stored in the endosperm of the seeds of the wild *H. brasiliensis* and clones individuals, being mobilized during germination and initial seedling growth. In the wild and clone seeds the proteins were also mobilized during germination and initial seedling growth and the soluble proteins were mobilized at the beginning of germination and exhibited protein bands in the bands of 7 to 30 kDa that may be associated with the main proteins of synthesis of the latex. Soluble sugar reserves were mobilized more intensely at the beginning of germination and starch at the beginning of seedling initial growth. In wild seeds and clone the nutrient phosphorus (P) and potassium (K) were mobilized at the beginning of germination and initial seedling growth, calcium (Ca) are mobilized at the beginning of germination, nitrogen (N) and magnesium (Mg) are mobilized in the initial growth of the seedlings. For micronutrients, the iron (Fe) was mobilized at the beginning of germination and initial growth of manganese (Mn) is poorly mobilized during germination and zinc (Zn) is mobilized at the beginning of initial seedling growth. The seeds and clone showed behavior and strategies mobilization of the primary metabolites and minerals during the germination and initial seedling growth. Morphological structures of the *in vitro*, hypocotyl, radicular (primary and secondary root) epicotyl and eophile present different sizes when compared to these same structures of seeds germinated in sand. The cultivation of zygotic embryos presented germination percentages closed to seeds germinated in sand, which may propagation of the species on a large scale. The disinfection protocols were effective for the low contamination of the embryos. Highest mean of aerial part length was in culture medium with BAP growth and root part, with AIA growth regulator. The higher levels of protein in shoot and root observed in the culture media AIA and MS. The tissues of *H.*

brasiliensis, aerial part and radicular showed protein bands in the bands from 7 to 30 kDa, which may be associated with the main proteins of the latex synthesis. Considering the results obtained in this work it is suggested that it is possible to produce healthy seedlings and perspectives to infer about the beginning of latex synthesis with a focus on future studies of these biomolecules.

KEY WORDS: morphology, primary metabolites and *in vitro* culture.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.1 Objetivo específico	23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

CAPÍTULO I.....	26
Caracterização morfológica, histoquímica e fisiológica durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas de <i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. Ex ADR de Juss.) Muell. Arg. (Euphorbiaceae)	

RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Localização e caracterização da área de coleta.....	30
2.2 Beneficiamento das sementes	32
2.3 Biometria e grau de umidade das sementes	32
2.4 Teste de sanidade.....	33
2.5 Morfologia da germinação	33
2.6 Curva de embebição	34
2.7 Teste de germinação.....	34
2.8 Testes histoquímicos.....	35
2.9 Análises estatísticas.....	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1 Biometria e grau de umidade das sementes	36
3.2 Teste de sanidade.....	37
3.3 Morfologia da germinação	39
3.4 Curva de embebição	43
3.5 Teste de germinação.....	44
3.6 Testes histoquímicos.....	46
4. CONCLUSÃO	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

Capítulo II.....	61
Mobilização de reservas primárias durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas de <i>Hevea brasiliensis</i>	

RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1 Material vegetal	66

2.2	Extração e quantificação de Lipídeos.....	68
2.3	Extração e quantificação de proteínas totais.....	68
2.4	Extração e quantificação de proteínas solúveis	68
2.4.1	SDS-PAGE.....	69
2.5	Análise de carboidratos.....	69
2.5.1	Extração de açúcares solúveis totais e amido.....	69
2.5.2	Quantificação de açúcares solúveis totais e amido	70
2.6	Extração e quantificação de P.....	70
2.7	Extração e quantificação de N.....	70
2.8	Extração e quantificação de K, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn	71
2.9	Atividade da lipase (EC 3.1.1.3).....	71
2.10	Atividade da atividade proteolítica total	71
2.11	Atividade da atividade da α -amilase (EC. 3.2.1.1).....	72
2.12	Atividade da atividade da fosfatase ácida (EC. 3.1.3.2)	72
2.13	Delineamento experimental e análises estatísticas	73
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.1	Lipídeos.....	76
3.2	Proteínas	78
3.2.1	Proteínas totais e solúveis.....	81
3.2.2	Perfil proteico	81
3.3	Açúcares solúveis.....	83
3.4	Amido	85
3.5	Nutrientes minerais	86
3.6	Atividades enzimáticas durante a germinação	90
3.7	Atividade da lipase	91
3.8	Atividade proteolítica total	92
3.9	Atividade da α -amilase	93
3.10	Atividade da fosfatase ácida.....	94
4.	CONCLUSÃO	96
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
CAPÍTULO III.....		105
Efeito de diferentes reguladores de crescimento na germinação e no estabelecimento de plântulas <i>in vitro</i> a partir de embriões zigóticos de <i>Hevea brasiliensis</i>		
RESUMO.....		106
ABSTRACT.....		107
1. INTRODUÇÃO		108
2. MATERIAL E MÉTODOS		110
2.1	Material vegetal	110
2.1.1	Procedência do material biológico.....	110
2.1.2	Condução do experimento	111
2.1.3	Assepsia das sementes.....	111
2.1.4	Preparação dos meios de cultivo MS e reguladores de crescimento	111
2.1.5	Inoculação dos eixos embrionários	112
2.1.6	Condução do experimento e coleta de dados	112
2.1.7	Morfologia da germinação	113
2.2	Extração de proteínas solúveis	113
2.3	Quantificação de proteínas solúveis.....	114

2.4 SDS-PAGE	114
2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas	114
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	129
3.1 Caracterização morfológica	114
3.2 Germinação	114
3.3 Crescimento de plântulas	114
3.4 Proteínas solúveis e perfil proteico	114
4. CONCLUSÃO	129
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
6. CONCLUSÃO GERAL	134

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Caracterização química do solo das áreas de coletas de sementes, no Estado do Pará.....32

Tabela 2. Características biométricas e grau de umidade de sementes de *Hevea brasiliensis* oriundas de área nativa e plantada.....35

Tabela 3. Principais fungos encontrados em sementes de *H. brasiliensis* oriundas de área nativa e plantada.....37

CAPÍTULO II

Tabela 1. Reservas de sementes *H. brasiliensis* de sementes selvagem e clone.75

Tabela 2. Trabalhos publicados sobre quantificação de reservas em sementes *Hevea brasiliensis* nos últimos 10 anos.....75

CAPÍTULO III

Tabela 1. Médias de porcentagem, índice de velocidade e tempo médio de germinação, emissão da parte radicular, alongamento da raiz secundária e primária, emissão do epicótilo e dos eofilos de plântulas de *H. brasiliensis* em meio MS com diferentes reguladores de crescimento.....128

Tabela 2. Médias de comprimento da parte aérea (CPA), raiz secundária (CRS), raiz primária (CRP), hipocótilo (CH), diâmetro do colo (DC) e número de folhas (NF) de plântulas de *H. brasiliensis* em meio MS com diferentes reguladores de crescimento 124

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1:** Mapa de localização das áreas de coleta de sementes de *Hevea brasiliensis*, tanto de sementes selvagens e de clone, no estado do Pará.31
- Figura 2:** Identificação de fungos em sementes de *H. brasiliensis* e visualização de suas estruturas. A, B' *Aspergillus* sp; C, D' *Penicillium* sp; E, F'; *Cladosporium* sp; E, E' *Fusarium* sp... ..42
- Figura 3:** Morfologia da semente e dos estádios germinativos de *H. brasiliensis*. (A) parte externa da semente selvagem. (B) parte externa da semente de clone. (C) corte longitudinal da semente, endosperma e embrião (cotilédones e eixo embrionário). (D) emissão de primórdios radiculares. (E) emissão da raiz secundária (F) alongamento da raiz secundária. (G) alongamento da raiz primária e início de expansão dos pecíolos cotiledonares. (H) emissão do epicótilo. (I) emissão dos eofilos. (J) aparecimento da gema apical. (K), (L), (M) e (N) expansão dos eofilos. (O) expansão total dos eofilos. *(te) tegumento. (tg) tégmém. (ed) endosperma. (co) cotilédone. (e) eixo embrionário. (hp) hipocótilo. (pr) primórdios radiculares. (rs) raiz secundária. (rp) raiz primária. (pl) plúmula. (ep) epicótilo. (le) lenticelas. (pc) pecíolo cotiledonar. (pe) pecíolo. (fo) folíolo43
- Figura 4:** (A) Curva de embebição e (B) massa fresca de sementes de *H. brasiliensis* selvagem (●) e clone (○). As setas indicam emissão dos primórdios radiculares.43
- Figura 5:** (A) Porcentagem de germinação (%) e (B) índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes selvagem e clone.....45
- Figura 6:** Seções longitudinais de endosperma de sementes selvagens de *H. brasiliensis* submetidas ao teste com Sudan Black para identificação de lipídeos. (A) semente quiescente. (B) semente embebida. (C) primórdios radiculares. (D) alongamento de raiz secundária. (E) alongamento de raiz primária. (F) emissão do epicótilo (G) emissão dos eofilos. (H) expansão dos eofilos... ..49
- Figura 7:** Seções longitudinais de endosperma de sementes de clone de *H. brasiliensis* submetidas a teste com Sudan Black para identificação de lipídeos. (A) semente quiescente. (B) semente embebida. (C) primórdios radiculares. (D) alongamento de raiz secundária. (E) alongamento de raiz primária. (F) emissão do epicótilo (G) emissão dos eofilos. (H) expansão dos eofilos... ..50
- Figura 8:** Seções longitudinais de endosperma de sementes selvagens de *H. brasiliensis* submetidas a teste com Xilidine Ponceau para identificação de proteínas totais. (A) semente quiescente. (B) semente embebida. (C) primórdios radiculares. (D) alongamento de raiz secundária. (E) alongamento de raiz primária. (F) emissão do epicótilo (G) emissão dos eofilos. (H) expansão dos eofilos51
- Figura 9:** Seções longitudinais de endosperma de sementes de clone de *H. brasiliensis* submetidas a teste com Xilidine Ponceau para identificação de proteínas totais. (A) semente quiescente. (B) semente embebida. (C) primórdios radiculares. (D) alongamento de raiz secundária. (E) alongamento de raiz primária. (F) emissão do epicótilo (G) emissão dos eofilos. (H) expansão dos eofilos.52
- Figura 10:** Seções longitudinais de endosperma de sementes selvagens de *H. brasiliensis* submetidas a teste com lugol para identificação de amido. (A) semente quiescente. (B) semente embebida. (C) primórdios radiculares. (D) alongamento de raiz secundária. (E) alongamento de raiz primária. (F) emissão do epicótilo (G) emissão dos eofilos. (H) expansão dos eofilos53

Figura 11: Seções longitudinais de endosperma de sementes de clone de *H. brasiliensis* submetidas a teste com lugol para identificação de amido. (A) semente quiescente. (B) semente embebida. (C) primórdios radiculares. (D) alongamento de raiz secundária. (E) alongamento de raiz primária. (F) emissão do epicótilo (G) emissão dos eofilos. (H) expansão dos eofilos..54

CAPÍTULO II

Figura 1: Figura 1. Estádios de germinação e eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Hevea brasiliensis*. (A) Selvagem. (B) Clone. (SQ): sementes quiescentes. (SE): sementes embebidas, após 24 horas de embebição. (PR): primórdios radiculares. (RS): alongamento da raiz secundária. (RP): alongamento da raiz primária. (EP): emissão do epicótilo. (EO): emissão dos eofilos. (EO-EX): expansão dos eofilos. Pré-germinação: SQ. Germinação: SE e PR. Pós-germinação: RS, RP, EP, EO e EO-EX..67

Figura 2: (A) Alterações nos teores de lipídeos em sementes de *H. brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. (B) teor de lipídeos em semente selvagem. (C) teor de lipídeos em semente de clone. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (SE), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX)..77

Figura 3: (A) Alterações nos teores de proteínas totais em sementes de *H. brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. (B) teor de proteínas totais em semente selvagem. (C) teor de proteínas totais em semente de clone. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (SE), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX).79

Figura 4: (A) Alterações nos teores de proteínas solúveis em sementes de *H. brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. (B) teor de proteínas solúveis em semente selvagem. (C) teor de proteínas solúveis em semente de clone. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (SE), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX).80

Figura 5: Perfil eletroforético dos extratos proteicos durante a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de *H. brasiliensis* selvagem e clone. M- marcador de massa molecular (kDa). SQ- semente quiescente. SE- semente embebida. PR- parte radicular. RS- alongamento da raiz secundária. RP- alongamento da raiz primária. EP- emissão do epicótilo. EO- emissão dos eofilos. EO-EX- eofilos expandidos.82

Figura 6: Alterações nos teores dos açúcares solúveis em sementes de *H. brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. (B) teor de açúcares solúveis em semente selvagem. (C) teor de açúcares solúveis em semente de clone. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (SE), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX)...84

Figura 7: Alterações nos teores de amido em sementes de <i>H. brasiliensis</i> selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. (B) teor de açúcares solúveis em semente selvagem. (C) teor de açúcares solúveis em semente de clone. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (SE), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX).....	89
Figura 8: Alterações nos teores de macro e micronutrientes de <i>H. brasiliensis</i> selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. (A) Fósforo. (B) Nitrogênio. (C) Potássio. (D) Cálcio. (E) Magnésio. (F) Ferro. (G) Zinco. (H) Manganês. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (SE), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX).	89
Figura 9: Alteração nos teores de atividade específica da lipase em sementes de <i>H. brasiliensis</i> selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (SE), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX).....	91
Figura 10: Atividade proteolítica total em sementes de <i>H. brasiliensis</i> selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (SE), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX).....	92
Figura 11: Atividade da α -amilase em sementes de <i>H. brasiliensis</i> selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (SE), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX).....	93
Figura 12: Atividade da fosfatase ácida em sementes de <i>H. brasiliensis</i> selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (SE), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX).....	95
Figura 13: Análise de componentes principais (PCA) considerando as variáveis: metabólitos primários (lipídeos, carboidratos, proteínas e nutrientes) e enzimas (lipase, proteases, α -amilase e fosfatase ácida) em sementes de <i>H. brasiliensis</i> . Polígono verde: clone; Polígono azul: selvagem.....	95

CAPÍTULO III

Figura 1: Sala de crescimento de cultura de tecidos.....	115
Figura 2: Estádios de germinação e estabelecimento das plântulas <i>in vitro</i> de <i>Hevea brasiliensis</i> . (en): eixo embrionário entumescido. (hp): hipocótilo. (pr): parte radicular. (rp): raiz primária. (rs): raiz secundária. (ep): epicótilo. (eo): eofilo.	115
Figura 3: Médias de Porcentagem. (A) germinação, (B) emissão parte radicular, (C) alongamento raiz secundária (D) e primária, (E) emissão do epicótilo (F) e dos eofilos.	119

Figura 4: Contaminação dos explantes em meio MS com diferentes reguladores de crescimento.....	120
Figura 5: Parte aérea e sistema radicular de plantas de <i>H. brasiliensis</i> em meio MS com diferentes reguladores de crescimento. A) Murashige & Skoog (MS). B) Ácido indol acético (AIA). C) Benzilaminopurina (BAP). D) Interação AIA x BAP.	123
Figura 6: Alterações nos teores de proteínas solúveis em tecidos de plântulas de <i>H.brasiliensis in vitro</i> em diferentes meios de cultivo. Parte aérea (■) e radicular (□).	126
Figura 7: Perfil eletroforético dos extratos proteicos provenientes de parte aérea e radicular de plântulas de <i>H. brasiliensis in vitro</i> . M- marcador de massa molecular (kDa). (1) MS- parte aérea. (2) MS- parte radicular. (3) AIA- parte aérea. (4) AIA- parte aérea. (5) BAP- parte aérea. (6) BAP- parte radicular. (7) AIA x BAP- parte aérea. (8) AIA x BAP- parte radicular.....	127

1. INTRODUÇÃO GERAL

Espécies do gênero *Hevea* pertencem à família botânica Euphorbiaceae e estão distribuídas por toda a Amazônia Brasileira, bem como na Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela, Equador, Suriname e Guiana. Das onze espécies do gênero, a originária do Brasil, *Hevea brasiliensis*, é a que tem a maior capacidade produtiva de látex e maior variabilidade genética e produz importantes polímeros que atende a maioria dos requisitos de borracha natural do mundo (Costa, 2001; Francisco *et al.*, 2004; Gireesh *et al.*, 2017). No entanto, as propriedades biopolímeras do látex são únicas e não podem ser replicadas por alternativas sintéticas, o que torna o látex das seringueiras naturais até agora a matéria-prima insubstituível para muitas aplicações (Krickl *et al.*, 2017).

Em regiões da Amazônia, onde períodos secos são menos rígidos, a queda de folhas e o florescimento são irregulares. Em seringueiras de cultivo nas regiões não tradicionais como as do sudeste do Brasil, a senescência ocorre no período de agosto a setembro e as inflorescências aparecem nas extremidades dos galhos, simultaneamente ao lançamento das folhas novas, existindo somente uma floração anual (Guiducci, 2014).

Com a importância da borracha natural e estudos sobre as propagações de clones mais produtivos, pesquisas com a seringueira estão voltadas principalmente para a produção de látex, uma vez que essa espécie é propagada principalmente via enxertia. Entretanto, os estudos com sementes também devem ser incrementados com vistas à caracterização genética, bioquímica e funcional na propagação de novos produtos, além do vigor e sanidade do material propagado (Andrade e Martins, 2003).

A falta de sementes melhoradas e a dificuldade de se obter conhecimento tecnológico a respeito da silvicultura da maioria das espécies tropicais limitam a adoção de práticas que favoreçam a produção em larga escala para novos empreendimentos. As sementes de seringueira apresentam características recalcitrantes, e perdem a viabilidade e o poder germinativo com maior facilidade. Assim, a baixa qualidade fisiológica detectada nesses propágulos deve-se, em grande medida, ao alto teor de água, que favorece a infestação por microrganismos e, a redução da sua viabilidade (Theodoro e Batista, 2014).

Então, percebe-se que a propagação por via sexuada já impõe limitações. Do ponto de vista técnico, além das técnicas de propagação convencionais da espécie,

seja sexuada ou assexuada, há também a micropropagação, ou propagação *in vitro*, que consiste na geração de uma nova planta a partir de sementes, fragmentos de tecido vegetal ou embriões (Andrade, 2002). A cultura *in vitro* possui diversas vantagens, tais como: a produção em grande escala em curto espaço de tempo (Carvalho e Vidal, 2003).

Independentemente, o fato da propagação atual para *H. brasiliensis* ser majoritariamente via enxertia verifica-se que o entendimento de características morfofisiológicas e histoquímicas das sementes podem resgatar importantes características ecofuncionais que não foram anteriormente consideradas nos programas de melhoramentos realizados. Diante disso, o processo de germinação desta espécie deve ser revisitado no sentido de acompanhar sistematicamente desde a embebição, quando os processos metabólicos e fisiológicos são retomados até o crescimento do embrião e ganhar forma para o estabelecimento de plântulas. Durante o processo de germinação, ocorrem mudanças na composição química da semente, onde o consumo de substâncias de reservas (carboidratos, lipídios e proteínas), fornece energia para a síntese de protoplasma e componentes estruturais essenciais para o desenvolvimento embrionário (Buckeridge *et al.*, 2004; Kerbauy, 2004; Nonogaki *et al.*, 2007).

A exigência nutricional para a maioria das espécies aumenta com o início da fase reprodutiva, sendo mais crítica por ocasião da formação da semente, quando grandes quantidades de nutrientes são translocados para esses propágulos sexuais (Salum *et al.*, 2008). Dessa forma, a disponibilidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos, influencia a formação do embrião e dos tecidos de reservas, assim como a composição química da semente, afetando, a sua qualidade (Carvalho e Nakagawa, 2000).

Nesse sentido, considerando a importância econômica de *H. brasiliensis* e que pouco se conhece a respeito dos mecanismos de propagação dessa espécie quanto a estudos envolvendo a morfofisiologia e a bioquímica da germinação até o estabelecimento de plântulas em ambiente convencional e *in vitro* torna-se importante “revisar” as bases conceituais do metabolismo das sementes e das plântulas, além de proporcionar a identificação e a caracterização desse modelo de estudo da fisiologia da germinação em sementes de diferentes materiais biológicos (selvagem e clone)”.

Para tanto, esta dissertação foi escrita em três capítulos, intitulados: (1) Caracterização morfofisiológica e histoquímica durante a germinação e desenvolvimento de plântulas de *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr de Juss) Muell. Arg. (Euphorbiaceae). (2) Mobilização de reservas primárias durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas de *Hevea brasiliensis*. (3) Efeito de diferentes reguladores de crescimento na germinação e no estabelecimento de plântulas *in vitro* a partir de embriões zigóticos de *Hevea brasiliensis*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar as implicações morfológicas de sementes de *Hevea brasiliensis* provenientes de matrizes selvagens e clone sobre a germinação e o crescimento inicial das plântulas, do ponto de vista histoquímico, fisiológico e bioquímico.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar as implicações das características morfofisiológicas e histoquímicas de sementes selvagens e clone durante a germinação e crescimento inicial das plântulas de *H. brasiliensis*.
- Determinar os aspectos bioquímicos relacionados à mobilização das reservas (proteínas, carboidratos, lipídeos e minerais) e atividades enzimáticas (α -amilase, proteases, lipase e fosfatase ácida) durante a germinação de sementes e crescimento inicial das plântulas de *H. brasiliensis*, proveniente de matrizes selvagens e clone.
- Estabelecer a cultura *in vitro* de *H. brasiliensis* e avaliar o efeito de diferentes dosagens dos reguladores de crescimento ácido-indol-3-acético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP) e suas interações, bem como verificar o perfil proteico das plântulas nas dosagens de reguladores de crescimento em meio MS.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, R.A.; Martins, A.B.G. 2003. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 25, n. 1, p. 134-136.
- Buckeridge, M.S.; Santos, H.P.; Tiné, M.A.S.; Aidar, M.P. 2004. Mobilização de reservas. In: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 324p.
- Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. 2000. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. Jaboticabal: FUNEP, 429p.
- Carvalho, J.M.F.C.; Vidal, M.S. 2003. Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais. 1 ed. Campina Grande, PB: EMBRAPA ALGODÃO, p. 39. (Embrapa Algodão. Documentos, n. 116).
- Costa, R.B.; Gonçalves, P de.S.; Rímole, A.O.; Arruda, E.J de. 2001. Melhoramento e conservação genética aplicada ao desenvolvimento local – o caso da seringueira (*Hevea sp*). *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, v. 1, n. 2, p. 51-58.
- Francisco, V.L.F.S.; Bueno, C.R.F.; Baptistella, C.S.L. 2004. A cultura da seringueira no Estado de São Paulo. *Informações Econômicas*, SP, v.34, n.9.
- Gireesh, T.; Meenakumari, T.; Kavitha, K.M. 2017. Fast track evaluation and selection of *Hevea brasiliensis* clones from a clonal Nursery. *Industrial Crops & Products* 103, 195–201.
- Guiducci, E.P. 2014. *Sistemas de produção de porta-enxertos de seringueira*. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal.
- Jacovine, L.A.G.; Nishi, M.H.; Silva, M.L.; Valverde, S.R.; Alvarenga, A.P. 2006. *A seringueira no contexto das negociações sobre mudanças climáticas globais*. IN: Alvarenga, A. P.; Carmo, C. A. F. S. (ed). Seqüestro de carbono: quantificação em seringais de cultivo e na vegetação natural, Viçosa-MG, 352 p.
- Kerbauy, G.B. 2004. *Fisiologia vegetal*. Universidade de São Paulo. p.386-408.
- Krickl, S.; Touraud, D.; Kunz, W. 2017. Investigation of ethanolamine stabilized natural rubber latex from *Taraxacum kok-saghyz* and from *Hevea brasiliensis* using zeta-potential and dynamic light scattering measurements. *Industrial Crops & Products* 103: 169–174.

- Nonogaki, H.; Chen, F.; Bradford, K.J. 2007. *Mechanisms and genes involved in germination sensu stricto*. In: Bradford, K. J.; Nonogaki, H. Seed development, dormancy and germination. Ames: Blackwell Publishing, p. 264-304.
- Theodoro, G de.F.; Batista, T.S. 2014. Detection of fungi in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) seeds harvested in northeast of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Agrarian*. v.7, n.24, p.365-368.

CAPÍTULO I

Caracterização morfofisiológica e histoquímica durante a germinação e o crescimento de plântulas de *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR de Juss) Muell. Arg. (Euphorbiaceae)

MORFOFISIOLOGIA DE SEMENTES DE *HEVEA BRASILIENSIS* DURANTE A GERMINAÇÃO E O CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS

RESUMO – O conhecimento das características morfofisiológicas e histoquímicas de sementes e plântulas podem auxiliar no entendimento dos processos fisiológicos associados ao crescimento das plântulas e sua propagação. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar as implicações das características morfofisiológicas e histoquímicas de sementes selvagens e de clone durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas de *Hevea brasiliensis*. As sementes selvagens e de clone foram coletadas em áreas localizadas nos municípios de Altamira-PA e Belterra-PA, respectivamente. Após a coleta e assepsia, as sementes foram submetidas às análises morfométricas (comprimento, largura e espessura), grau de umidade (sementes inteiras e cortadas), morfologia externas (dimensão, cor, textura e consistência dos tegumentos, forma, posição do hilo e da micropila, rafe e outras estruturas presentes) e internas (forma e posição do embrião, eixo hipocótilo-radícula, cotilédones, plúmula e presença de endosperma). Além disso, foi realizado teste de sanidade (sementes com e sem desinfestação), curva de embebição e teste de germinação (% , IVG e TM), assim como histoquímica (Sudam Black, para lipídeos totais, Xilidine Ponceau, para proteínas totais e Lugol, para amido). Do ponto de vista morfofisiológico, as sementes de *H. brasiliensis* selvagens e clone apresentaram diferenças quanto ao tamanho e a coloração, sendo as sementes selvagens maiores e de coloração mais escura. Quanto à morfologia da germinação não apresentaram diferenças. Sementes de procedências selvagens e do clone não apresentaram diferenças nos teores de umidade, que foram considerados altos e, provavelmente, por haver condições de temperatura e umidade houve a proliferação dos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Em relação à fisiologia da germinação, as sementes apresentaram padrão trifásico, porém foram diferentes em relação à velocidade de embebição, sendo que as sementes selvagens absorveram água de forma mais lenta quando comparadas as sementes do clone. Não se verificou diferença quanto ao ganho de massa fresca. As sementes selvagens apresentaram maior germinabilidade e velocidade de germinação em menor tempo quando comparada as sementes do clone, e do ponto de vista bioquímico, a constituição das reservas foram similares para ambas, e as reservas de lipídeos e proteínas foram mobilizadas durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. O amido foi mobilizado, principalmente, na fase de crescimento inicial das plântulas.

Palavras-chave: metabólitos primários, morfologia, propagação, sementes selvagens e de clone.

MORPHOPHYSIOLOGY OF HEVEA BRASILIENSIS SEEDS DURING GERMINATION AND INITIAL GROWTH OF SEEDS

ABSTRACT - The knowledge of morphological and histochemical characteristics of seeds and seedlings is important in the understanding of the physiological processes associated with seedling growth and its propagation. Thus, the objective of this study was to investigate the implications of morphological and histochemical characteristics of wild and clone seeds during germination and initial growth of *Hevea brasiliensis* seedlings. Wild and clone seeds were collected in areas located in the municipalities of Altamira and Belterra city's in Para, respectively. After the collection and asepsis, the seeds were submitted to morphometric analyzes (length, width and thickness), humidity degree (whole and cut seeds), external morphology (size, color, texture and consistency of the teguments, shape, thread position and (form and position of the embryo, hypocotyl-radicle axis, cotyledons, plumule and presence of endosperm). In addition, sanity test (seeds with and without disinfestation), imbibition curve and germination test (% , IVG and TM), as well as histochemistry (Sudam Black, for total lipids, Xilidine Ponceau, for total proteins and Lugol, for starch) were performed for each stage of germination and initial seedling growth. The seeds of wild *H. brasiliensis* and clone showed differences in size and color, being wild larger and darker colored seeds. There were no differences in germination morphology. Seeds of wild and clones did not present differences in moisture contents, which were considered high and probably because of the temperature and humidity conditions there was the proliferation of fungi, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. in relation to the physiology of germination, the seeds showed a pattern of the three-phase model, but were different in relation to the imbibition speed, being that wild seeds absorbed water in a slower way when compared to the clone's seeds, and for the gain of fresh mass did not presents differences. Wild seeds showed higher germinability, germination speed in less time when compared to clone seeds, and from the biochemical point of view, the constitution of the reserves were similar for both, and lipid and protein reserves were mobilized during germination and growth of seedlings. The starch was mobilized mainly in the initial seedling growth phase.

Key words: primary metabolites, morphology, propagation, wild and clone seeds's.

1. INTRODUÇÃO

O sucesso no estabelecimento das espécies depende do processo de germinação e de tolerância das plântulas suportarem condições adversas do meio de crescimento (Silva *et al.*, 2017). Na germinação de sementes, é essencial conhecer as condições ideais para que este processo ocorra de maneira adequada das espécies apresentarem respostas variadas em função de fatores internos e externos (dormência, viabilidade, variabilidade genética) e condições do ambiente (água, luz, temperatura e oxigênio) (Carvalho; Nakagawa, 2012).

A germinação é descrita como um processo que inicia com a embebição, o qual possibilita a reativação do metabolismo, assim como a retomada do crescimento do eixo embrionário, culminando com o rompimento do tegumento pela raiz primária (Labouriau, 1983; Martinez, 2011).

Após a germinação, processo que permite que o embrião cresça e evolua, as atenções se voltam para a estruturação do organismo fotossintetizante (Alencar *et al.*, 2015). Na pré-germinação aspectos morfológicos e mecanismos físico-químicos relacionados à absorção de água são importantes, assim o processo germinativo se inicia com a absorção de água pela semente quiescente, e termina com o início do alongamento do eixo embrionário, visualizado por meio da emergência de radículas e em seguida crescimento inicial das plântulas (Sánchez-Linares *et al.*, 2012; Bewley *et al.*, 2013). Então, todo o processo da fisiologia da germinação prevê o conhecimento de características pré e pós-germinativas, além do processo em si.

O processo de embebição de água pela semente desencadeia uma sequência de mudanças metabólicas que culminam com a protrusão da radícula, quando as sementes são viáveis e não dormentes (Carvalho e Nakagawa, 2000).

Segundo Zuchi *et al.*, (2012), a quantidade de água absorvida pela semente depende da espécie, cultivar, fatores ambientais e características fisiológicas e bioquímicas, o que são traduzidas em informações sobre composição química, teor de umidade inicial e a constituição do tegumento. Além dos fatores internos (longevidade, viabilidade e metabolismo), há os fatores externos que influenciam o processo germinativo, como por exemplo, água, oxigênio e temperatura. Esses fatores podem influenciar a germinação tanto por agir sobre a velocidade de absorção de água, quanto pela intensidade das reações bioquímicas que determinam todo o processo (Carvalho e Nakagawa, 2012).

Os atributos morfológicos das sementes e plântulas, bem como as características dos cotilédones como tamanho, função e posição no desenvolvimento inicial de plântulas influenciam na captação de recursos ambientais (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2001). As características morfológicas da semente, do embrião e das plântulas constituem critério taxonômico muito utilizado na identificação das plantas em nível de espécie, uma vez que para as angiospermas essas estruturas são pouco influenciadas pelo ambiente, possibilitando divergência entre espécies (Bravato, 1974 e Silva *et al.*, 1995).

A classificação das sementes por tamanho ou massa é uma estratégia que pode ser adotada para uniformizar a emergência das plântulas e para a obtenção de mudas de boa qualidade com padronização no que se refere ao tamanho e ao vigor (Silva *et al.*, 2012). Sementes maiores ou de maior densidade em uma mesma espécie são, potencialmente, mais vigorosas do que as menores, menos densas e originam plântulas mais desenvolvidas (Carvalho e Nakagawa, 2000).

As sementes de *Hevea brasiliensis* possuem características recalcitrantes, e perdem a viabilidade e o poder germinativo, o que inviabiliza seu armazenamento. Assim, a baixa qualidade fisiológica detectada nesses propágulos deve-se, em grande medida, ao alto teor de água e componentes do metabolismo, que favorecem a infestação por microrganismos e, a redução da sua viabilidade por longos períodos (Theodoro e Batista, 2014).

Diante disso, o conhecimento das características morfofisiológicas e histoquímicas de sementes e plântulas de *H. brasiliensis*, bem como conhecer as principais reservas presentes nas sementes, pode auxiliar no entendimento dos processos fisiológicos associados ao crescimento inicial das plântulas e sua propagação. Desta forma, este trabalho foi proposto com o objetivo de investigar as implicações das características morfofisiológicas e histoquímicas de sementes selvagens e clone durante a germinação e desenvolvimento das plântulas de *H. brasiliensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização e caracterização da área

Sementes provenientes de cinco matrizes de *Hevea brasiliensis* de área nativa foram coletadas em uma área localizada no Ramal Tatajuba km 17 da rodovia BR

230, município de Altamira-PA. As coletas foram realizadas no dia 22 e 23 de janeiro de 2016, estando as matrizes localizadas em áreas com as seguintes coordenadas geográficas S 03° 18' 05" e W 052° 17' 12". Adicionalmente, foi feita outra coleta de sementes provenientes de oito matrizes de *H. brasiliensis*, em área de plantio de seringueira, localizado próximo à rodovia BR 163, município de Belterra-PA, mesorregião do Baixo Amazonas. As coletas foram realizadas no dia 27 e 28 de janeiro de 2016 e as matrizes localizadas em áreas com as seguintes coordenadas geográficas S 02° 38' 17" e W 054° 58' 34" (Figura 1).

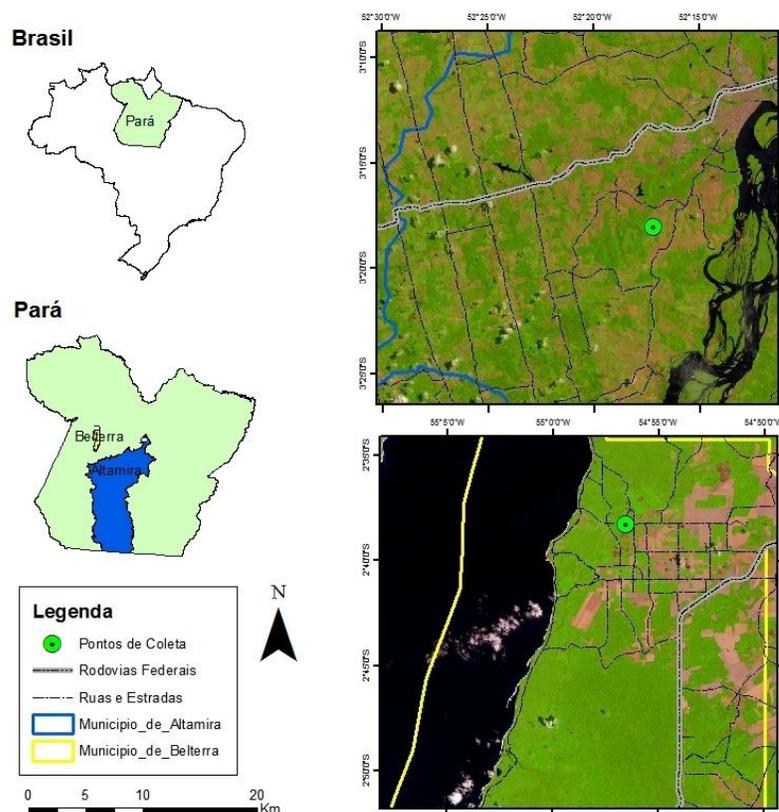


Figura 1. Mapa de localização das áreas de coletas de sementes selvagens e de clone de *Hevea brasiliensis*, no estado do Pará.

A área de coleta das sementes selvagens apresenta vegetação terra firme com predominância de latossolo vermelho com pH de 4,29 e a área de coleta de sementes de clone predomina plantio de seringueira com solo de terra preta de índio com pH 4,69 (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização química do solo das áreas de coletas de sementes, no Estado do Pará.

Local	Camadas (cm)	pH		N	P	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Al
		H ₂ O	KCl									
Altamira	0-20	4,29	3,53	0,06	6,31	0,1	0,25	0,11	75	0,4	2,4	7,18
	20-40	4,31	3,74	0,05	7,55	0,1	0,17	0,7	114	0,5	2,3	1,09
Belterra	0-20	4,11	4,69	0,24	2,25	0,1	0,15	0,24	18	1,2	2,8	1,69
	20-40	4,79	5,96	0,23	30,5	0,1	10,4	1,68	10	0,7	9,2	0,67

2.2 Beneficiamento das sementes

Após a coleta, as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV-INPA), local onde foram realizados o beneficiamento das sementes e a instalação dos experimentos envolvendo a caracterização morfológica das sementes (biometria e classificação das características externas e internas e histoquímica), caracterização tecnológica das sementes (determinação do grau de umidade, teste de sanidade, curva de embebição e teste de germinação).

2.3 Biometria e grau de umidade das sementes

As determinações biométricas foram realizadas com auxílio de paquímetro digital, com precisão de 0,01 mm, realizando-se três medidas padrão: comprimento, largura e espessura. Lotes de cem (100) sementes foram separadas ao acaso dos lotes de estudo (sementes de matrizes selvagens e clone). Nas medições, foram considerados como comprimento, a medida longitudinal entre o ápice e a base da semente, largura a medida da região mediana transversal ao comprimento e espessura medida da região mediana paralela ao comprimento. O grau de umidade das sementes quiescentes foi determinado pelo método da estufa a 105°C ±3°, durante 24 horas (Brasil, 2009). Para esse experimento foram utilizadas quatro (4) subamostras de 2,5g de sementes e a partir desse material biológico aplicou-se a equação:

$$\% \text{ (umidade)} = 100 * (P-p)/P-t$$

Onde:

P= peso inicial (peso do recipiente + peso da semente úmida);

p = peso final (peso do recipiente + peso da semente seca);

t= peso do recipiente com a tampa.

2.4 Morfologia da germinação

A caracterização morfológica das sementes de *H. brasiliensis* foi realizada em amostras de cinco (5) unidades de cada fase da germinação e formação da plântula. As observações foram executadas com auxílio de lupa binocular Carl Zeiss Stemi Dv4.

Características morfológicas externas (dimensão, cor, textura, consistência dos tegumentos, forma, posição do hilo e da micrópila, rafe e outras estruturas presentes) e internas (forma e posição do embrião, eixo hipocótilo-radícula, cotilédones, plúmula e presença de endosperma) foram descritas.

2.5 Teste de Sanidade

O isolamento e a identificação de patógenos associados às sementes de *H. brasiliensis* foram determinados conforme metodologia modificada de Brasil (2009). A detecção dos fungos nas sementes foi realizada pelo método do papel de filtro em caixas do tipo gerbox desinfestadas com álcool 70% (Blotter test). Nas caixas foram colocadas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada, esterilizadas em autoclave (121°C durante 20 minutos). As sementes foram submetidas à desinfestação superficial em álcool etílico 70% durante três minutos, seguido de hipoclorito de sódio a 1% durante cinco minutos e duas lavagens em água destilada para a retirada do excesso de álcool e hipoclorito e, então, depositadas sobre o papel filtro, cada gerbox continha 10 sementes. As caixas foram mantidas em estufas tipo Biochemical Oxygen Demand B.O.D. (fotoperíodo de 12 horas) em temperatura constante de 27°C, durante 7 dias. A identificação dos fungos foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópico e óptico, identificando os fitopatógenos em nível de gênero. Para esse experimento, foram utilizados quatro (10) repetições com 10 sementes.

2.6 Curva de embebição

Para a determinação da curva de embebição, foram utilizadas dez (10) repetições para cada tempo de embebição. Antes de iniciar a embebição, as sementes foram pesadas em balança analítica digital com precisão de 0,1 mg para obtenção do peso inicial. A embebição foi realizada em beakers contendo água destilada e mantida em temperatura de 30°C. As sementes foram pesadas a cada 2 horas durante o período de 12 horas e, subsequentemente, foram pesadas a cada 12 horas até atingir o ponto de saturação de água na semente e emissão de raiz. A curva de embebição foi calculada conforme metodologia descrita por Oliveira e Bosco (2013), utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$GP = (Pf - Pi/Pi) \times 100$$

Onde:

GP= ganho de peso

Pf= peso final (ganho de umidade a cada período de embebição).

Pi= peso inicial das sementes antes da embebição

2.7 Teste de Germinação

As sementes, após assepsia em hipoclorito de sódio 2% durante 2 minutos, foram acondicionadas em bandejas plásticas utilizando areia lavada como substrato e, colocadas para germinar em casa de vegetação à temperatura ambiente em torno de 29 e 30°C, com acompanhamento e contagem diária.

Nos tratamentos, foram calculadas as seguintes variáveis: porcentagem de germinação (G%), índice de velocidade de germinação (IVG), conforme metodologia de Biruel *et al.*, (2007) e tempo médio de germinação (TMG) de acordo com metodologia descrita por Labouriau e Valadares (1976), utilizando-se as seguintes equações:

$$(G\%) = (N/A). 100$$

Onde:

G = porcentagem de germinação;

N = número de sementes germinadas;

A = número total de sementes colocadas para germinar.

$$IVG = 1/t$$

Onde:

V = velocidade média de germinação;

t = tempo médio de germinação

$$(TMG) = (\sum n_i t_i) / \sum n_i$$

Onde:

t = tempo médio de incubação;

n_i = número de sementes germinadas por dia;

t_i = tempo de incubação (dias).

2.8 Testes histoquímicos

As amostras provenientes dos diferentes estádios de germinação, além da formação da plântula foram fixadas em FAA 70% durante 48 horas (Johansen, 1940) e, conservadas em álcool etílico 70% (Patiño, 1986). Posteriormente, foram desidratadas em série etílica (70, 80 e 90%), incluídas em 2-hidroxietil-metacrilato (HistoresinLeica®) durante sete dias. Depois foram emblocadas em histomoldes para resina até a formação dos blocos. Após a emblocagem, as amostras foram seccionadas em secções longitudinais em micrótomo rotativo (Zeiss Hyrax M25).

As amostras foram submetidas aos testes histoquímicos: detecção de lipídios, proteínas e carboidratos, Lugol para amido (Johansen, 1940); Xilidine Ponceau para proteínas totais (O'Brien e McCully, 1981) e Sudan Black para lipídios totais (Lison 1960). Para os testes histoquímicos foram utilizados cinco (5) repetições de cada estádio de germinação. As imagens de histoquímica foram realizadas em microscópio óptico (Zeiss Axio Lab.A1) com câmera fotográfica digital acoplada (Zeiss AxioCam ERc 5S) e microcomputador com o programa de captura de imagens (Axion Vision).

2.9 Delineamento e análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado sempre com dois (2) tratamentos e o número de repetições condizente com cada ensaio.

As análises estatísticas dos dados foram submetidas ao teste de normalidade (Shapiro Wilks) e homogeneidade de variância (teste F) e, atendendo essas premissas, foram realizadas análise de variância (ANOVA) e análises de regressão para obtenção de equações ajustadas das variáveis (porcentagem e velocidade de

germinação, curva de embebição e ganho de massa) em função do tempo. O programa estatístico utilizado para a realização das análises foi o SigmaPlot 12.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Biometria e grau de umidade das sementes

A caracterização biométrica das sementes de *Hevea brasiliensis* apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as sementes selvagens e clone, onde as sementes selvagens apresentaram maiores médias para as variáveis (largura, espessura, comprimento, massa e grau de umidade) (Tabela 2).

Tabela 2. Características biométricas e grau de umidade de sementes de *Hevea brasiliensis* selvagens e clone.

<i>Hevea brasiliensis</i>	Medidas (cm)				Umidade (%)	
	Largura	Espessura	Comprimento	Massa (g)	SC*	SI**
Selvagem	2,0 ± 0,10	2,1 ± 0,11	2,9 ± 0,11	3,2 ± 0,40	36 b	39 a
Clone	1,5 ± 0,12	1,6 ± 0,13	2,1 ± 0,14	1,9 ± 0,16	32 b	35 a

Médias ± Desvio Padrão / *Semente cortada ao meio e ** Semente inteira.

Resultados semelhantes foram encontrados para a mesma espécie, apresentando comprimento de 2,5-3 cm, largura de 2-2,5 cm, espessura de 1,9-2,1 cm e massa total da semente 2-4 g (Camargo *et al.*, 2008; Widyarani *et al.*, 2014).

O total das reservas de sementes disponíveis para a formação de uma plântula e a duração dessas reservas pode variar entre as espécies em relação a três características: tamanho das sementes (massa total da semente); qualidade das sementes (concentração de reservas); e a função principal dos cotilédones (material fotossintético ou órgão de reservas) (Alencar *et al.*, 2012).

Resultados semelhantes foram encontrados para a mesma espécie, em que os autores identificaram umidade em torno de 27% (Paula *et al.*, 1997). Esta informação está diretamente relacionada com a questão de longevidade de sementes, uma vez que as sementes de *H. brasiliensis* perdem a viabilidade quando a umidade cai abaixo de 15-20% (Chin *et al.*, 1981).

Sementes recalcitrantes apresentam dificuldades quanto ao armazenamento, pois não podem ser armazenadas com menos de 30% de umidade, por causar danos

devido às mesmas não apresentarem tolerância a baixas temperaturas. Assim, nessas condições, o metabolismo ainda é um processo ativo e contínuo mesmo em estado de repouso (quiescente), apresentando teor de água relativamente alto, variando entre 30-70% (Berjak e Pammenter, 2013). Adicionalmente, as espécies recalcitrantes necessitam manter o teor de água com que suas sementes foram colhidas, não suportando perdas superiores a 5% do teor de água inicial para manter sua viabilidade (Oliveira *et al.*, 2015).

As sementes recalcitrantes de espécies tropicais não podem ser armazenadas em temperaturas na faixa de 15-20°C, contudo, devem ser consideradas as peculiaridades de cada espécie, tais como características físicas das células e acúmulo de açúcares e oligossacarídeos (Bonome *et al.*, 2009).

3.2 Teste de sanidade

Considerando que as sementes de *H. brasiliensis* são recalcitrantes e possuem grau de umidade alto é possível que ao relacionar umidade e temperatura contribua para presença de fungos. Neste estudo, os fungos encontrados com maior frequência nas sementes de *H. brasiliensis* foram: *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. (Figura 2), cerca de 52% para sementes selvagens e 16% para do clone. Nas sementes selvagens os principais fungos encontrados foram: *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., já para as sementes de clone apenas o *Aspergillus* sp.; *Fusarium* sp. (Tabela 3).

Tabela 3. Principais fungos encontrados em sementes de *Hevea brasiliensis* selvagens e clone.

Fungos	Sementes	
	Selvagem	Clone
<i>Aspergillus</i> sp	+	+
<i>Penicillium</i> sp	+	-
<i>Cladosporium</i> sp	+	-
<i>Fusarium</i> sp	+	+

(-) ausente e (+) presente

Resultados similares foram relatados para ocorrência de fungos do gênero *Fusarium* sp com a maior incidência em sementes de *H. brasiliensis*, assim como fungos de armazenamento pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e

Rhizopus sp, uma vez que são fungos presentes em solos, possibilitando a infestação das sementes coletadas (Theodoro e Batista, 2014; Fonseca e Freire, 2003). Considerando que, sementes de *H. brasiliensis* possuem dispersão barocórica, ou seja, é dispersa a longa distância e tem contato direto com o solo é possível que devido a isso as mesmas apresentem maior incidência de fungos. Adicionalmente, fungos do gênero *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp., foram identificados como agentes causadores de deterioração em sementes de *H. brasiliensis* (Igeleke e Omorusi, 1997).

Além de causar redução na capacidade germinativa e mortalidade das plântulas, os fungos presentes nas sementes podem influenciar no aumento progressivo de doença das plântulas no campo, podendo reduzir o valor comercial das culturas (Henning, 2005). Assim, sementes infectadas podem disseminar patógenos para áreas antes livres de doenças. Diante disso, a realização de testes de sanidade torna-se essencial para esclarecer, entre outras causas, potenciais implicações da baixa germinação em amostras com elevados índices de infecção/infestação por microrganismos. Conhecendo os microrganismos, pode ser feito um controle fungicida para evitar a infestação e, assim, aumentar as taxas de germinabilidade.

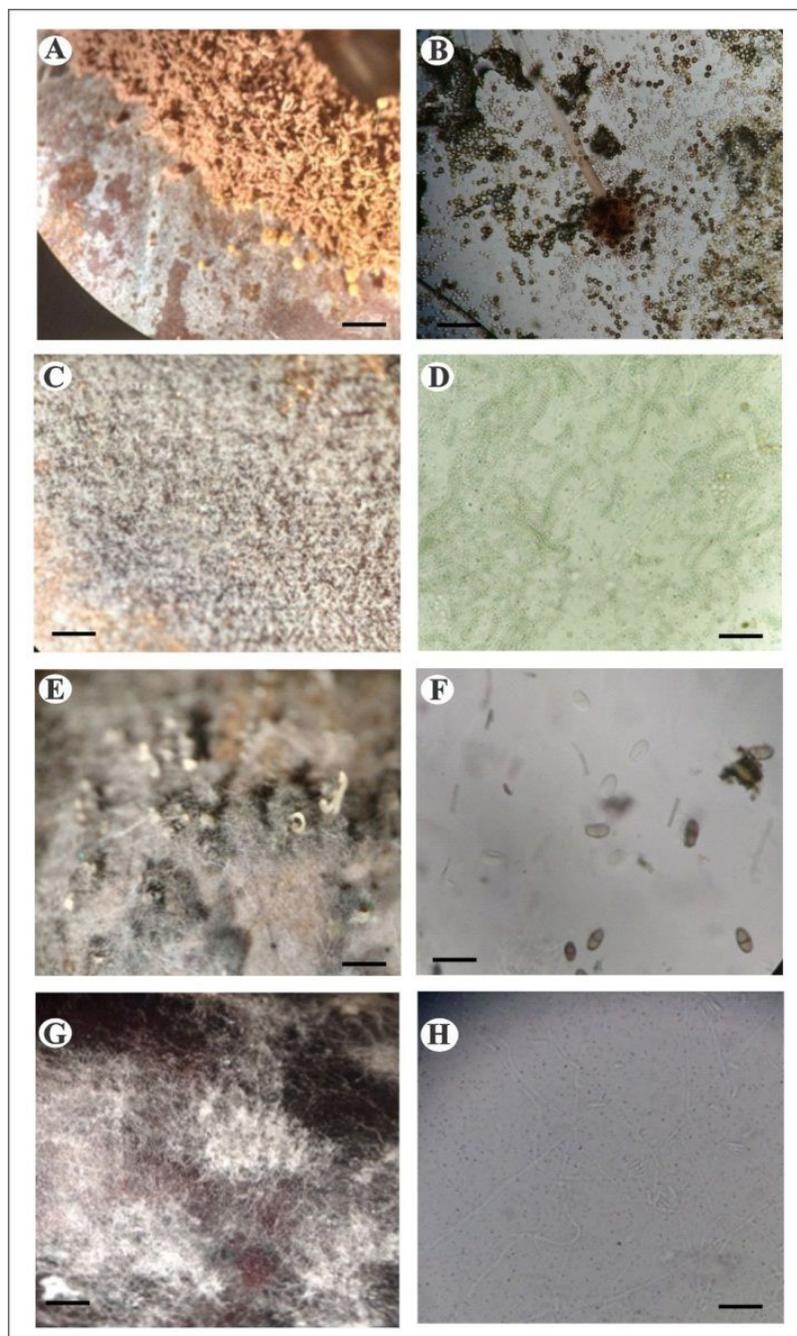


Figura 2. Identificação de fungos em sementes de *Hevea brasiliensis* e visualização de suas estruturas. A e B - *Aspergillus* sp.; C e D - *Penicillium* sp.; E e F - *Cladosporium* sp.; G e H - *Fusarium* sp.

3.3 Morfologia das sementes e da germinação

Com relação à caracterização morfológica, sementes selvagens exibiram coloração marrom escuro, com laivos marrons claros irregulares; formato globóide;

testa fina; lisa e brilhosa; rafe fina, formando uma linha reta, ligando o hilo à micrópila; tégmen fibroso de coloração bege, com presença de estrias marrom-avermelhadas (Figura 3A). Por outro lado, as sementes de clone apresentam coloração bege, com laivos marrons escuros; globoide; testa fina, lisa e com aspecto brilhante e translúcido; rafe fina, com presença de estrias marrom escuro (Figura 3B). O tecido de reserva de ambas as sementes é o endosperma, apresenta consistência firme e esbranquiçada e envolve o embrião pelo eixo hipocótilo-radícula, que é curto cilíndrico e reto; os cotilédones são foliáceos, brancos e oblongos (Figura 3C).

Outras sementes de *H. brasiliensis* também descreveram tegumento de coloração marrom manchado e, quanto às características da rafe, estudos com as espécies *Cnidosculus juercifolius* e *Jatropha curcas*, também pertencem à família Euphorbiaceae, verificaram rafe bem marcada longitudinalmente, como uma das características da semente (Añez *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2007; Loureiro *et al.*, 2013; Widyarani *et al.*, 2014). Em relação às características do endosperma as espécies pertencentes à família Euphorbiaceae, *Jatropha elliptica*, *Cnidosculus juercifolius* e *Jatropha curcas* também apresentaram endosperma com coloração esbranquiçada. Quanto ao tegumento, estudos com a espécie *J. curcas* também classificou o tegumento como testa e composta internamente por um tégmen (Loureiro *et al.*, 2013).

Os cotilédones apresentam nervuras visíveis tanto na região adaxial quanto na abaxial. Sementes dessa família são classificadas como trinérvias, sendo duas laterais que partem da base (Loureiro *et al.*, 2013).

Quanto à morfologia dos estágios germinativos, nas sementes selvagens e do clone, verificou-se que, inicialmente, ocorre a emergência de uma estrutura cilíndrica amarelada com cerca de 0,2-0,4 cm da região basal, apresentando primórdios radiculares em sua extremidade, que darão origem aos tecidos radiculares (raiz primária e secundária), denominada hipocótilo, que no presente estudo ocorre entre 1–2 dias (Figura 3D e E).

O alongamento das raízes, raiz primária (1,2-1,7 cm), e secundária, em torno de (1,1-1,5 cm), ocorre entre 2 e 5 dias. As raízes secundárias se alongam primeiro que as raízes primárias, apresentando hipocótilo rosado de 0,7-0,9 cm, com pontuações brancas (Figura 3F). Entre 5 e 8 dias, iniciou-se o aparecimento do epicótilo, 0,7-1 cm, de coloração arroxeadada, com tons esverdeados, que se eleva a partir do fendilhamento entre o hipocótilo e os pecíolos cotiledonares, até então, curtos e nítidos (Figura 3G). Entre 8 e 9 dias verificou-se, nesse estudo, o alongamento do

epicótilo, (3-3,2 cm), a distinção dos pecíolos cotiledonares (média de 1 cm cada) com pigmentação esverdeada (Figura 3H). Aos 9 e 10 dias, foi possível observar o aparecimento da gema apical, de coloração esverdeada, que, do ponto de vista histológico, deram origem aos eofilos (Figura 3I). De 10–16 dias sobrevêm à emissão dos eofilos (Figura 3J e K), verdes-claros (0,6 cm), seguida do início da expansão dos eofilos, de cor verde-escuro (com 2-8 cm), aos 18 dias (Figura 3L, M e N). No presente monitoramento, foi verificada a expansão total dos eofilos, (12-13 cm) aos 20-25 dias (Figura O).

A morfologia das sementes selvagens e do clone apresentaram características distintas de coloração. Estudos realizados com a espécie *H. brasiliensis* descreveram morfologias semelhantes ao do presente estudo (Oliveira e Pereira, 1987; Camargo *et al.*, 2008). Assim, a caracterização morfológica das sementes e das plântulas fornecem subsídios que facilitam o reconhecimento das espécies, principalmente em bancos de sementes (Silva *et al.*, 2012).

A espécie de *H. brasiliensis* apresenta germinação hipógea, criptocotiledonar e unipolar, com eixo lateral aos cotilédones, hipocótilo pouco alongado (1,0 a 1,5 cm) e marrom-avermelhado, cotilédones sem reservas, que permanecem na semente, sendo visíveis apenas os seus pecíolos (Camargo *et al.*, 2008). Assim, torna-se importante o conhecimento dos tipos de germinação, crescimento e o estabelecimento das plântulas de forma a compreender o ciclo biológico da espécie, bem como o tipo de regeneração natural.

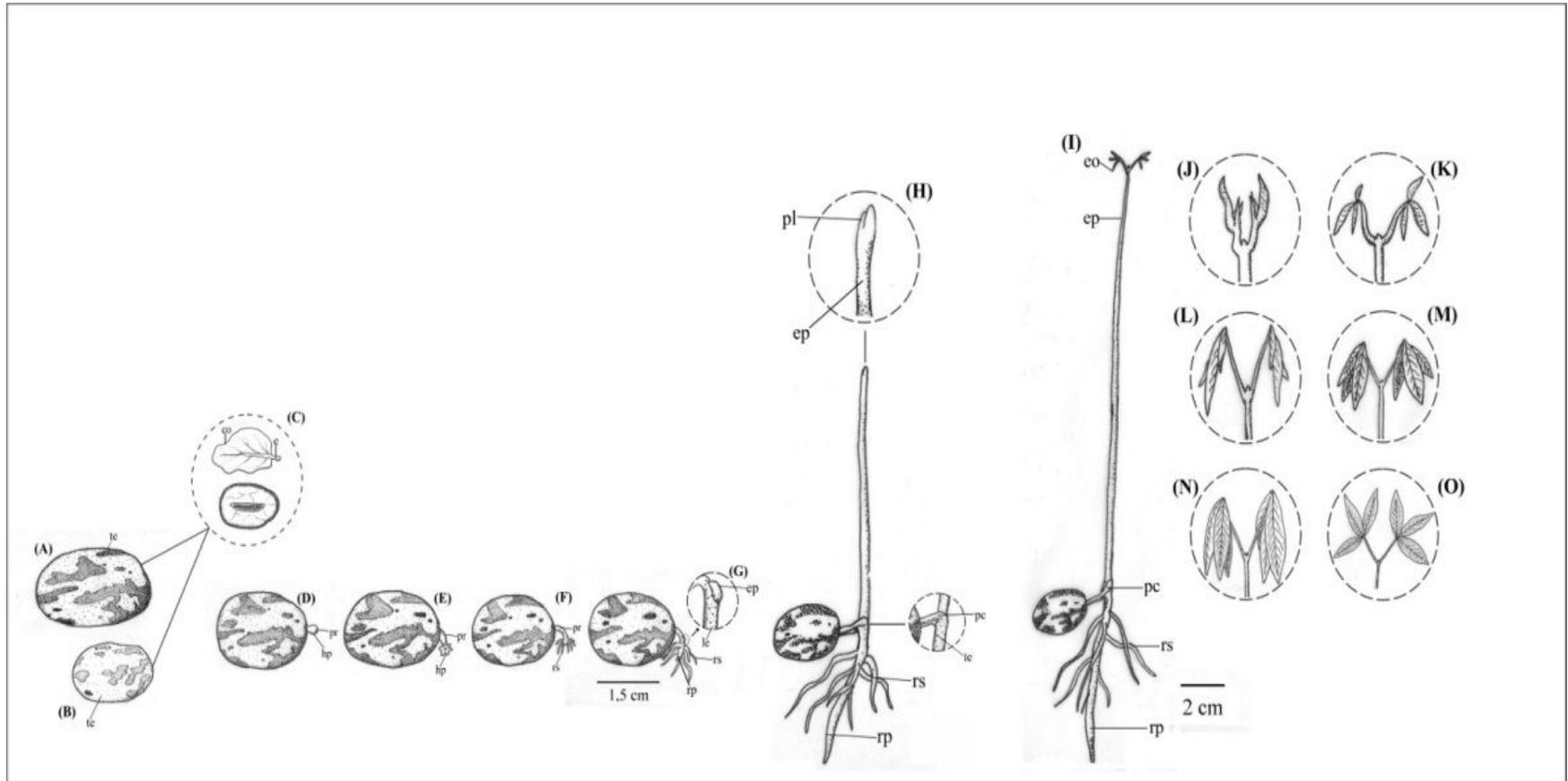


Figura 3. Morfologia da semente e dos estádios germinativos de *Hevea brasiliensis*. (A) parte externa da semente selvagem. (B) parte externa da semente de clone. (C) corte longitudinal da semente, endosperma e embrião (cotilédones e eixo embrionário). (D) emissão de primórdios radiculares. (E) emissão da raiz secundária (F) alongamento da raiz secundária. (G) alongamento da raiz primária e início de expansão dos pecíolos cotiledonares. (H) emissão do epicótilo. (I) emissão dos eofilos. (J) aparecimento da gema apical. (K), (L), (M) e (N) expansão dos eofilos. (O) expansão total dos eofilos.

*(te) tegumento. (tg) tégmém. (ed) endosperma. (co) cotilédone. (e) eixo embrionário. (hp) hipocótilo. (pr) primórdios radiculares. (rs) raiz secundária. (rp) raiz primária. (pl) plúmula. (ep) epicótilo. (le) lenticelas. (pc) pecíolo cotiledonar. (pe) pecíolo. (fo) fófolo.

3.4 Curva de embebição

A curva de embebição das sementes de procedências selvagem e clone se ajustaram ao modelo trifásico proposto por Bewley e Black (1994), com rápida absorção de água nas primeiras 60 horas de embebição (Fase I), seguida de absorção mais lenta até 144 horas (Fase II), e emissão dos primórdios radiculares, caracterizando o final da germinação (Fase III) (Figura 4A).

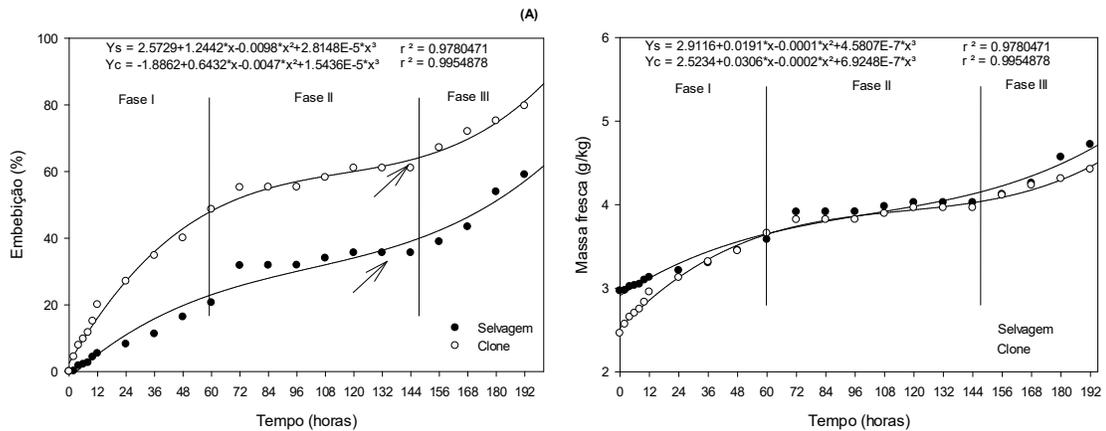


Figura 4. (A) Curva de embebição e (B) massa fresca de sementes de *Hevea brasiliensis* selvagem (●) e clone (○). As setas indicam emissão dos primórdios radiculares.

A fase I é caracterizada pela rápida absorção, um processo puramente físico, que depende somente da ligação da água aos colóides ou estruturas micelares das paredes celulares das células das sementes. A fase II é caracterizada pela sequência de eventos metabólicos preparatórios até a protrusão radicular iniciando a fase III para o final da germinação, quando ocorre a síntese de enzimas, de proteínas e a digestão de reservas necessárias para o crescimento e desenvolvimento do embrião. A fase III é caracterizada por um aumento no conteúdo de água da semente, devido à absorção relacionada ao início do crescimento do embrião (Castro *et al.*, 2004, Marcos Filho, 2005).

Estudo verificou padrão trifásico de embebição para a espécie *Jatropha curcas*, pertencente à mesma família da espécie *H. brasiliensis* (Loureiro *et al.*, 2013). As sementes selvagens e de clone de *H. brasiliensis* apresentaram diferenças na velocidade de absorção de água. Assim, as sementes de clone absorveram água mais

rápido quando comparadas às selvagens. Estudo verificou que sementes pequenas absorvem mais água do que sementes grandes (Duarte *et al.*, 2010).

As diferenças de absorção de água nas sementes sejam da mesma espécie ou até da mesma família, pode ser atribuída à procedência, vigor, composição química e até aspectos morfológicos, bem como, tamanho das sementes e características externas do tegumento, uma vez que a espécie em estudo não apresenta dormência tegumentar, caracterizada pela limitação da entrada de água na semente e, por conseguinte, o tempo de ativação do metabolismo. Assim, a água é um dos fatores importantes para a ativação do metabolismo em sementes, reorganização das células e início do crescimento do embrião e estabelecimento de plântulas.

Em trabalhos relacionados com embebição de sementes de diferentes tamanhos, tem sido constatado que as sementes de menor tamanho atingem teores de água superiores aos observados para sementes de maior tamanho (Hsu *et al.*, 1983; Souza, 1996). Esse fato pode estar relacionado à maior área de contato por unidade de massa, nas sementes menores (Beckert *et al.*, 2000).

3.5 Teste de germinação

As sementes de *H. brasiliensis* selvagens germinaram aos 5 dias e do clone aos 7 dias, chegando aos 20 dias com porcentagem de 75 e 65%, respectivamente (Figura 5A). Na figura 5B, é possível verificar o índice de velocidade de germinação de 2,8 e 1,6, e tempo médio de germinação de 12 e 18 dias para sementes selvagens e clone, respectivamente. Maiores porcentagens e índice de velocidade de germinação foram observados nas sementes selvagens e maior tempo médio da germinação para sementes de clone, que pode estar associado ao maior grau de umidade e consequentemente maior viabilidade das sementes.

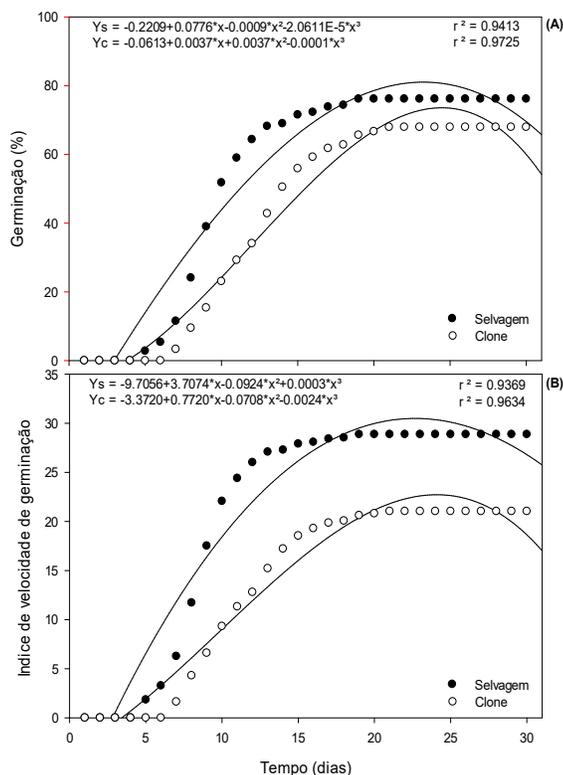


Figura 5. (A) Porcentagem de germinação (%) e (B) índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes selvagem (●) e do clone (○) de *Hevea brasiliensis*.

Os resultados de germinação obtidos no presente estudo corroboram com trabalhos de germinação para a mesma espécie em que os autores identificaram germinação entre 58-90% em substrato de areia (Garcia *et al.*, 1994; Vieira *et al.*, 1995; Paula *et al.*, 1997). No entanto na literatura também é possível encontrar resultados diferentes, em que foram observadas taxas de germinação de sementes em florestas naturais (11,7%) menor do que em plantações de seringueira (44,3%). Os autores sugerem a influência da temperatura do solo em florestas naturais (cerca de 21°C), comparado com a temperatura do solo em plantios (cerca de 23 °C). (Zhou *et al.*, 2015).

Outros estudos com sementes de *H. brasiliensis* demonstraram que baixas taxas de germinação podem estar associadas às condições de estágio de maturação, semeadura e práticas de armazenamento (Roberts e King, 1980; Cícero, 1986).

Com relação aos aspectos relacionados à germinação foram encontrados valores de 1,31 - 2,13 para velocidade de germinação e tempo médio de 20 dias na temperatura de 30 e 35 °C (Garcia *et al.*, 1994).

Diante do exposto tanto para os resultados obtidos no presente estudo quanto para dados da literatura, pode-se inferir que já existe consenso quanto à porcentagem de germinação e que as variações para as mesmas quase sempre são produtos das características recalcitrantes das sementes e que há espaço para ampliar melhores índices de germinação.

3.6 Testes histoquímicos

Células do endosperma de sementes selvagens e clone de *Hevea brasiliensis* apresentam-se ricas em lipídeos, proteínas totais e amido em menor proporção.

Os lipídeos totais foram evidenciados com os testes Sudan Black, na forma de pequenos corpos oleaginosos em sementes selvagens e clone. As reservas de lipídeos em sementes selvagens foram maiores nas primeiras fases da germinação, semente quiescente e embebida (6A e B). Na fase de primórdios radiculares verificou-se tendência de decréscimo (Figura 6C), na fase de raiz secundária verificou-se tendência de acúmulo (Figura 6D), voltando a decrescer nas fases seguintes (6E, F, G e H) caracterizando intensa mobilização e síntese durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.

Nas sementes de clone as primeiras fases (semente quiescente e embebida) também apresentaram maiores reservas de lipídeos (Figura 7A e B). Nas fases seguintes, ocorreram intensa mobilização dessa reserva, (Figura 6C, D, E, F, G e H) caracterizando também intensa mobilização durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.

Os lipídios de reservas em sementes são sintetizados em organelas presentes no citoplasma, sendo acumulados em corpos lipídicos na forma de triacilglicerol, que fornecem energia para o estágio inicial de germinação e crescimento do embrião (Graham, 2008). Resultado similar ao presente estudo foi observado em endosperma de sementes da espécie *Euphorbia heterophylla* durante o processo de embebição, onde após 24 horas de embebição, observou-se modificações na morfologia dos corpos lipídicos com aparente inchaço, em seguida o desaparecimento gradual das reservas, caracterizando intensa mobilização dos lipídeos (Suda e Giorgini, 2000). É provável que após 24 horas de embebição, as sementes intensificaram o metabolismo e a degradação das reservas para fornecer energia para o crescimento e desenvolvimento do embrião.

As proteínas totais foram evidenciadas com o teste Xilidine Ponceau, com corpos protéicos maiores e mais evidentes em sementes do clone.

As reservas de proteínas em sementes selvagens foram maiores nas primeiras fases da germinação, sendo, na fase de embebição, possível verificar acúmulo dessa reserva (8A e B). Nas fases seguintes, emissão de primórdios radiculares observou-se decréscimos caracterizando início da mobilização dessa reserva, seguido da diminuição no alongamento das raízes secundária e primária, (Figura 8C, D e E) e nas ultimas fases, emissão e expansão de eofilos ocorreram maiores decréscimo dessa reserva (Figura 8G e H). Nas sementes de clone, as primeiras fases (semente quiescente e embebida) também apresentaram maiores reservas de proteínas (Figura 9A e B), na fase de primórdios radiculares e alongamento da raiz secundária (Figura 9C e D) e acúmulo na fase de emissão de epicótilo (Figura 9E). Nas últimas fases, emissão e expansão de eofilos ocorreram os maiores decréscimos dessa reserva (Figura 9G e H), sugerindo que para ambas as sementes (selvagens e clone) intensa mobilização de proteínas ocorreu durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.

Resultado similar ao presente estudo com mobilização de proteínas também foi observado no endosperma de sementes de *E. heterophylla* durante o processo de embebição, onde após 24 horas de embebição, observou-se a degradação de proteínas, caracterizando o início de mobilização dessas reservas para geração de energia para os pontos de crescimento do embrião, o qual iniciou a germinação às 48 horas de embebição (Suda e Giorgini, 2000).

Os amidos foram evidenciados com o teste lugol, com pequenos grãos de amido em sementes selvagens e clone.

As reservas de amido em sementes selvagens foram maiores nas primeiras fases da germinação (semente quiescente, embebida e primórdios radiculares), caracterizando intenso acúmulo dessa reserva nos estádios iniciais (Figura 10A, B e C). Nas fases alongamento de raiz secundária observou-se degradação, seguido de acúmulo na fase de raiz primária (Figura 10E e F). Na fase de emissão de epicótilo apresentaram menores reservas de amido (Figura 10F). No entanto, nas fases (emissão e expansão dos eofilos) apresentaram menores quantidades de amido, quando comparadas com as fases anteriores (Figura 10G e H). Nas sementes de clone verificou-se comportamentos similares às sementes selvagens, nas primeiras fases (semente quiescente, embebida e primórdios radiculares) ocorreram intenso

acúmulo de amido (Figura 11A, B e C), decréscimos menores nas fases de alongamento de raiz secundária, primária e emissão de epicótilo (Figura 11D, E e F). Nas últimas fases (emissão e expansão de eofilos) ocorreram decréscimo mais intenso de amido (Figura 11G e H), caracterizando intensa mobilização de amido para ambas sementes (selvagens e clone) nas fases finais de crescimento inicial das plântulas.

Dentre as reservas, o amido é o principal composto de reserva em sementes, sendo mobilizado principalmente nas fases de crescimento inicial das plântulas. Esse polissacarídeo é acumulado nos amiloplastos, sendo composta por unidades de glicose, organizada em dois homopolissacarídeos, a amilose e a amilopectina (Amaral *et al.*, 2007). Assim, os níveis de amido e açúcares simples mobilizados dependem de cada espécie vegetal, podendo ser mais expressivo no início da germinação ou crescimento inicial das plântulas (Pontes *et al.*, 2002).

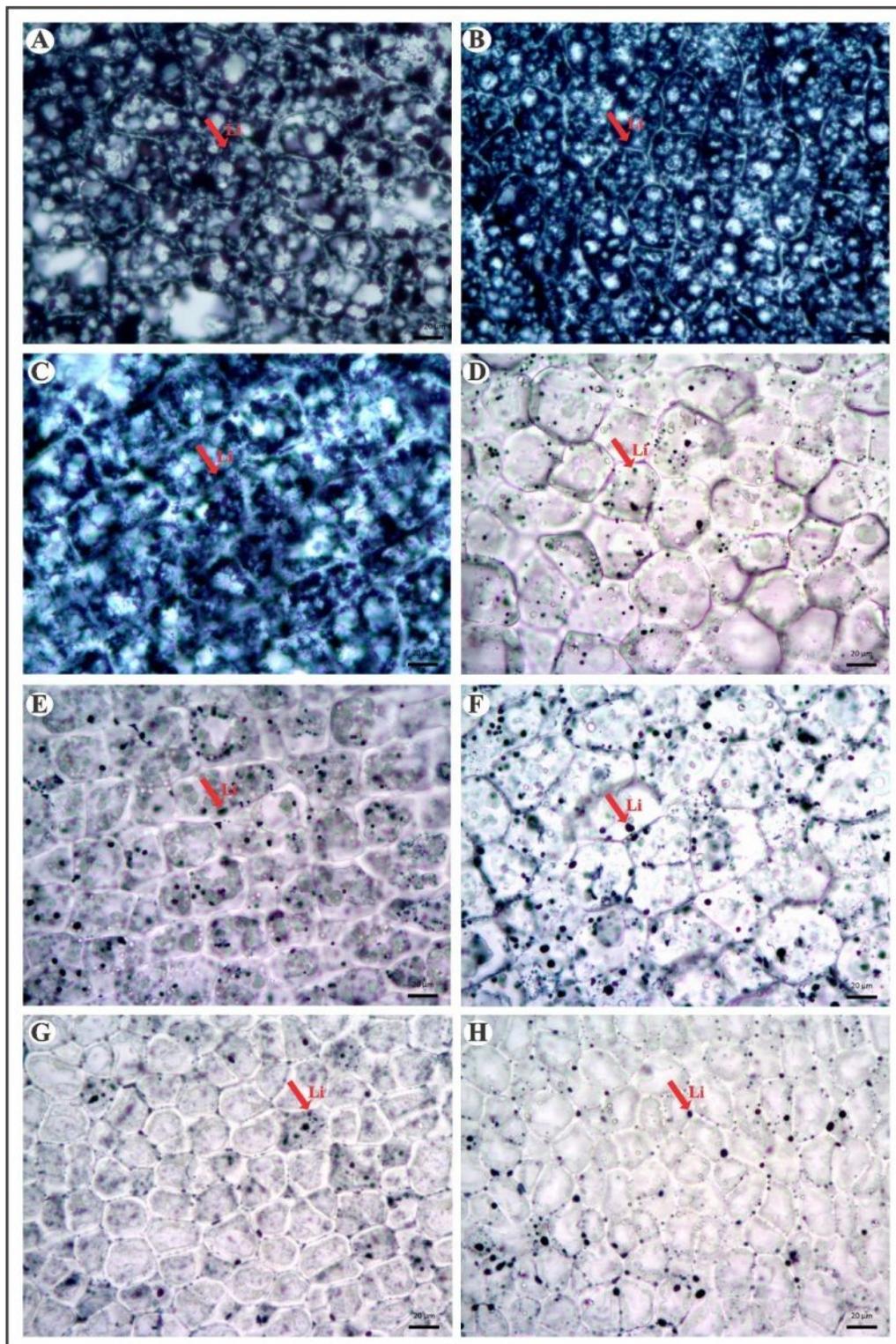


Figura 6. Seções longitudinais de endosperma de sementes selvagens de *Hevea brasiliensis* submetidas ao teste com Sudan Black para identificação de lipídeos. (A) semente quiescente. (B) semente embebida. (C) primórdios radiculares. (D) alongamento de raiz secundária. (E) alongamento de raiz primária. (F) emissão do epicótilo (G) emissão dos eofilos. (H) expansão dos eofilos.

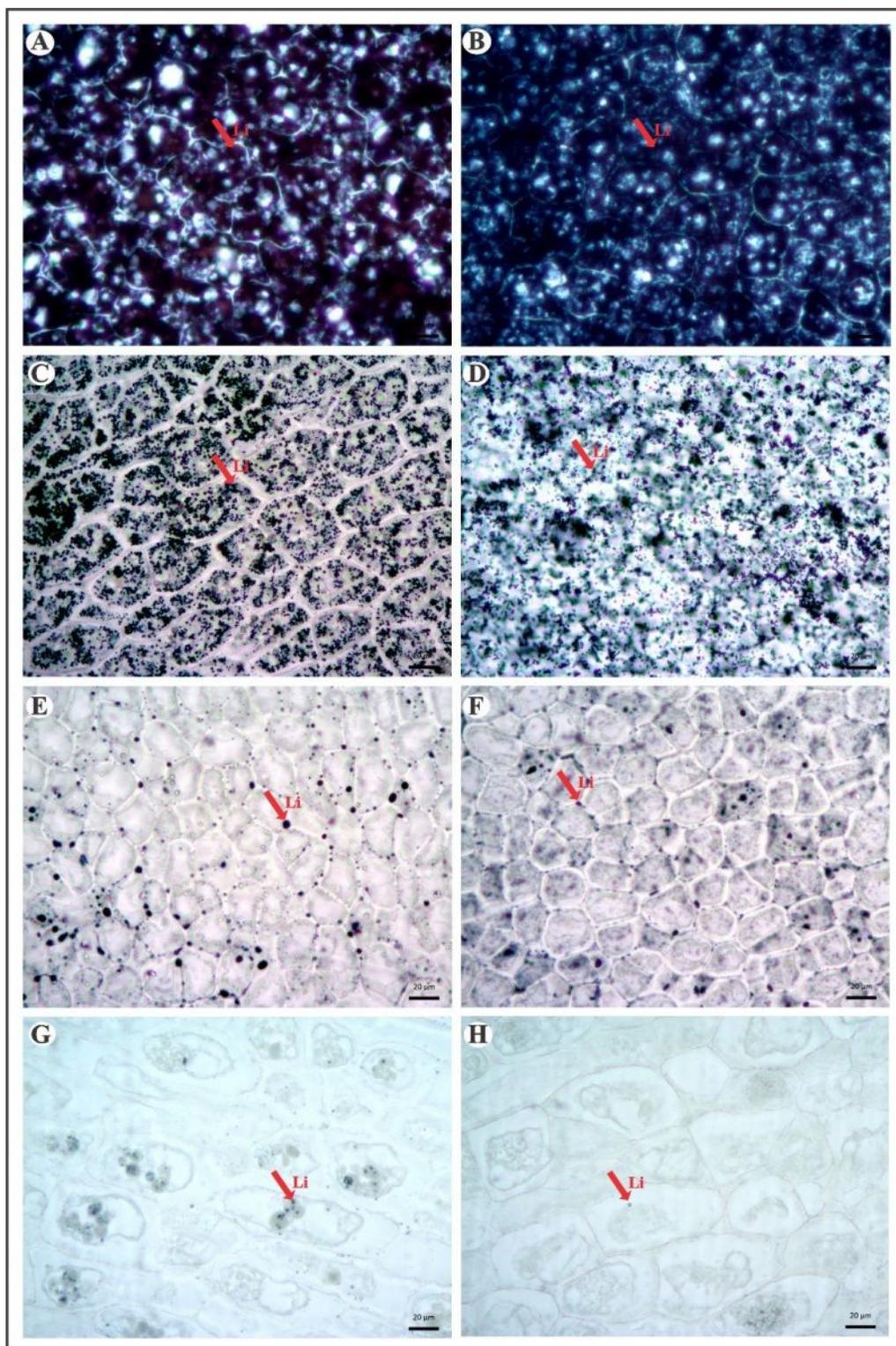


Figura 7. Seções longitudinais de endosperma de sementes de clone de *Hevea brasiliensis* submetidas ao teste com Sudan Black para identificação de lipídeos. **(A)** semente quiescente. **(B)** semente embebida. **(C)** primórdios radiculares. **(D)** alongamento de raiz secundária. **(E)** alongamento de raiz primária. **(F)** emissão do epicótilo **(G)** emissão dos eofilos. **(H)** expansão dos eofilos.

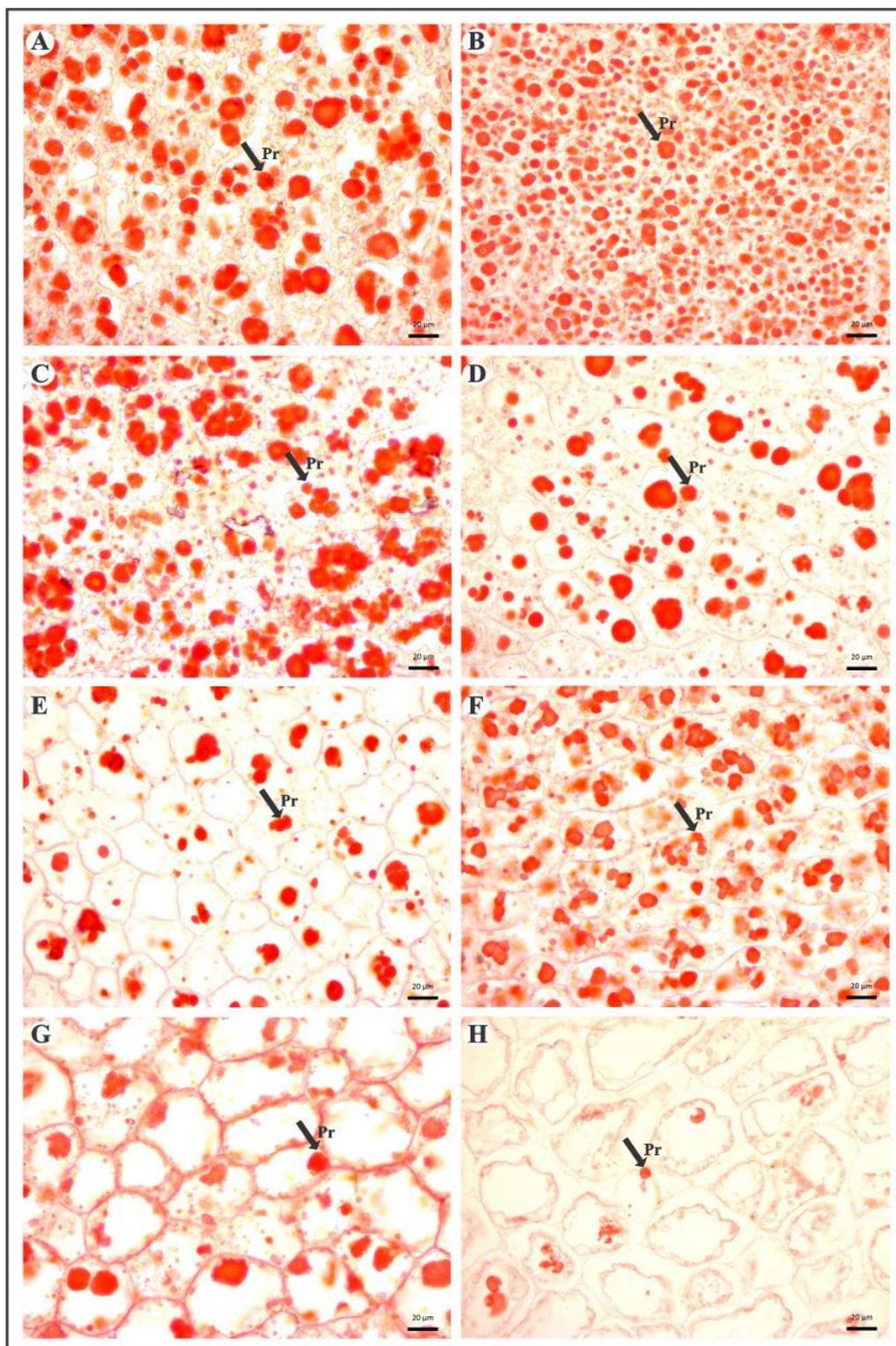


Figura 8. Seções longitudinais de endosperma de sementes selvagens de *Hevea brasiliensis* submetidas ao teste com Xilidine Ponceau para identificação de proteínas totais. **(A)** semente quiescente. **(B)** semente embebida. **(C)** primórdios radiculares. **(D)** alongamento de raiz secundária. **(E)** alongamento de raiz primária. **(F)** emissão do epicótilo **(G)** emissão dos eofilos. **(H)** expansão dos eofilos.

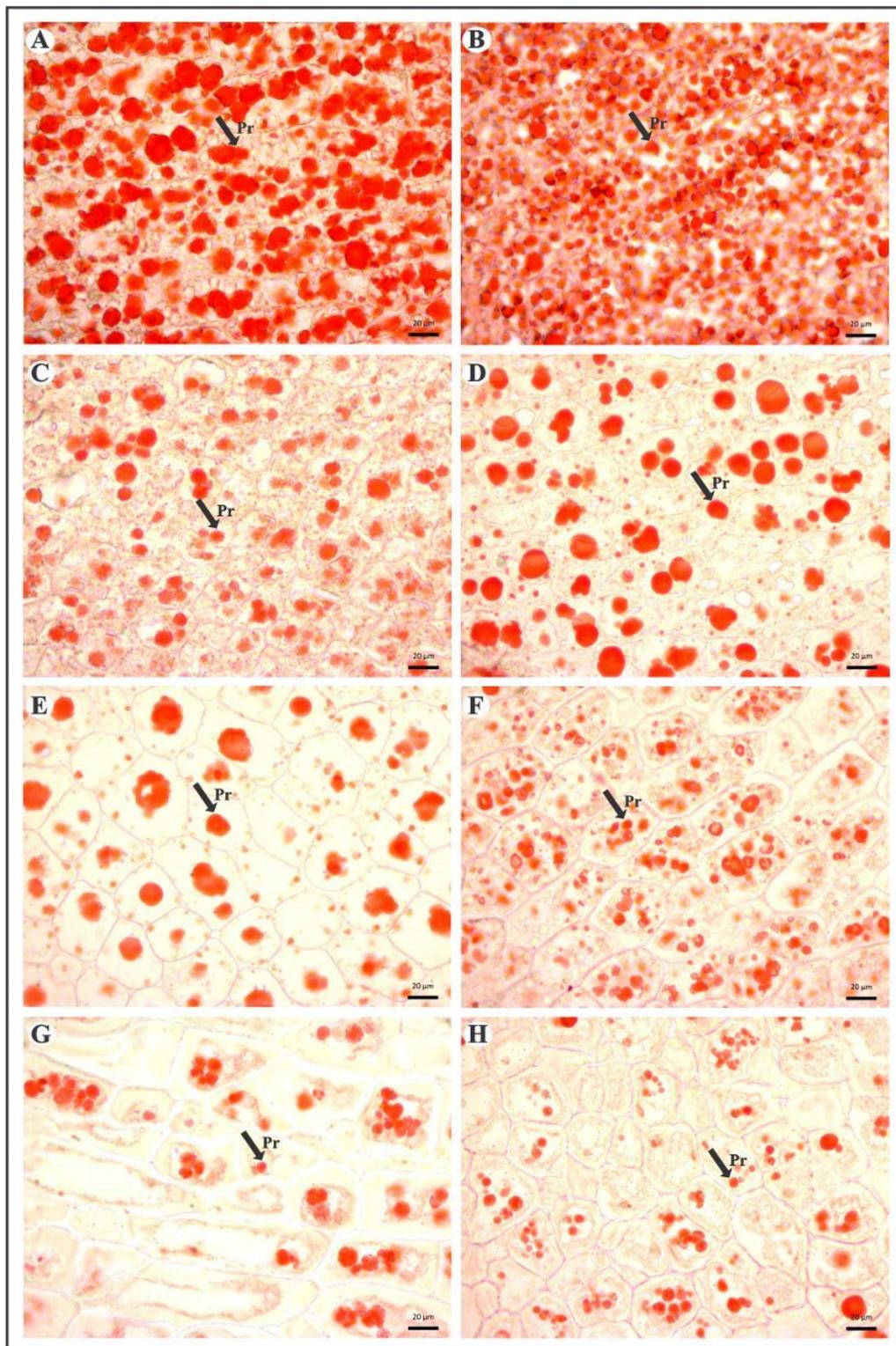


Figura 9. Seções longitudinais de endosperma de sementes de clone de *Hevea brasiliensis* submetidas ao teste com Xilidine Ponceau para identificação de proteínas totais. **(A)** semente quiescente. **(B)** semente embebida. **(C)** primórdios radiculares. **(D)** alongamento de raiz secundária. **(E)** alongamento de raiz primária. **(F)** emissão Do epicótilo **(G)** emissão dos eofilos. **(H)** expansão dos eofilos.

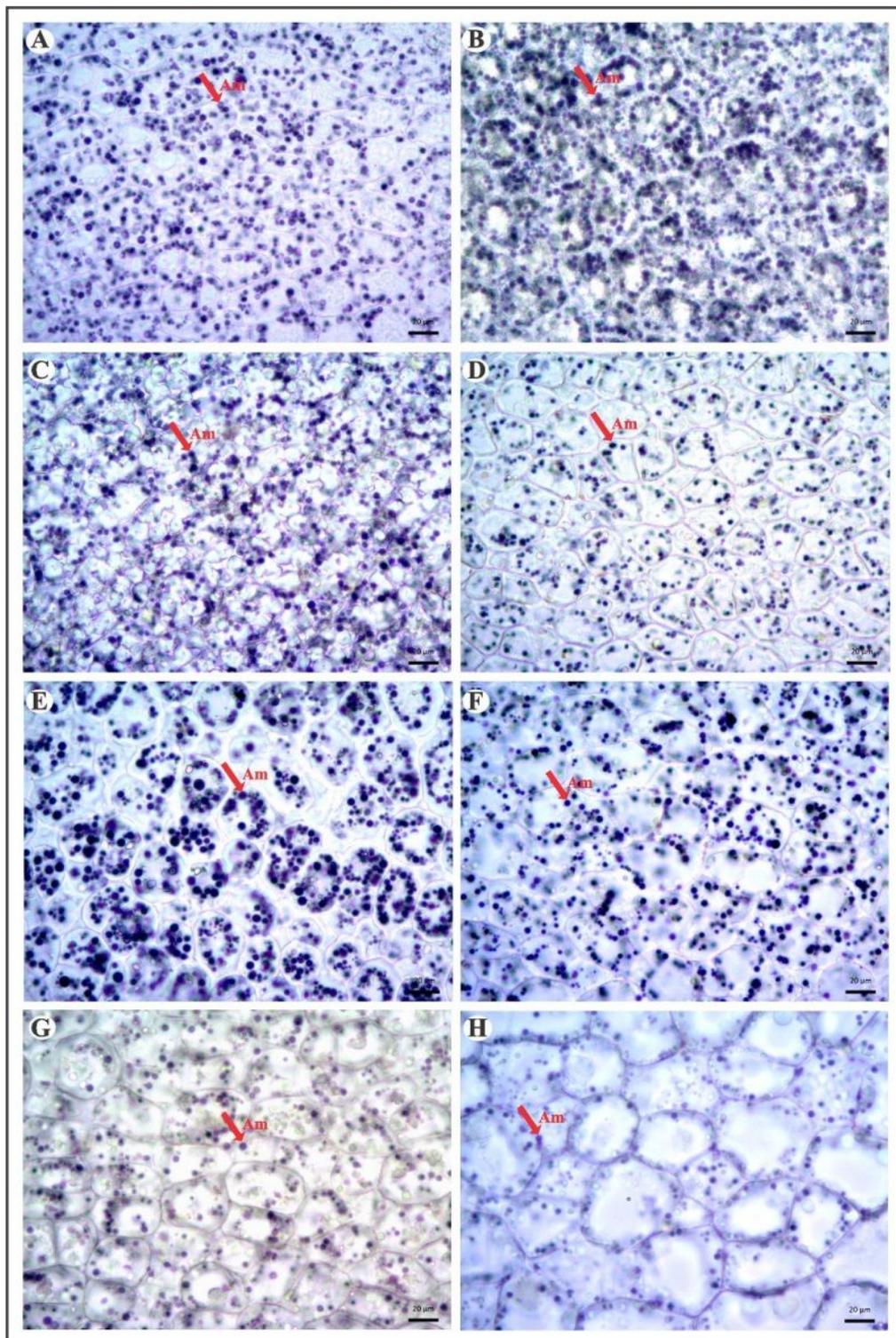


Figura 10. Seções longitudinais de endosperma de sementes selvagens de *Hevea brasiliensis* submetidas ao teste com lugol para identificação de amido. **(A)** semente quiescente. **(B)** semente embebida. **(C)** primórdios radiculares. **(D)** alongamento de raiz secundária. **(E)** alongamento de raiz primária. **(F)** emissão do epicótilo **(G)** emissão dos eofilos. **(H)** expansão dos eofilos.

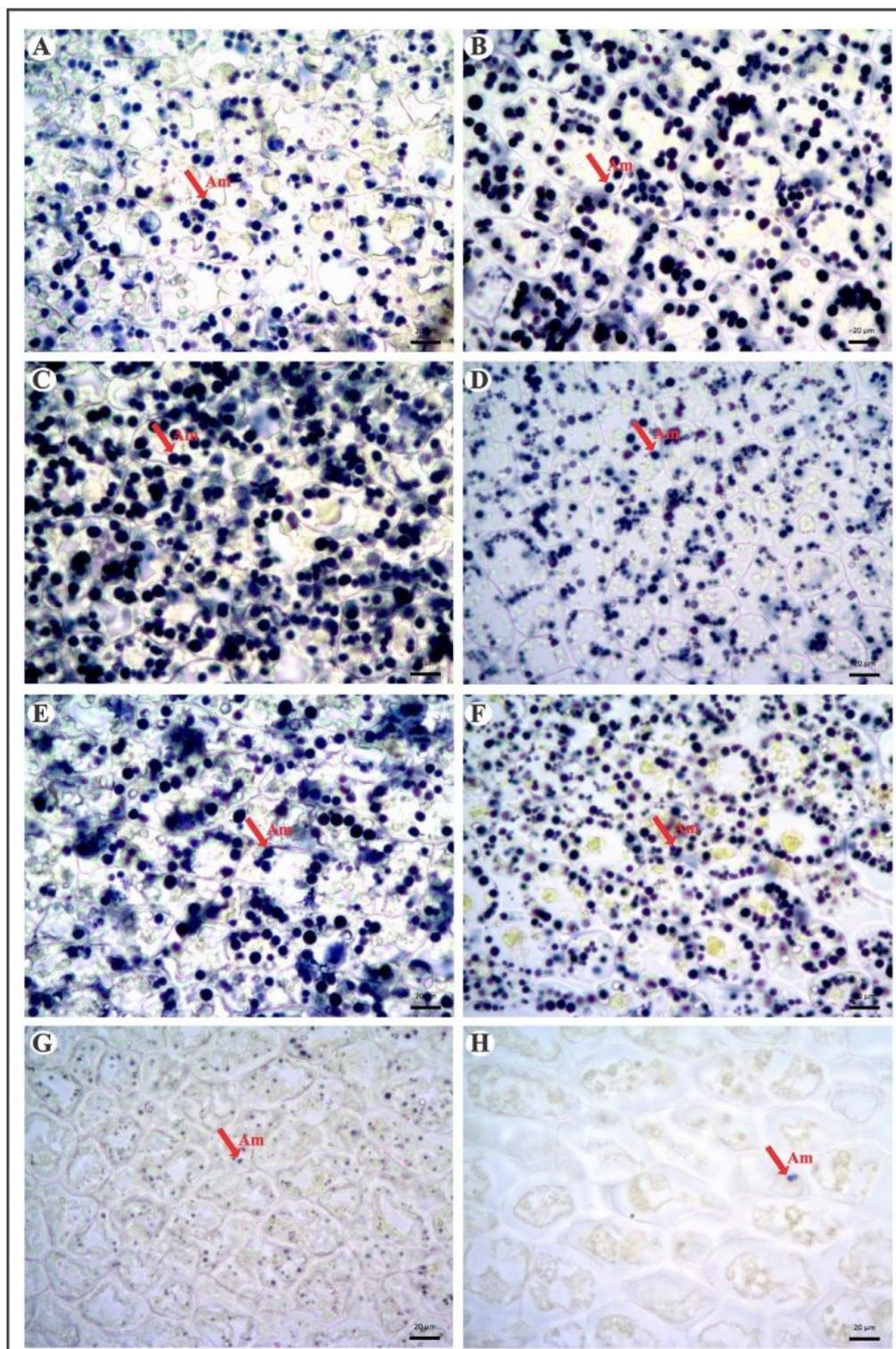


Figura 11. Seções longitudinais de endosperma de sementes de clone de *Hevea brasiliensis* submetidas ao teste com lugol para identificação de amido. **(A)** semente quiescente. **(B)** semente embebida. **(C)** primórdios radiculares. **(D)** alongamento de raiz secundária. **(E)** alongamento de raiz primária. **(F)** emissão do epicótilo **(G)** emissão dos eofilos. **(H)** expansão dos eofilos.

4. CONCLUSÃO

- Do ponto de vista morfofisiológico, as sementes de *Hevea brasiliensis* selvagens e clone são diferentes quanto às características de tamanho e coloração.
- Sementes selvagens e de clone não apresentaram diferenças no grau de umidade. Adicionalmente, verificou-se proliferação de fungos do gênero *Aspergillus* e *Fusarium* sp, associado ao teor de umidade das sementes selvagens e clone.
- Em relação à fisiologia da germinação, as sementes apresentaram padrão trifásico, com velocidade de embebição diferentes.
- Ressalta-se que sementes selvagens apresentaram maior germinabilidade, velocidade de germinação em menor tempo comparada às do clone, sendo que do ponto de vista bioquímico, a constituição das reservas foi similar para ambas, e as reservas de lipídeos e proteínas foram mobilizados durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. O amido foi mobilizado principalmente na fase de crescimento inicial das plântulas.

Diante do exposto, embora haja necessidade de se investigar mais variáveis acerca das possibilidades de resgate de estudos das sementes visando implementar programas de melhoramento de *H. brasiliensis*, uma vez que sementes selvagens apresentam características genéticas importantes e podem agregar características importantes aos clones atualmente utilizados na heveicultura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, K.S.; Guimarães, R.M.; Almeida, I.F. de.; Clemente, A da. C.S. 2009. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). *Revista Brasileira de Sementes*, 31(1): 012-019.
- Alencar, N.L.M.; Innecco, R.; Gomes-Filho, E.; Gallão, M.I.; Alvarez-Pizarro, J.C.; Prisco, J.T.; Oliveira, A. B de. 2012. Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of *Cereus jamacaru* D.C. ssp. *jamacaru* (Cactaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 84(3): 823-832.
- Alencar, N.L.M.; Gadelha, C.G.; Gallão, M.; Dolder, M. A. H.; Prisco, J. T.; Gomes-Filho, E. 2015. Ultrastructural and biochemical changes induced by salt stress in *Jatropha curcas* seeds during germination and seedling development. *Functional Plant Biology* 42(9) 865-874.
- Amaral, L.I.V de.; Gaspar, M.; Costa, P.M.F.; Aidar, M.P.M.; Buckeridge, M.S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34(4): 425-431.
- Añez, L.M.M.; Coelho, M.F.B.; Albuquerque, M.C.F.; Dombroski, J.L.D. 2005. Caracterização morfológica dos frutos, das sementes e do desenvolvimento das plântulas de *Jatropha elliptica* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Revista Brasil. Bot.*, 28(3): 563-568.
- Berjak, P. e N.W. Pammenter, 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Front. Plant Sci.*, Vol. 4.
- Beckert, O.P.; Miguel, M.H.; Marcos Filho, J. 2000. Absorção de água e potencial fisiológico em sementes de soja de diferentes tamanhos. *Scientia Agricola*, 57(4): 671-675.
- Bewley, J.D.; Black, M. Seeds. 1994. *Physiology of development and germination*. Londres: Plenum Press.
- Bewley J.D.; Bradford, K.J.; Hilhorst, H.W.M.; Nonogaki, H. 2013. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. (3rd edn) (*Springer: New York*).
- Biruel R.P.; Aguiar, I.B.; Paula, R.C. 2007. Germinação de sementes de pau-ferro submetidas a diferentes condições de armazenamento, escarificação química, temperatura e luz. *Revista Brasileira de Sementes*; 29 (3):151-159.

- Bonome, L.T.S.; Oliveira, L.E.M.; Graciano, M.H.P.; Mattos, J.O.S.; Mesquita, A.C. 2009. Influência do tratamento fungicida e da temperatura sobre a qualidade fisiológica de sementes de seringueira durante o armazenamento. *Agrarian*, 2(5): 97-112.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. 2009. *Regras para análise de sementes*. Brasília: CLAV/DNDV/SNAD/MA, 365p.
- Bravato, M. 1974. Estudio morfológico de frutos y semillas de las mimosoideae (Leguminosae) de Venezuela. *Acta Botanica Venezuelica* 5: 317-361.
- Camargo, J.L.C.; Ferraz, I.D.K.; Mesquita, M.R.; Santos, B.A.; Brum, H.D. 2008. *Guia de propágulos e plantas da Amazônia*, 1: 54-57.
- Castro, R.D de.; Bradford, K.J.; Hilhorst, H.W.M. 2004. Embebição e Reativação do Metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p. 163-185.
- Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. 2000. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4.Ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p.
- Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. 2012. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 590 p.
- Cícero, S.M. 1986. Produção, coleta, transporte e armazenamento de sementes de seringueira. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DA SERINGUEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO, I, Piracicaba, 1986. *Anais*. Campinas: Fundação Cargill, p.133-138.
- Chin, H.F.; Aziz, M.; Ang, B.B.; Hamzah, S. 1981. The effect of moisture and temperature on the ultrastructure and viability of seeds of *Hevea brasiliensis*. *Seed Science & Technology*, Wageningen, 9(2): 411-422.
- Duarte, E.F.; Carneiro, I.F.; Silva da, N.F.; Guimarães, N.N.R. 2010. Características físicas e germinação de sementes de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (BROMELIACEAE) sob diferentes temperaturas. *Pesq. Agropec. Trop.*, Goiânia, 40(4): 422-429.
- Fonseca, S.C.L.; Freire, H.B. 2003. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. *Bragantia*, 62(2): 297-303.

- Garcia A.; Vieira D.R. 1994. Germinação, armazenamento e tratamento fungicida de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Revista Brasileira de Sementes*, 6(2) 128-133.
- Henning, A.A. 1994. *Patologia de sementes*. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 43p. Documentos nº 90.
- Hsu, K.H.; Kim, C.J.; Wilson, L.A. 1983. Factors affecting water uptake of soybean during soaking. *Cereal Chemistry*, 60: 208-211.
- Ibarra-Manríquez, G.; Ramos, M.M. & Oyama, K. 2001. Seedling functional types in a lowland rain Forest in Mexico. *American Journal of Botany* 88: 1801-1812.
- Igeleke, C.L.; Omorusi, V.I. 2007. Review of postharvest deterioration of rubber seeds. *Journal of Agricultural and Social Research*, 7(2): 11- 19.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill, 523 p.
- Labouriau, L.G. 1983. *A germinação de sementes*. Organização dos estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Série de Biologia, 171 pp.
- Lison, L. 1960. Histochemie et cytochemie animals. *Principes et méthodes*, 1(2). Gauthier-Villars, Paris.
- Loureiro, M.B.; Teles, C.A.S.; Colares, C.C.A.; Araújo, B.R.N de.; Fernandez, L.G.; Castro, R.D de. 2013. Caracterização morfoanatomica e fisiológica de sementes e plântulas de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *Revista Árvore*, Viçosa-MG, 37(6): 1093-1101.
- Marcos Filho, J. 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ, 495p.
- Martinez, A.P.C. 2011. *Efeito dos processos de irradiação e germinação nos aspectos nutricionais, sensoriais e microbiológicos em grão de soja (Glycine max Merrill) cultivar BRS216*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo /Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 217 p.
- O'Brien, T.P.; McCully, M.E. 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. *Termarkaphi Pty Ltd*, Melbourne, 46p.
- Oliveira, E.C.; Pereira, T.S. 1987. Euphorbiaceae, morfologia da germinação de algumas espécies I. *Revista Brasileira de Sementes*, 9(1): 9–29.
- Oliveira, A.B de.; Bosco, M.R de.O. 2013. Biometria, determinação da curva de absorção de água em sementes e emergência inicial de plântulas de *Copernicia hospita* Martius. *Rev. Bras. de Agroecologia*. 8(1): 66-74.

- Oliveira, L.M de.; Bruno, R de. L.A.; Meneghello, G.E. 2015. Qualidade fisiológica de sementes de *Syzygium cumini* L. durante o armazenamento. *Ciência Florestal*, Santa Maria, 25(4): 921-931.
- Patiño, J. C. 1986. *Microtecnia vegetal*, México: Trillas, 106 p.
- Paula, N.F.; Borges, E.E.L.; Borges, R.C.G.; Paula, R.C. 1997. Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, 19(2): 326-333.
- Pontes, A.P.; Borges, E.E de. L.; Borges, R de.; C.G.; Soares, C.P.B. 2002. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. (garapa) durante a embebição. *Revista Árvore*, 26(5): 593-601.
- Roberts, E.H.; King, M.W. 1980. *The characteristics of recalcitrant seeds*. In: CHIN, H.F.; ROBERTS, E.H., ed. Recalcitrant crop seeds. Kuala Lumpur: Tropical Press, p.1-5.
- Silva, L.M.M., Matos, V.P., Pereira, D.D. e Lima, A.A. 1995. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Luetzelburgia auriculata* Ducke (pau-serrote) e *Pterogyne nitens* Tul. (madeira-nova-do-brejo) – Leguminosae. *Revista Brasileira de Sementes* 17: 154-159.
- Silva, K.B.; Alves, E.U.; Bruno, R de. L.A.; Matos, V.P. 2012. Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. e Schult.) Penn. (Sapotaceae). *Revista Árvore*, Viçosa-MG, 36(1): 59-64.
- Silva, L.M.M.; Aguiar, I.B.; Tertuliano, S.S.X. 2007. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Cnidoculus juercifolius* Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae). *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 7(2): 1519-5228.
- Silva, R.B.; Matos, V.P.; Farias, S.G.G de.; Sena, L.H de. M., Silva, D.Y.B de. O. 2017. Germinação e vigor de plântulas de *Parkia platycephala* Benth. Em diferentes substratos e temperaturas. *Revista Ciência Agronômica*, 48(1): 142-150.
- Souza, F.H.D. 1996. Características físicas das sementes de *Calopogonium mucunoides* Desv. associadas à qualidade fisiológica e ao padrão de absorção de água: I. Tamanho. *Revista Brasileira de Sementes*, 18: 33-40.
- Suda, C.N.K. e Giorgini, J.F. 2000. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12 (3): 226-245.

- Theodoro, G de. F.; Batista, T. S. 2014. Detection of fungi in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) seeds harvested in northeast of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Agrarian*. 7(24): 365-368.
- Vieira, R.D.; Bergamaschi, M.C.M.; Minohara, L. 1995. Qualidade fisiológica de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), tratadas com benlate durante o armazenamento. *Sci. Agri.*, Piracicaba, 52(1):151-157.
- Widyarania, Ratnaningsihc, E., Sanders, J.P.M.; Bruinsa, M.E. 2014. Biorefinery methods for separation of protein and oil fractions from rubber seed kernel. *Industrial Crops and Products* 62: 323–332.
- Zhou, Y.; Fan, M.; Chen, L.; Zhuang, J. 2015. Lignocellulosic fibre mediated rubber composites: An overview. *Composites Part B: Engineering*. 76: 180–191.
- Zuchi, J.; Panozzo, L.E.; Heberle, E.; Araujo, E.F. 2012. Curva de embebição e condutividade elétrica de sementes de mamona classificadas por tamanho. Nota científica. *Revista Brasileira de Sementes*, 34(3): 504 – 509.

CAPÍTULO II

Mobilização de reservas primárias durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas de *Hevea brasiliensis*

MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS PRIMÁRIAS DURANTE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE *HEVEA BRASILIENSIS*

RESUMO- Durante a germinação os tecidos de estocagem das sementes são alvos de intensas atividades metabólicas a partir do ingresso da água nas sementes e, estas, reunirem todas as condições para promover o crescimento do embrião. Portanto a mobilização das reservas está intimamente relacionada ao fluxo de informações bioquímicas que garantem as demandas energéticas para o crescimento do embrião e também crescimento inicial das plântulas até atingirem o autotrofismo. O objetivo desse estudo foi investigar os aspectos bioquímicos relacionados à mobilização das reservas (proteínas, carboidratos, lipídeos e minerais), assim como determinar atividades enzimáticas específicas (α -amilase, proteases, lipase e fosfatase ácida) durante a germinação de sementes e o crescimento inicial das plântulas de *H. brasiliensis*, provenientes de matrizes selvagens e clone do Estado do Pará. As sementes de *H. brasiliensis* foram semeadas em bandejas plásticas com areia lavada, em regime de casa de vegetação. A partir de sementes quiescentes a quantificação dos metabólitos primários e atividades enzimáticas foram realizadas no endosperma durante os estádios germinativos. Amostras de endosperma foram liofilizadas e trituradas, sendo utilizadas para extração e quantificação dos metabólitos primários. As análises das atividades enzimáticas foram realizadas nas amostras frescas de endospermas. Os lipídeos totais extraídos usando-se éter de petróleo, os carboidratos (açúcares solúveis e amido) em etanol 80% e as proteínas totais e solúveis por método de Kjeldahl e Bradford, respectivamente. Dentre os metabólitos primários, os lipídeos, correspondem às reservas majoritárias estocadas no endosperma de sementes da espécie *H. brasiliensis* selvagem e clone e foram mobilizadas durante a germinação e crescimento inicial de plântulas. Nas sementes selvagens e clone as proteínas também foram mobilizadas durante a germinação e crescimento inicial de plântulas e as proteínas solúveis foram mobilizadas no início da germinação e exibiram bandas proteicas nas faixas de 7 a 30 kDa que podem estar associadas às principais proteínas da rota de síntese do látex. Já as reservas de açúcares solúveis foram mobilizadas mais intensamente no início da germinação e o amido no início do crescimento inicial das plântulas. Nas sementes selvagens e clone os nutrientes fósforo (P) foram mobilizados no início da germinação e crescimento inicial de plântulas, nitrogênio (N) e cálcio (Ca) são mobilizados mais no início da germinação e o potássio (K) e magnésio (Mg) são mobilizados no crescimento inicial das plântulas, os micronutrientes, o ferro (Fe) foi mobilizado no início da germinação e crescimento inicial das plântulas, manganês (Mn) é pouco mobilizado durante a germinação e o zinco (Zn) é mobilizado no início do crescimento inicial das plântulas. As sementes selvagens apresentaram alta atividade da lipase no início da germinação e crescimento inicial das plântulas, o clone no início da germinação, as maiores atividades de proteases para ambas procedências, foram no início do crescimento inicial das plântulas. Quanto à α -amilase, as sementes selvagens e clone apresentaram maiores atividades durante a germinação e crescimento inicial das plântulas e, fosfatase ácida, as sementes selvagens apresentaram alta atividade no crescimento inicial das plântulas e as de clone no início da germinação e o crescimento inicial das plântulas. Assim, as sementes selvagens e de clone apresentaram comportamento e estratégias distintas de mobilização de reservas durante a germinação das sementes e o crescimento inicial das plântulas.

Palavras-chave: bioquímica de sementes, reservas primárias e seringueira.

MOBILIZATION OF PRIMARY RESERVES DURING THE GERMINATION AND INITIAL GROWTH OF *HEVEA BRASILIENSIS* SEEDLINGS

ABSTRACT- During germination the seed storage tissues are targets of intense metabolic activities from the ingress of water into the seeds and these gather all the conditions to promote the growth of the embryo. Therefore, the mobilization of reserves is closely related to a flow of biochemical information that guarantees the energetic demands for the growth of the embryo and also the initial growth of the seedlings until they reach autotrophism. The objective of this study was to investigate the biochemical aspects related to the mobilization of the reserves (proteins, carbohydrates, lipids and minerals), as well as to determine enzymatic activity (α -amylase, proteases, lipase and acid phosphatase) during seed germination and initial seedlings of *H. brasiliensis*, seeds from wild matrices and clones from the state of Pará. The seeds were sown in plastic trays with washed sand under greenhouse conditions. The quantification of the primary metabolites and enzymatic activities were performed in the endosperm during the germination stages and seedling formation. Endosperm samples were lyophilized and ground, being used for extraction and quantification of the primary metabolites. Analyzes of the enzymatic activities were performed in the fresh endosperm samples. Total lipids extracted using petroleum ether, carbohydrates (soluble sugars and starch) with 80% ethanol and total and soluble proteins by the method of Kjeldahl and Bradford, respectively. Among the primary metabolites, the lipids correspond to the majority reserves stored in the endosperm of the seeds of the wild *H. brasiliensis* and clone species and were mobilized during germination and initial seedling growth. In the wild and clone seeds the proteins were also mobilized during germination and initial seedling growth and the soluble proteins were mobilized at the beginning of germination and exhibited protein bands in the bands of 7 to 30 kDa that may be associated with the main proteins of the route of synthesis of the latex. Additionally, the soluble sugar reserves were mobilized more intensely at the beginning of the germination and the starch at the beginning of the initial growth of the seedlings. In the wild and clone seeds the phosphorus (P) nutrients were mobilized at the beginning of germination and initial growth of seedlings, nitrogen (N) and calcium (Ca) are mobilized more at the beginning of germination and potassium (K) and magnesium (Mg) are mobilized in initial seedling growth, micronutrients, iron (Fe) was mobilized at the beginning of germination and initial seedling growth, manganese (Mn) is poorly mobilized during germination and zinc (Zn) is mobilized at the beginning of growth of seedlings. Wild seeds showed high lipase activity at the beginning of germination and initial seedling growth, the clone at the beginning of germination, the major protease activities for both origins were at the beginning of initial seedling growth, α -amylase, wild seed and Clone showed higher activity during germination and initial seedling growth, and acid phosphatase the wild seeds showed high activity in initial seedling growth and the clone at the beginning of germination and initial seedling growth. The wild and clone seeds presented distinct behavior and strategies for the mobilization of reserves during seed germination and seedling initial growth.

Keywords: seed biochemistry, primary reserves and rubber tree.

1. INTRODUÇÃO

As sementes são unidades de dispersão das plantas, contêm geralmente três distintos compartimentos que são o embrião (cotilédones e eixo embrionário), o endosperma e o tegumento, fundamentalmente, cada uma destas estruturas tem uma função principal, e o endosperma distingue-se como tecidos contendo reservas, tais como fonte de carboidratos, proteínas, lipídeos e nutrientes minerais para dar suporte à germinação e, por conseguinte, favorecer o crescimento e o desenvolvimento do embrião (Linkies, 2010; Nonogaki e Nonogaki, 2017). A reserva de nutrientes na semente é expressa pelos teores encontrados nas suas partes constituintes. Esses quantitativos variam entre espécies, cultivares e depende das condições do ambiente em que a semente foi produzida (Carvalho e Nakagawa, 1988). Em geral, as plantas apresentam dois grupos de componentes químicos: os que ocorrem normalmente como constituintes em todos os tecidos e aqueles que são materiais de reserva. Estes componentes são oriundos, por translocação, de elementos acumulados anteriormente em outras partes da planta ou diretamente como fotossintatos (Carvalho e Nakagawa, 2000).

O conhecimento da composição química, deposição e mobilização de reservas são indispensáveis para a tecnologia de produção de sementes, e influenciam na germinação e no vigor, caracterizando também o potencial de armazenamento das sementes (Buckeridge *et al.*, 2004; Bewley *et al.*, 2013).

Quando se discute a biologia das sementes é inevitável inferir que a germinação é um processo complexo, no qual a semente reduz o seu metabolismo celular no fim da maturação e volta a ativar o metabolismo, iniciando o desenvolvimento que irá fornecer eventos celulares essenciais para permitir o surgimento do embrião e prepara-ló para uma sequência de etapas de crescimento e desenvolvimento até a formação das plântulas. O início do processo de germinação ocorre pela absorção de água pelas sementes até que todos os conteúdos celulares sejam totalmente hidratados (Nonogaki *et al.*, 2010). Assim, esse processo consiste de um conjunto complexo e ordenado de eventos fisiológicos e bioquímicos que resultam na ruptura do tegumento pela raiz primária e que continua a desenvolver-se até que uma nova planta seja formada (Bewley *et al.*, 2013).

O processo de germinação de sementes inclui três fases relativamente bem definidas, a primeira fase de absorção de água, que ocorre de forma rápida e passiva;

depois, a segunda etapa, que se caracteriza por absorção de água de forma lenta; e a terceira fase, onde novamente as sementes começam a absorver água (Teulat-Merah *et al.*, 2011, Weitbrecht *et al.*, 2011).

Iniciada a germinação das sementes ocorre a ativação da síntese protéica e, a formação de enzimas hidrolíticas que darão início à mobilização das reservas (Dantas *et al.*, 2008). Do ponto de vista metabólico, é possível apresentar a germinação de sementes em duas etapas: a mobilização de reservas e a utilização dos produtos da hidrólise que representam a formação de novas estruturas celulares, bem como a formação de plântulas (Fu *et al.*, 2005, Soltani *et al.*, 2006). Os eventos celulares que ocorrem durante a germinação promovem a mobilização das reservas estocadas, com destaque para o metabolismo das proteínas, dos lipídeos e dos carboidratos (Bewley *et al.*, 2013).

Diante da ocorrência das duas etapas como mencionadas é válido destacar que a qualidade fisiológica das sementes se torna importante para a organização e a capacidade de mobilização de reservas que resulta na formação de plântulas mais vigorosas (Delgado *et al.*, 2015). Os nutrientes armazenados nos tecidos de reservas das sementes irão suprir os elementos necessários para o estabelecimento das plântulas em seus estádios iniciais de crescimento. A disponibilidade de nutrientes interfere na formação e composição química das sementes, afetando o metabolismo e também o vigor (Carvalho e Nakagawa, 2000). Dentre esses nutrientes, o nitrogênio destaca-se pela constituição das proteínas e por participar de funções metabólicas essenciais, assim como o fósforo nas demandas energéticas e os demais nutrientes como constituintes de paredes e de membranas celulares, além das atividades enzimáticas.

O processo de estabelecimento das plântulas ocorre após a germinação, e seu crescimento é inicialmente suportado por metabólitos produzidos pela hidrólise e conversão das principais reservas armazenadas, proteínas, carboidratos e lipídeos, semelhante ao que ocorre inicialmente com o embrião (Bewley, 2001). A finalidade principal da germinação é sintetizar as enzimas hidrolíticas para decompor os compostos de reservas, amido de parede, proteína e lipídeos das células do endosperma (Celus *et al.*, 2006).

Neste sentido, os carboidratos e os lipídeos atuam como fontes de energia e de carbono para a germinação, crescimento e desenvolvimento das plântulas, ao passo que as proteínas armazenam, principalmente, nitrogênio e enxofre, elementos

essenciais para a síntese de novas proteínas, ácidos nucléicos e compostos secundários para a plântula (Buckeridge *et al.*, 2000).

Estas considerações sendo destacadas enquanto aspectos estruturais são oportunos verificar que do ponto de vista funcional a embebição da semente marca uma grande mudança no metabolismo proteico. As proteínas, que foram sintetizadas e armazenadas em abundância na semente, podem ser hidrolisadas a aminoácidos livres para a biossíntese de novas proteínas e geração de energia, especialmente, associadas à respiração (Tan-Wilson e Wilson, 2012).

Deste modo, torna-se relevante conhecer aspectos bioquímicos e fisiológicos das sementes de *Hevea brasiliensis*, bem como as reservas associadas à mobilização durante a germinação de sementes e crescimento inicial das plântulas, uma vez que podem promover bases conceituais acerca do metabolismo da germinação, visando diferenciar sementes selvagens e de clone.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo investigar os aspectos bioquímicos relacionados à mobilização das reservas (proteínas, carboidratos, lipídeos e minerais) e atividades enzimáticas (α -amilase, proteases, lipase e fosfatase ácida) durante a germinação de sementes e crescimento inicial das plântulas de *H. brasiliensis*, proveniente de matrizes selvagens e clone.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

O material biológico (sementes de *Hevea brasiliensis*) foram coletadas de cinco matrizes de floresta nativa, em área localizada no Ramal Tatajuba km 17, localizada no município de Altamira-PA com as seguintes coordenadas geográficas, S 03° 18' 05" e W 052° 17' 12", e outra coleta de sementes provenientes de oito matrizes de plantio de *H. brasiliensis*, em área de plantio de seringueira, localizado próximo à rodovia BR 163, município de Belterra-PA, mesorregião do Baixo Amazonas com as seguintes coordenadas geográficas S 02° 38' 17" e W 054° 58' 34"

No laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal do INPA, as sementes das duas procedências foram submetidas à assepsia em hipoclorito de sódio a 2% durante 5 minutos, depois foram acondicionadas em bandejas plásticas (44 x 28,5 x 8,2 cm) utilizando areia lavada como substrato e mantida em casa de vegetação a temperatura

ambiente ($29 \pm 31^\circ\text{C}$). O acompanhamento e a contagem diária foram realizados usando como critério de germinação a emissão de primórdios radiculares (raiz primária e secundária) e hipocótilo.

As análises de mobilização das reservas (proteínas, carboidratos, lipídeos e minerais) foram realizadas em sementes quiescentes (SQ); sementes embebidas, após 24 horas de embebição (SE); primórdios radiculares (PR); alongamento da raiz secundária (RS); alongamento da raiz primária (RP); emissão do epicótilo (EP); emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX) (Figura 1).

Em cada estágio analisado foi realizada a dissecação da semente, separando os cotilédones do eixo embrionário, do endosperma e do tegumento. Os endospermas foram liofilizados e triturados em moinho analítico (Ika-Werke/M20), até a obtenção de material finamente pulverizado.

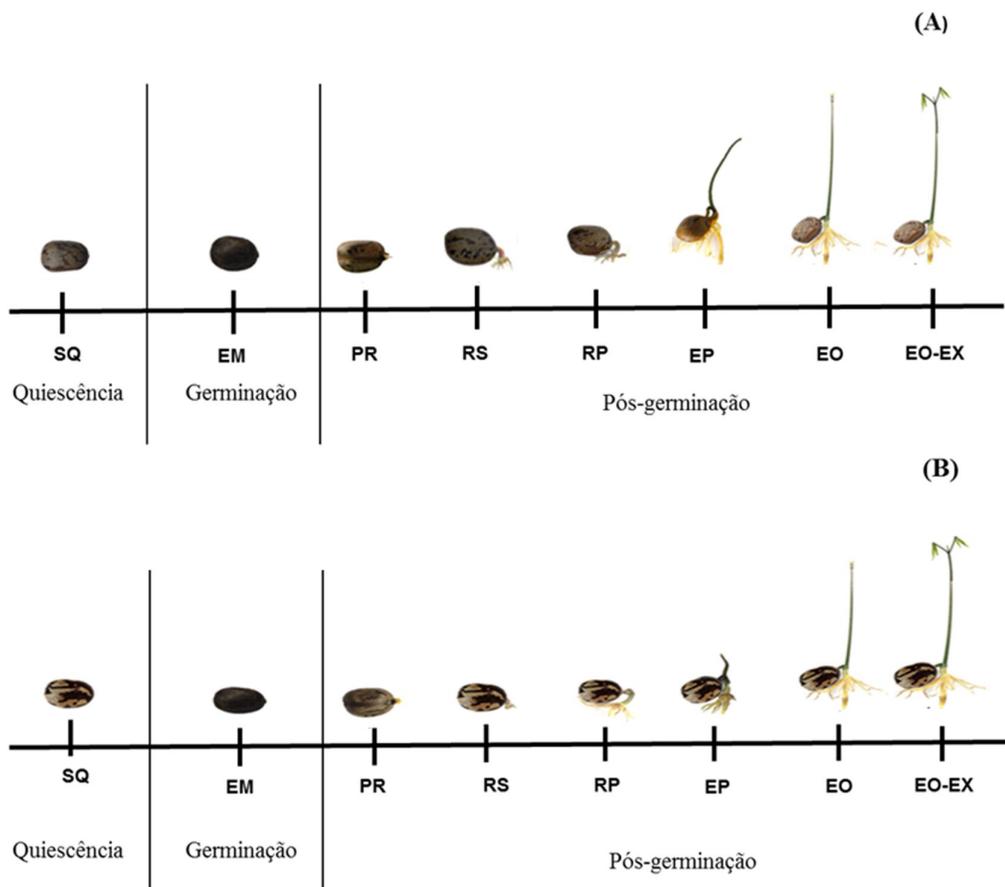


Figura 1. Estádios de germinação e eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Hevea brasiliensis*. **(A)** selvagem. **(B)** Clone. (SQ): sementes quiescentes. (SE): sementes embebidas, após 24 horas de embebição. (PR): primórdios radiculares.

(RS): alongamento da raiz secundária. (RP): alongamento da raiz primária. (EP): emissão do epicótilo. (EO): emissão dos eofilos. (EO-EX): expansão dos eofilos.

2.2 Extração e quantificação de Lipídeos

Os lipídeos totais foram estimados com base na massa, segundo o método modificado de Silva (1990). Amostras pulverizadas foram colocadas em cartuchos de papel e acondicionadas em aparelho tipo soxhlet, sendo mantidas em refluxo durante seis horas a 65 °C, usando éter de petróleo como extrator.

Ao final da extração, os cartuchos foram retirados, secos e pesados. O teor de lipídeos foi estimado pela diferença de peso da amostra seca inicial e final. O material desengordurado resultante foi utilizado para análises de carboidratos e de proteínas.

2.3 Extração e quantificação de proteínas totais

O material finamente pulverizado e desengordurado, proveniente dos diferentes estádios (pré e pós-germinação) foi seco em estufa a 65°C durante 72 horas e foram determinadas pelo método de Kjeldahl. Amostras de 100 mg do material desengordurado foram colocadas em tubo de ensaio juntamente com 5,0 mL de solução digestora. A digestão da amostra foi realizada por via úmida, utilizando-se bloco digestor a 350°C até a obtenção de líquido incolor. Em seguida, realizou-se a destilação adicionando-se 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 40% após mistura da amostra em 20 mL de água destilada. A titulação foi realizada utilizando ácido sulfúrico a 0,01 N (Bremner, 1996).

A quantificação de proteínas totais foi realizada a partir da estimativa do conteúdo de nitrogênio total, utilizando-se o fator de correção igual 5,5 (Ezeagu *et al.*, 2002). As análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Extração e quantificação de proteínas solúveis

O material finamente pulverizado, proveniente dos diferentes estádios (pré e pós-germinação), foram submetidos à extração em NaCl 0,15 M (10% p/v). A extração ocorreu sob homogeneização durante duas horas à temperatura ambiente (26 ± 3°C), seguida de centrifugação a 11.000 x g durante 20 minutos a 10°C. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante 72 horas, para retirada do sal e, então, liofilizado durante 96 horas, resultando no extrato proteico.

Amostras com 2 mg de extrato proteico foram pesadas e diluídas em 1 mL de água destilada. Após esse procedimento a concentração de proteínas foi estimada a partir da incubação de 100 µL das amostras com 3 mL do reagente de Bradford (BioAgency) durante 10 minutos a temperatura ambiente ($26 \pm 3^\circ\text{C}$), utilizando-se a albumina sérica bovina (BSA, BioAgency) de acordo com o método descrito por Bradford (1976). O teor de proteínas foi determinado por meio de leituras espectrofotométricas a 595 nm (UV /Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences).

2.4.1 SDS-PAGE

Os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% e de N-N'-metilenobis-acrilamida 0,8% m/v. O gel de concentração a 5% foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e o gel de separação 12,5%, em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, sendo acrescentado em ambos SDS 20% m/v. A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED e PSA 10% m/v.

A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1%, a 200 volts, 15 mA/gel, durante 2 horas. Marcadores de massas moleculares da marca Promega com intervalos de bandas moleculares de 10 - 100 kDa foram utilizados.

Após as corridas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue dissolvido em ácido acético 0,1% v/v, etanol e água destilada 1:4:5 v/v/v durante 2 horas e, então, descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v) durante 1 hora. Os géis foram escaneados no ImageScanner e depois de editadas foi feita a estimativa da massa molecular das proteínas em comparação com o marcador molecular.

2.5 Análise de carboidratos

2.5.1 Extração de açúcares solúveis totais e amido

Os carboidratos foram extraídos conforme metodologia descrita por Black *et al.*, (1996), com modificações. Amostras de 200 mg de material desengordurado foram homogeneizadas em 1 mL de álcool 80% e, posteriormente, mantidas em banho maria a 75°C durante 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm durante cinco minutos, repetindo-se esse processo por mais três vezes.

Os sobrenadantes foram misturados em amostra única e, posteriormente, secos em estufa a 50°C até total evaporação do álcool; ressuspensos em 1 mL de água destilada, o qual foi utilizada para as análises de açúcares solúveis totais. Os precipitados, após secos em estufa, foram utilizados para extração de amido.

A extração do amido foi realizada a partir de 20 mg do precipitado proveniente da extração dos açúcares solúveis totais, adicionado 1,0 mL de ácido perclórico 35%, agitado em vortex e deixando digerir o amido durante 15 minutos. Após a digestão as amostras foram centrifugadas a 10.000 g, durante cinco minutos.

2.5.2 Quantificação de açúcares solúveis totais e amido

A quantificação de açúcares solúveis foi realizada a partir da diluição de 20 µl da amostra adicionando-se 80 µl de água destilada. Dessa diluição original, retirou-se 20 µl e adicionou-se 980 µl de água destilada, 500 µl de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico.

A quantificação do amido foi realizada em alíquotas de 10 µL do sobrenadante, adicionadas à 990 µL de água destilada, 500 µL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico P.A. Tanto os açúcares solúveis totais quanto o amido foram quantificados por espectrofotometria com leitura a $\lambda = 490$ nm, utilizando-se a glicose (Sigma) como padrão, conforme metodologia descrita por Dubois *et. al.*, (1956).

2.6 Extração e quantificação de Fósforo

Os teores de nutrientes foram determinados nas amostras desengorduradas e secas em estufa com ventilação forçada (60 - 65°C) até atingir massa constante.

O P foi determinado pelo método molibdato de amônio em espectrofotômetro Shimadzu UV-VIS-120-01 ($\lambda = 660$ nm) (Murphy e Riley, 1962).

2.7 Extração e quantificação de N

A quantificação do nitrogênio total foi realizada pelo método de Kjeldahl após secagem em estufa a 65°C durante 72 horas. Amostras de 100 mg do material desengordurado foram colocadas em tubo de ensaio juntamente com 5,0 mL de solução digestora. A digestão da amostra foi realizada em bloco digestor a 350 °C até o material apresentar-se incolor. Em seguida, realizou-se a destilação adicionando-se 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 40% após mistura da amostra em 20 mL de água

destilada. O destilado foi coletado em becker contendo 10 mL de ácido bórico (H_3BO_3) solução receptora (Bremner 1996).

A destilação se completou quando o volume do becker chegou a 60 mL de uma solução com coloração verde menta, indicando a presença de nitrogênio na amostra. A titulação foi realizada utilizando ácido sulfúrico a 0,01 N.

2.8 Extração e quantificação de K, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn

Os nutrientes K, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn foram extraídos por digestão nitro-perclórica (Miyazawa *et al.*, 1999) e a determinação foi realizada por espectrometria de absorção atômica.

2.9 Detecção da atividade da lipase (EC. 3.1.1.3)

A atividade da lipase foi determinada a partir de 100 mg de extrato fresco de semente diluído em 1 mL de tampão Tris HCl 0,1 M pH 8,0, em seguida, as amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ durante 10 minutos a $10^\circ C$. No meio de reação, foi utilizado 1625 μL de tampão Tris HCl 0,1 M pH 8,0; 75 μL de solução p-nitrofenil dodecanoate 5 mM e 300 μL de extrato, para se obter o volume final de 2 mL. O ensaio foi incubado a $55^\circ C$ durante 20 minutos em banho-maria. Logo após a reação foi paralisada em banho de gelo durante 20 minutos e, foi utilizado controle positivo com a enzima lipase comercial (5 mg/mL) e o branco contendo o meio de reação sem amostra. A absorbância de p-nitrofenol liberado foi medida a $\lambda = 410$ nm em espectrofotômetro (UV/Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences). A concentração de p-nitrofenol liberada na reação foi determinada a partir de uma curva de referência do p-nitrofenol (2-20 g/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8). Os ensaios foram realizados em triplicata. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como micromoles de p-nitrofenol liberado a partir de p- nitrofenil dodecanoate por mL por minuto (Kumar *et al.*, 2005).

2.10 Detecção da atividade proteolítica total

A atividade proteolítica total foi estimada a partir de ensaio enzimático contendo 300 μl (50 mg/mL em acetato de sódio 50 mM pH 5,0) das amostras de material fresco, foram pré-incubadas com 40 μl de DTT 3 mM por 10 min a $37^\circ C$, 200 μl de azocaseína 1 % e o volume ajustado para 500 μl com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Após 60 min a $37^\circ C$, a reação foi parada com adição de 300 μl de ácido tricloroacético

(TCA) 10 %. Foi utilizado controle positivo com enzima bromelaina e branco contendo o meio de reação com adição da azocaseína após a paralisação da reação. Os tubos foram centrifugados (5.000 x g por 10 min a 25 °C) e 400 µl do sobrenadante foram alcalinizados com 400 µl de uma solução de hidróxido de sódio 2 N e a absorbância medida por espectrofotômetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) a 420 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,01 (Xavier-Filho, 1989).

2.11 Detecção da atividade da α -amilase (EC. 3.2.1.1)

A atividade da enzima α -amilase foi determinada a partir da pré-incubação de 200 µL dos extratos de material fresco das sementes (50 mg/mL em tampão acetato de sódio 0,1 M contendo NaCl 3 mM pH 5,5) com 100 µL do mesmo tampão citado durante 15 minutos a 40°C. Em seguida, 2 mL de amido 1% foram adicionados, dando prosseguimento à reação durante mais dez minutos. Dois controles positivos foram utilizados, com enzima comercial α -amilase e meio de reação (tampão, amido e lugol) e o branco com meio de reação menos a amostra. A reação foi paralisada em banho de gelo após trinta minutos, e, em seguida realizado resfriamento, 100 µL desta reação foi adicionada a 2,5 mL de solução de lugol (iodo 5% e iodeto de potássio 10%), deixando as amostras incubadas durante trinta minutos. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a $\lambda=550$ nm em espectrofotômetro (UV/ Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) (Bezerra *et al.*, 2004).

2.12 Detecção da atividade fosfatase ácida (EC 3.1.3.2)

A atividade da fosfatase ácida foi determinada a partir de 50 mg de extrato fresco de semente diluído em 1 mL de tampão acetato 0,1M pH 5,7, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos a 10 °C. No meio de reação, foi utilizado 35 µl do extrato e incubada em 135 µl de tampão acetato 50 mM pH 5,7, contendo 10 µl do substrato p-nitrofenil fosfato de 5 mM durante 15 minutos a 37°C em banho maria. Foi utilizado o branco (solução tampão e água destilada). Posteriormente, a reação foi paralisada pela adição de 20 µl hidróxido de sódio 0,2 N. A intensidade da coloração amarelada foi mensurada a partir de leituras espectrofotométricas em placas de microtitulação a $\lambda = 405$ nm. A atividade da fosfatase ácida foi calculada a partir de uma curva padrão construída com diferentes

concentrações de p-nitrofenol. Uma unidade de atividade da fosfatase ácida foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto (Maia *et al.*, 2000).

2.13 Delineamento experimental e análises estatísticas

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), utilizando dois tipos de sementes (selvagem e clone) e oito estádios germinativos (SQ, EM, PR, RS, RP, EP, EO e EO-EX) com 3 repetições para cada tratamento.

As análises estatísticas dos dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro Wilks) e homogeneidade de variância (teste F) e, atendendo essas premissas, foram realizados a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado para a realização das análises foi o SigmaPlot 12.0.

Foi realizada análise de componentes principais (PCA) considerando as variáveis: metabólitos primários (lipídeos, carboidratos, proteínas e nutrientes) e enzimas (lipase, proteases, α -amilase e fosfatase ácida). A análise estatística foi realizada com o software estatístico e linguagem de programação R.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As reservas mais abundantes em sementes de *H. brasiliensis* são os lipídeos com cerca de 52% para sementes selvagens e 42% para sementes de clone (Tabela 1). Os resultados obtidos no presente estudo foram similares ao encontrado por outros pesquisadores que relataram grandes quantidades de lipídeos em sementes de *H. brasiliensis*, algo em torno de 40 a 50% (Onoji *et al.*, 2016; Reshad *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015; Ahmad *et al.*, 2014; Widirany *et al.*, 2014; Mohd-Setapar *et al.*, 2013; Gimfun *et al.*, 2012; Chanjula *et al.*, 2011; Morshed *et al.*, 2011). No entanto, na literatura também é possível verificar médias abaixo da faixa acima mencionada entre 11 a 24% ou até mesmo até mesmo acima com valores da ordem de 60 a 91% Roschat *et al.*, 2017; Hossain *et al.*, 2015; Lourith *et al.*, 2014; Chaiya e Reubroycharoen, 2013; Eka *et al.*, 2010; Abdullah *et al.*, 2009; Jibrail *et al.*; 2008; Oyekunle e Omode, 2008).

A segunda maior reserva encontrada nas sementes de *H. brasiliensis* selvagens e clone foi as proteínas com valores na ordem de 14,8 e 14%, seguida dos carboidratos, açúcares solúveis e amido com 5 e 10%, respectivamente (Tabela 1).

Para as reservas de proteínas resultados similares foram encontrados por outros pesquisadores, uma vez que na literatura é possível encontrar valores que variam de aproximadamente 17 a 26% Hossain *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015; Widirany *et al.*, 2014; Chanjula *et al.*, 2011; Eka *et al.*, 2010; Oyekunle e Omode, 2008. Para as reservas de carboidratos resultados similares também foram encontrados por outros pesquisadores, valores que variam de 5 a 9% Eka *et al.*, 2010; Oyekunle e Omode 2008).

As reservas minerais presentes nas sementes que mais se destacaram foram os teores de Zn, Fe e Mn, que apresentaram valores de 13 e 7 g/kg, respectivamente, os demais nutrientes, N, Mg e Ca, apresentaram valores na ordem de 2,6, 3,8 e 0,17 g/kg. Resultados divergentes foram encontrados por outros pesquisadores, uma vez que na literatura é possível encontrar valores que variam de 0,2 a 0,8 para Ca e 0,9 a 1,2 para Mg e K 0,4 g/kg (Eka *et al.*, 2010; Oyekunle e Omode, 2008).

Tabela 1: Reservas de sementes *Hevea brasiliensis* de sementes selvagem e clone.

Material estudado	Metabolitos primários (%)*						Nutrientes (g/kg)**					
							Macro			Micro		
	LI	PB	AM	AS	K	P	N	Ca	Mg	Zn	Fe	Mn
Selvagem	52.0	14.8	10	5	12.64	8.6	2.6	0.17	3.80	110	137	29
Clone	42.0	14	10	4.5	11.46	6.1	2.6	0.20	3.16	73	88	14

Tabela 2: Trabalhos publicados sobre quantificação de reservas em sementes *Hevea brasiliensis* nos últimos 10 anos.

Pesquisadores	Metabolitos primários (%)*						Nutrientes (g/kg)**					
							Macro			Micro		
	LI	PB	AM	AS	K	P	N	Ca	Mg	Zn	Fe	Mn
Jibrail <i>et al.</i> , 2008	68.5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Oyekunle e Omode, 2008	91.0	22.9	---	4.8	0.4	---	---	0.2	---	4.1	1.7	---
Abdullah <i>et al.</i> , 2009	59.7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Salimon <i>et al.</i> , 2009	52.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Eka <i>et al.</i> , 2010	68.0	17.4	---	6.9	---	---	---	0.8	0.9	---	0.1	---
Yusup e Khan, 2010	50.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Chanjula <i>et al.</i> , 2011	40.8	23.6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Morshed <i>et al.</i> , 2011	49.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Gimbun <i>et al.</i> , 2012	40.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Chaiya e Reubroycharoen, 2013	34.3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Mohd-Setapar <i>et al.</i> , 2013	47.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ahmad <i>et al.</i> , 2014	45.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Lourith <i>et al.</i> , 2014	22.9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Mohd-Setapar <i>et al.</i> , 2014	60.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Widirany <i>et al.</i> , 2014	50.0	23.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Hossain <i>et al.</i> , 2015	11.0	26.1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Reshad <i>et al.</i> , 2015	46.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Zhou <i>et al.</i> , 2015	42.0	18.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Onoji <i>et al.</i> , 2016	40.4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Roschat <i>et al.</i> , 2017	24.0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

*LI-lipídeos; PB- proteína bruta; AM-amido; AS-açúcares solúveis.

**K-potássio; P-fósforo; N-nitrogênio; Ca-cálcio; Mg-magnésio; Zn-zinco; Fe-ferro; Mn-manganês.

3.1 Lipídeos

Os teores de lipídeos nas sementes quiescentes selvagens e do clone foram de 53 e 43%, respectivamente (Figura 2). Estes valores são elevados o suficiente para sementes de *H. brasiliensis* serem consideradas sementes oleaginosas e, por conseguinte, possuírem finalidades aplicadas em diferentes produtos comerciais. Mas, do ponto de vista biológico, e em particular, no que se refere ao acúmulo e uso dessas reservas durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas foi possível verificar, neste trabalho, que dos teores de lipídeos iniciais das sementes selvagens e do clone as mesmas apresentaram cerca de 10% de diferença nos teores de lipídeos. Na fase EM e PR ocorreu decréscimo para sementes selvagens e de clone. As diminuições nos teores de lipídeos nestas fases foram mais intensas sugerindo o uso mais acentuado desta reserva. A lógica de decréscimo dos teores de lipídeos se manteve nas fases de RS, RP, EP para ambas as sementes. Nas últimas fases EO e EO-EX apresentaram decréscimos maiores das reservas de lipídeos (Figura 2). O conteúdo de lipídeos no endosperma das sementes de *H. brasiliensis*, tanto para sementes selvagens quanto do clone, diminuiu durante as fases de germinação e crescimento inicial das plântulas, indicando uso dessa reserva durante todo o processo de germinação das sementes. Geralmente, a mobilização dos lipídeos ocorre, principalmente, no início do desenvolvimento das plântulas (Graham, 2008), iniciando durante a germinação e com sua principal fase de consumo no início do desenvolvimento da plântula (Yang *et al.*, 2009). Como a fotossíntese e os sistemas de absorção mineral não são ativos durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas, a energia para atividades fisiológicas de sementes são fornecidas a partir de reservas (Yu *et al.*, 2014).

As sementes oleaginosas, depois de germinarem, metabolizam os triacilgliceróis armazenados, convertendo-os em carboidratos para a geração de energia, pois as plantas não dispõem de mecanismo para o transporte de gorduras no endosperma para os tecidos radiculares e órgãos aéreos das plântulas (Taiz e Zeiger, 2013). O armazenamento de lipídeos em sementes é uma característica generalizada em plantas superiores, que tem a função principal de servir como fonte de energia ao embrião durante o estágio heterotrófico até o estágio autotrófico com a ativação fotossintética da planta (Pujar *et al.*, 2006). Adicionalmente, esse estágio é

fundamental no sucesso ou no fracasso da planta, emergindo e estabelecendo uma nova planta (Bewley e Black, 1994).

Os lipídeos (triacilgliceróis) estocados desempenham papel importante no ciclo de vida de muitas plantas, fornecendo esqueletos de carbono que suportam o crescimento e desenvolvimento além da manutenção das plantas jovens imediatamente após a germinação das sementes (Bewley e Black, 1994; Graham, 2008).

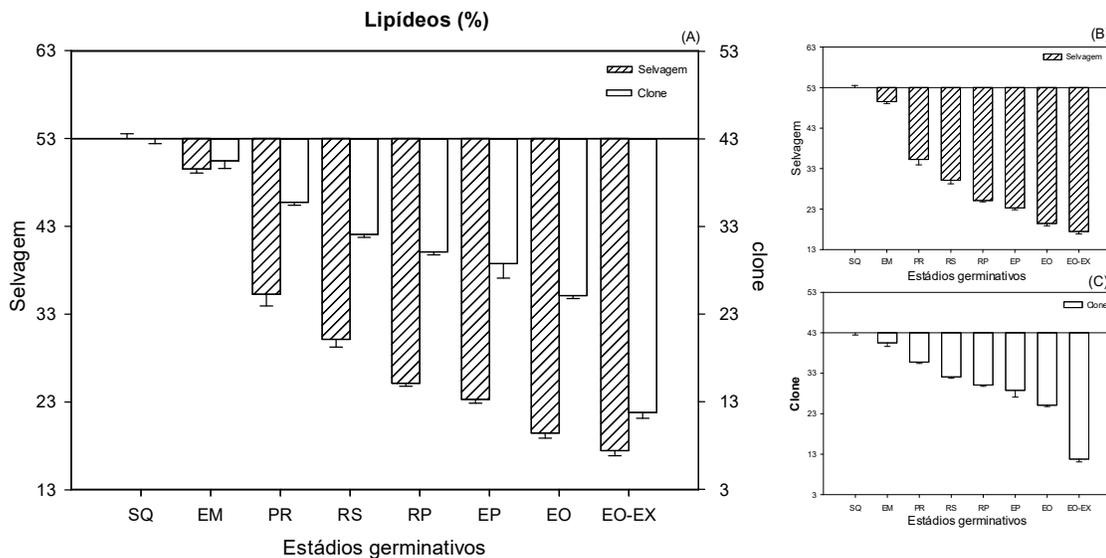


Figura 2. (A) Alterações nos teores de lipídeos em sementes de *Hevea brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. (B) teor de lipídeos semente selvagem. (C) teor de lipídeos semente de clone. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (EM), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX). *Erro padrão= 0,73.

Estudos com outras espécies, como *Euphorbia heterophylla* encontraram resultados similares a esse estudo, os autores observaram intensa degradação de lipídeos armazenados logo após a embebição. Adicionalmente, estudos com análises do endosperma de sementes de *Jatropha curcas* demonstraram diminuição no teor de lipídeos após 96 horas de embebição e sugeriram que os lipídeos eram mobilizados e consumidos durante os estádios de germinação e o crescimento inicial das plântulas (Suda e Giorgini, 2000; Yang *et al.*, 2009). Ainda, estudos com a espécie *Jatropha curcas* a síntese de lipídeos ocorreu antes da protusão da raiz, aumentando o teor de lipídeos das sementes em 19,5% e outro trabalho evidenciou em sementes de *J. curcas* diminuição dos teores de lipídeos 8 dias após a embebição, caracterizando

mobilização dessa reserva (Lopes et al., 2013; Alencar et al., 2015). Obviamente, que estes resultados sugerem algumas contradições em termos de tempo de mobilização dos lipídeos, mas antes de emitir informações precipitadas, seria bastante seguro que se verificasse a origem das sementes, o grau de maturação, o local e a forma que as sementes foram coletadas, armazenadas e processadas para os experimentos de mobilização. O fato é que sementes ricas em lipídeos são susceptíveis à proliferação de microorganismos causando deterioração das sementes e conseqüentemente alteração no metabolismo em termos de síntese e degradação de compostos orgânicos.

No geral, as sementes oleaginosas apresentam rápida degradação de lipídeos no início da emissão da radícula e termina com a completa expansão dos eofilos. Vale ressaltar que esse padrão não é usual, quando comparado com outras sementes oleaginosas, nas quais as reservas de lipídeos permanecem inalteradas durante o período inicial da germinação e crescimento inicial das plântulas (Matsui *et al.*, 1999; Suda e Giorgini, 2000).

3.2 Proteínas totais e solúveis

As proteínas são macromoléculas importantes na regulação metabólica das sementes e são essenciais para a síntese de novas proteínas para o crescimento e o desenvolvimento do embrião e sustentação das plântulas. Assim, durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas, as proteínas armazenadas nos corpos proteicos são degradadas por proteases convertendo proteínas insolúveis em peptídeos solúveis para geração de aminoácidos livres (Bewley e Black, 1994; Muntz et al., 2001). Adicionalmente, muitas proteínas estão associadas durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas como proteínas envolvidas no metabolismo, energia, síntese protéica, crescimento, divisão celular, defesa e de armazenamento (Sano *et al.*, 2012).

Nas sementes selvagens e do clone, para as proteínas totais e solúveis verificou-se eventos de acúmulo e diminuição dos teores de proteínas durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas (Figura 3 e 4).

As concentrações de proteínas totais nas sementes quiescentes selvagens e do clone foram de 15 e 14%, respectivamente (Figura 3). Na fase EM verificou-se aumento para ambas as sementes. O aumento nos teores de proteínas totais nessa fase sugere intensa atividade metabólica e síntese de novas proteínas para sustentar

o crescimento e o desenvolvimento do embrião até formar a plântula. Na fase PR, RS e RP observou-se decréscimo para ambas as sementes, apresentando maior degradação na fase RP. Na fase EP, tanto para sementes selvagens quanto do clone apresentaram teor de proteínas similares. Nas fases EO e EO-EX apresentaram decréscimos maiores das reservas de proteínas totais para sementes selvagens e do clone. O conteúdo de proteínas totais no endosperma das sementes de *H. brasiliensis* tanto para sementes selvagens quanto do clone diminuiu durante as fases de germinação e o crescimento inicial das plântulas, indicando o início do uso dessa reserva durante todo o processo de germinação das sementes.

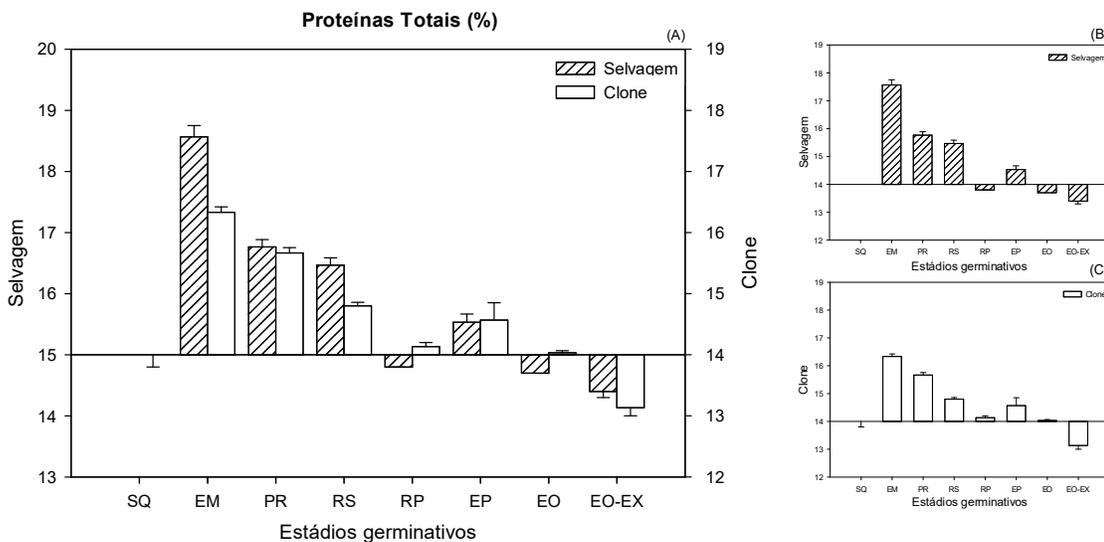


Figura 3. (A) Alterações nos teores de proteínas totais em sementes de *Hevea brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. **(B)** teor de proteínas totais em semente selvagem. **(C)** teor de proteínas totais em semente de clone. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (EM), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX). *Erro padrão= 0,17.

Nas sementes selvagens e clone, assim como para proteínas totais, para as proteínas solúveis também verificou-se eventos de acúmulo e diminuição dos teores de proteínas durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas (Figura 4).

As concentrações de proteínas solúveis nas sementes quiescentes selvagens e clone foram de 0,7 e 0,8%, respectivamente (Figura 4). Na fase EM verificou-se decréscimo para ambas as sementes, caracterizando nessa fase intensa atividade metabólica com o uso das proteínas solúveis. Na fase PR, observou-se acúmulo de

proteínas solúveis, para sementes selvagens e do clone. Na fase RS e RP para ambas as sementes observou-se decréscimo tanto para sementes selvagens quanto para do clone. Na fase EP para semente selvagem observou acúmulo e para o clone decréscimo. Nas últimas fases EO e EO-EX apresentaram decréscimos maiores das reservas de proteínas solúveis para ambas as sementes. Assim sugere-se tanto para sementes selvagens quanto do clone maior mobilização das reservas de proteínas durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas.

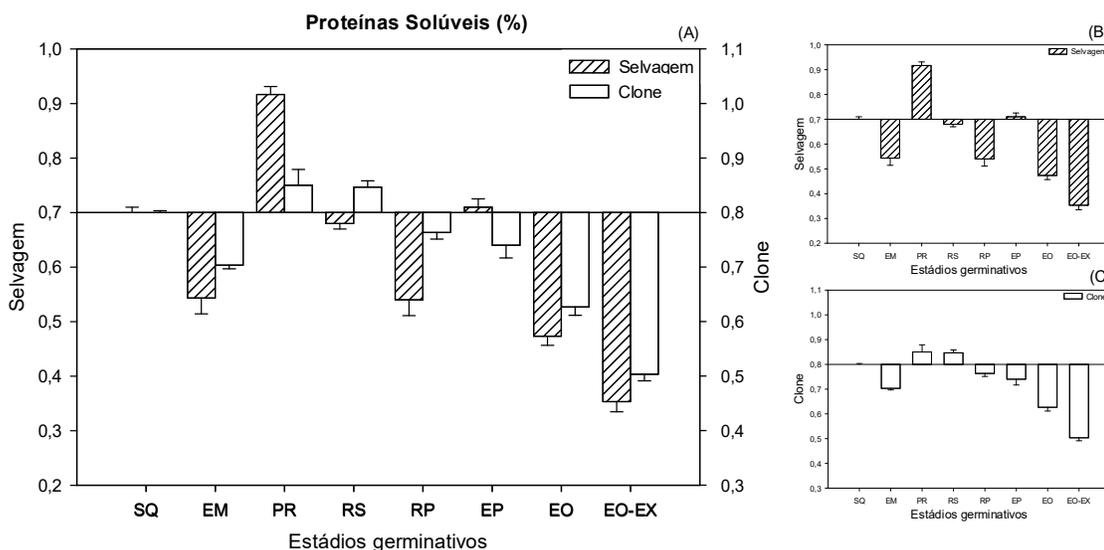


Figura 4. (A) Alterações nos teores de proteínas solúveis em sementes de *Hevea brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. (B) teor de proteínas solúveis em semente selvagem. (C) teor de proteínas solúveis em semente de clone. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (EM), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX). *Erro padrão= 0,04.

Sementes selvagens e do clone apresentaram valores médios 14% de proteínas totais. Estudos têm relatado alta porcentagem de proteínas totais em sementes de *H. brasiliensis* e outras espécies pertencentes à mesma família, *Manihot glaziovii*, *Manihot pseudoglaziovii*, *Manihot piauhyensis* e *Jatropha curcas*, variando de 15 a 30% (Martins *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009; Widyarani *et al.*, 2014; Hossain *et al.*, 2015; Alencar *et al.*, 2015).

As reservas de proteínas solúveis apresentaram baixa porcentagem, em média, valores de 0,7 e 0,8% para sementes selvagens e clone, respectivamente. Estudo similar com a espécie *Jatropha curcas* em termo de abordagem da mobilização

durante o processo germinativo, também encontraram valor baixo de proteínas solúveis, cerca de 1% (Leitão *et al.*, 2015).

Estudos com a espécie *Euphorbia heterophylla* e *J. curcas*, demonstraram que os principais períodos de mobilização das proteínas solúveis ocorreram entre 60 e 84 horas de embebição, resultados similares ao encontrado nesse estudo para sementes selvagens e do clone de *Hevea brasiliensis* (Suda e Giorgini, 2000; Lopes *et al.*, 2013). Nesse trabalho, quando se refere ao início e o fim das análises nos diferentes estádios germinativos, tanto para proteínas totais quanto para proteínas solúveis verificaram-se decréscimos nos teores proteicos para as duas procedências de sementes, selvagem e do clone.

3.2.2 Perfil proteico

Os perfis proteicos sugerem muitas possibilidades metabólicas para as células durante o processo germinativo, tanto os resultados quantitativos conforme acima mencionados quanto os dados qualitativos. As análises eletroforéticas revelaram nesse estudo, grande número de bandas proteicas em sementes selvagens e clone de *Hevea brasiliensis* durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas, tanto em condições redutoras (presença de β -mercaptoetanol) quanto em condições não redutoras (ausência de β -mercaptoetanol), com massas moleculares aparentes variando de 7 a 30 kDa para sementes selvagens e de 7 a 40 kDa para sementes de clone (Figura 5).

Nas fases SQ, EM, PR e RS, para ambas sementes, (selvagens e clone) observou-se padrão de bandas proteicas de massas moleculares aparentes de 7 a 30kDa. As proteínas com massas moleculares aparente entre 7 a 30 kDa são bem evidentes em sementes nessas fases, podendo ser vistas nos demais estádios de germinação, porém com menor evidência.

Na fase RP, para as sementes selvagens, verificou-se o mesmo padrão das bandas proteicas em comparação com as fases anteriores, já para as sementes do clone, além de bandas com padrões similares às das fases anteriores, apresentou outras proteínas, cuja massa molecular aparente foi estimada em 27 e 40 kDa.

Nas fases EP, EO e EO-EX para sementes selvagens, observou-se redução também de intensidade das bandas proteicas visualizadas nas fases anteriores, com destaque para as proteínas de 7 kDa.

Nas sementes de clone observou-se redução da intensidade de proteínas nas faixas de 12 e 14 kDa, ao longo do crescimento inicial das plântulas (Figura 5).

Assim, sugere-se para as sementes selvagens e clone mudanças nos padrões eletroforéticos de proteínas solúveis durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.

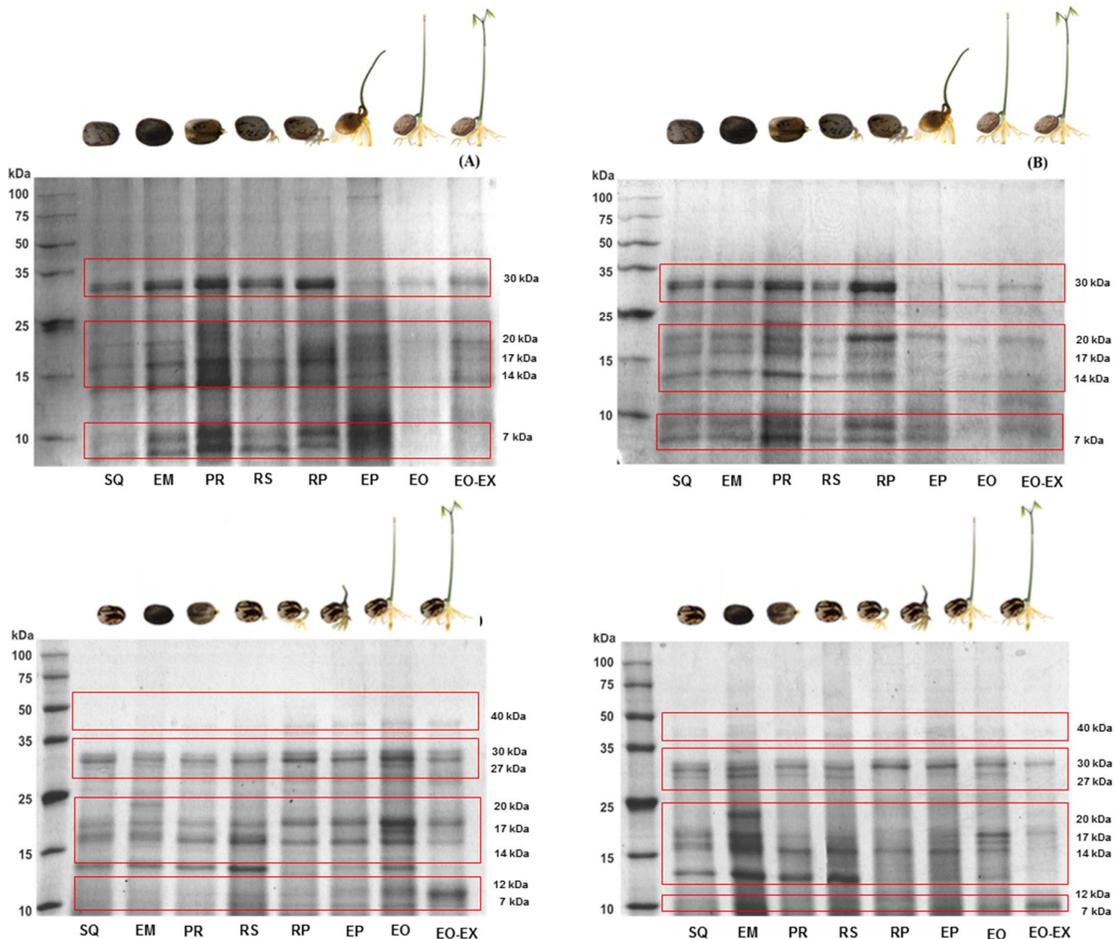


Figura 5. Perfil eletroforético dos extratos proteicos durante a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de *Hevea brasiliensis* selvagem e clone. M- marcador de massa molecular (kDa). SQ- semente quiescente. EM- semente embebida. PR- primórdios radiculares. RS- alongamento da raiz secundária. RP- alongamento da raiz primária. EP- emissão do epicótilo. EO- emissão dos eofilos. EO-EX- eofilos expandidos.

(A) amostras em condições não redutoras (sem β -mercaptoetanol). (B) amostras em condições redutoras (com β -mercaptoetanol) de sementes selvagens. (C) amostras em condições não redutoras (sem β -mercaptoetanol). (D) amostras em condições redutoras (com β -mercaptoetanol) de sementes de clone.

Resultado similar ao presente estudo foi encontrado para diferentes sementes da família Euphorbiaceae incluindo a espécie *Euphorbia heterophylla*, em que exibiram predominantemente de dois grupos proteicos com faixas de bandas moleculares de (20 a 25 kDa e 29 a 35 kDa) (Lalonde *et al.*, 1984).

Nesse contexto de prospecção proteica é válido destacar que a via mevalonato tem sido estipulada como a rota de síntese do látex e, dentre as proteínas com papel fundamental nesta rota metabólica estão as de membranas das partículas de látex (7,9 a 27 kDa), com ênfase nas proteínas de fator de alongação de borracha (*rubber elongation factor* – REF) que possui massa molecular de 14,7 kDa e as proteínas de partículas pequenas de borracha (*small rubber particle protein* - SRPP) de 22,3 kDa (Berthelot, 2014).

A partir da observação dos perfis proteicos, constatou-se a presença de proteínas nas faixas de 14 a 17 kDa para sementes selvagens e 12 a 14 kDa para sementes do clone, sugerindo que essas faixas proteicas possam estar associadas a REF, uma das principais proteínas associadas à síntese do látex. Além disso, estudos têm relatado início da formação de laticíferos e síntese de látex em sementes de *H. brasiliensis* (Gomez, 1982; Mesquita e Oliveira, 2010).

Nessa linha de raciocínio relacionando à presença de proteínas ligadas a síntese de látex já durante a germinação também podem ser atribuídas à sequência de aminoácidos da proteína REF não possui resíduos de cisteína em sua composição, que pode estar relacionada com a permanência das bandas da faixa de 14 kDa, mesmo em condições redutoras com o uso do β -mercaptoetanol, um redutor de pontes de dissulfeto. Enfim, as sementes oriundas de sementes selvagens e de clone indicaram a presença de possíveis proteínas ligadas à síntese de látex durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.

3.3 Açúcares solúveis

Os teores de açúcares solúveis nas sementes quiescentes selvagens e do clone foram de cerca de 5 e 4,5%, respectivamente (Figura 6). No que se refere ao acúmulo e uso dessas reservas durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas foi possível verificar, neste estudo, que as sementes selvagens e do clone apresentaram baixos teores de açúcares solúveis. Nas fases EM e PR ocorreu decréscimo para ambas as sementes, já na fase RS ocorreu intenso decréscimo, a diminuição nos teores de açúcares solúveis nesta fase foi mais intensa sugerindo

intensa mobilização dessa reserva para sustentação dos novos tecidos em desenvolvimento e crescimento do embrião. Nas fases RP, EP e EO observou-se também decréscimo de açúcares tanto para as sementes selvagens quanto para do clone. Na última fase EO-EX observou-se acúmulo dos teores de açúcares solúveis para sementes selvagens e do clone, sugerindo acúmulo dessa reserva próxima ao valor original para manutenção das plântulas até o total esgotamento de suas reservas e assim atingir seu autotrofismo.

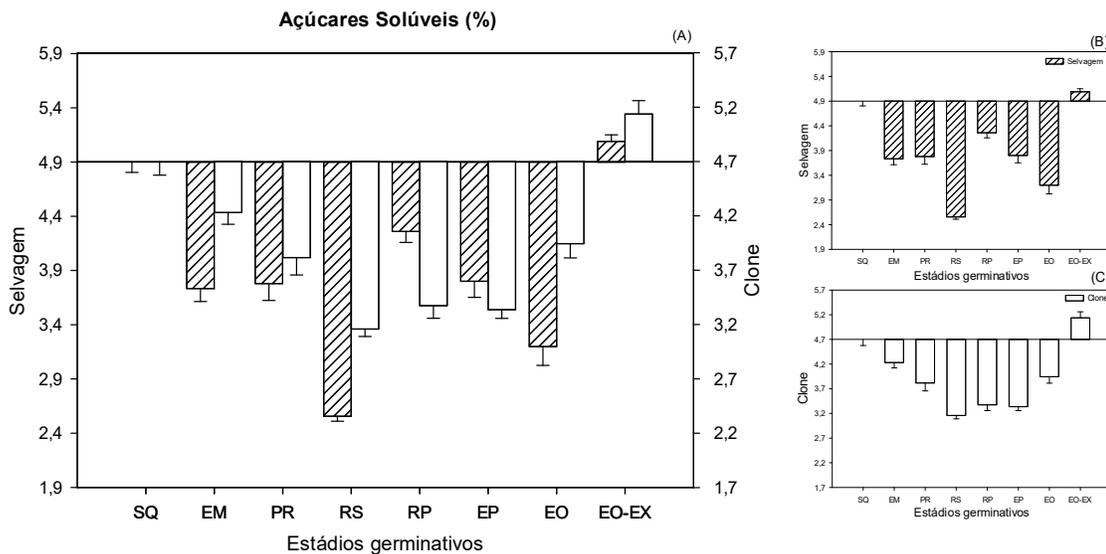


Figura 6. Alterações nos teores dos açúcares solúveis em sementes de *Hevea brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. **(B)** teor de açúcares solúveis em semente selvagem. **(C)** teor de açúcares solúveis em semente de clone. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (EM), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX). *Erro padrão= 0,11.

Resultado divergente foi encontrado com a espécie *Euphorbia heterophylla* pertencente à mesma família, observou que os açúcares solúveis permaneceram constantes até 72 horas de embebição, diminuindo posteriormente (Suda e Giorgini, 2000). Sementes de *Jatropha curcas* L. também apresentaram acúmulo de açúcares solúveis entre a fase de embebição e emissão de raiz (Lopes *et al.*, (2013).

As sementes de *H. brasiliensis* selvagem e do clone apresentaram baixos teores de açúcares solúveis na ordem de 5 e 4,5%. Estudos similares também observaram poucas reservas de açúcares solúveis no endosperma de sementes da mesma família, sugerindo intensa mobilização dessa reserva e depois síntese elevada

para recuperar os valores originais (Suda e Giorgini, 2000; Martins *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2013; Leitão *et al.*, 2015).

3.4 Amido

Os teores de amido nas sementes quiescentes selvagens e de clone foram cerca de 10%, respectivamente (Figura 6). No que se refere ao acúmulo e uso dessas reservas durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas foi possível verificar neste estudo que as sementes selvagens e do clone apresentaram baixos teores de amido assim com também de açúcares solúveis. Nas fases EM e PR ocorreu intenso acúmulo de reservas de amido para ambas as sementes. O aumento dessa reserva caracteriza intensa síntese para geração de energia para o início do crescimento inicial das plântulas. Na fase RS observou-se decréscimo para sementes selvagens e para o clone manteve-se estável, já na fase RP, para sementes selvagens observou-se decréscimo e, para o clone continuou estável. Na fase EP observou-se acúmulo para sementes selvagens e decréscimo para o clone. Na fase EO observou maior decréscimo das reservas de amido para sementes selvagens e do clone. Na última fase EO-EX observou-se para ambas as sementes a total degradação das reservas de amido, caracterizando mobilização intensa dessas reservas na formação das plântulas culminando assim o aumento dos teores de açúcares solúveis na última fase de crescimento e o desenvolvimento inicial das plântulas.

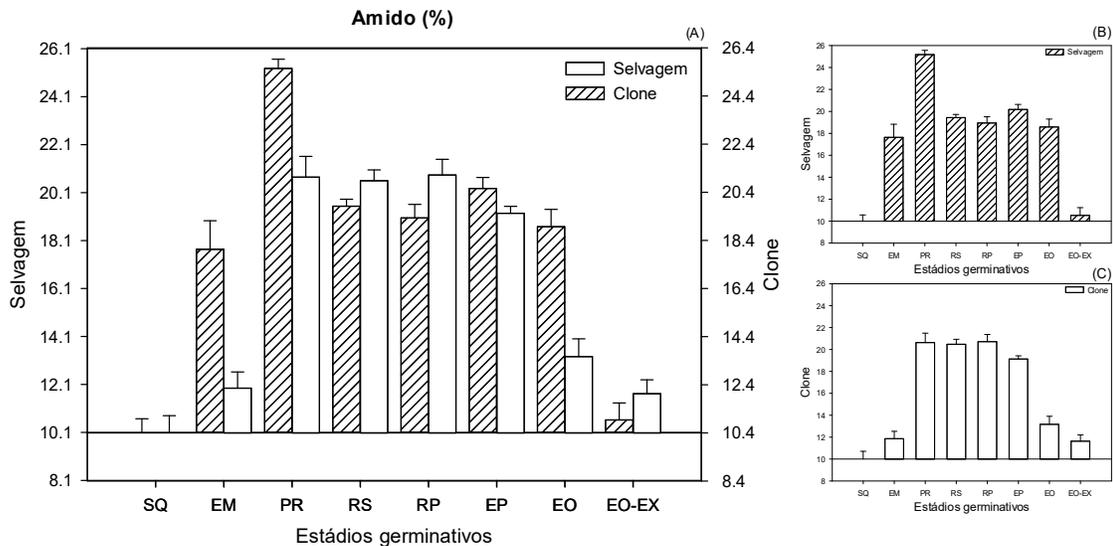


Figura 7. Alterações nos teores de amido em sementes de *Hevea brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. **(B)** teor de açúcares solúveis em semente selvagem. **(C)** teor de açúcares solúveis em semente de clone.

Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (EM), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX). *Erro padrão= 0,67.

Estudos com sementes da espécie *Euphorbia heterophylla*, não foram detectados amido em sua reserva e estudos com sementes de *Jatropha curcas* observaram pouca utilização de amido durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas, não sendo considerado como principal material de reserva (Suda e Giorgini, 2000; Teixeira e Machado, 2008). Estudos afirmam que o amido não pode ser considerado como uma fonte de energia para a espécie *Jatropha curcas*, pois durante o período de germinação dessa espécie a concentração de amido permaneceu estável, o que diverge dos resultados encontrados no presente estudo com *Hevea brasiliensis*, que apresentou mobilização das reservas de amido culminando com o aumento nos teores de açúcares solúveis, caracterizando as reservas de amido como uma das fontes de energia durante o crescimento inicial das plântulas tanto para sementes selvagens quanto do clone (Lopes *et al.*, 2013).

Em estudo com sementes da espécie *J. curcas* observou-se aumento transitório de amido nas sementes, o qual foi correlacionado com a intensa mobilização lipídica durante este período (Alencar *et al.*, 2015).

As reservas de amido apresentaram baixa porcentagem em sementes no presente estudo, cerca de 10% tanto para selvagem quanto para o clone. Adicionalmente, estudos também tem relatado baixa porcentagem de amido em sementes da mesma família (Suda e Giorgini, 2000; Souza *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2013; Alencar *et al.*, 2015).

3.5 Nutrientes minerais

Os teores de macronutrientes P, N, K, Ca e Mg em sementes selvagens e clone apresentaram estratégias diferentes de uso e acúmulo de reservas durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas (Figura 8A, B, C, D e E). Na fase EM ocorreu acúmulo das reservas de nutrientes P, N e K, para o Ca observou-se decréscimo e para o Mg permaneceu estável, caracterizando, nessa fase, acúmulo de reservas de macronutrientes, que pode estar associado à ativação do metabolismo e, assim a intensificação de síntese de reservas, já o decréscimo de Ca sugere o uso desse nutriente para demandas energéticas durante a ativação do metabolismo. Na

fase PR, para as sementes selvagens e de clone, observou-se decréscimo de K, Ca e Mg, para o P observou-se decréscimo em sementes selvagens e acúmulo para a do clone, caracterizando mobilização dessas reservas para o crescimento e desenvolvimento do embrião e, o N observou-se degradação para ambas sementes. Na fase RS observou-se para as reservas de P, manutenção dos teores para sementes selvagens e degradação para o clone, o N e, K observou-se acúmulo em sementes selvagens e decréscimo para do clone, para Ca manteve-se estável para sementes selvagens e, acúmulo para sementes de clone e para o Mg observou-se decréscimo para ambas sementes.

Na fase RP, os teores de P em sementes selvagens mantiveram-se estável e para o clone observou-se decréscimo. As reservas de N e Ca apresentaram decréscimo para ambas as sementes e K e Mg apresentaram acúmulo. Na fase EP a reserva de P manteve-se estável para sementes selvagens e observou-se acúmulo para o clone, já o Ca manteve-se estável para ambas as sementes, para o N observou-se acúmulo e os nutrientes, K e Mg observou-se intenso decréscimo tanto em sementes selvagens quanto de clone, caracterizando maior mobilização desses nutrientes para o início da formação das plântulas.

Na fase EO observou-se para o nutriente P observou-se decréscimo para sementes selvagens e manteve-se estável para sementes do clone, a reserva de N apresentou decréscimo para ambas as sementes. A reserva de K manteve-se estável para sementes selvagens e decresceu nas sementes de clone, o Mg apresentou decréscimo nas sementes selvagens e acúmulo nas sementes de clone, e para Ca observou-se acúmulo intenso dessa reserva para ambas sementes. Na última fase EO-EX observou-se para o P decréscimo para sementes selvagens e manteve-se estável nas do clone e, para N observou-se o inverso do P, mantendo-se estável nas sementes selvagens e acúmulo nas sementes de clone. As reservas K e Mg apresentaram decréscimo para sementes selvagens e acúmulo para sementes de clone e para o Ca, acúmulo em ambas sementes assim como na fase anterior EO, que pode estar associado a maior síntese desse nutriente para manutenção das plântulas.

Os teores de micronutrientes Fe, Zn e Mn em sementes selvagens e do clone apresentaram estratégias diferentes de uso e acúmulo de reservas durante a germinação e crescimento inicial das plântulas (Figura 8F, G e H).

Na fase EM observou-se decréscimo de Fe tanto para sementes selvagens quanto do clone, já para a reserva de Zn observou-se acúmulo para ambas as sementes. Para o Mn observou-se decréscimo nas sementes selvagens e acúmulo para sementes do clone, caracterizando nessa fase início da mobilização de Fe e síntese de Zn para ambas sementes e mobilização de Mn para sementes selvagens e síntese para o clone. Na fase PR observou-se decréscimo de Fe para sementes selvagens e acúmulo para de clone, para o Zn observou-se decréscimo para sementes selvagens e acúmulo para sementes do clone e, já para o Mn observou-se o inverso do Zn, acúmulo para sementes selvagens e decréscimo para o clone. Na fase RS, para as sementes selvagens e do clone, observou-se acúmulo de Fe, decréscimo de Zn e, o Mn houve decréscimo para selvagem e manteve-se estável para o clone. Na fase de RP observou-se o inverso da fase anterior para ambas às sementes, decréscimo de Fe e acúmulo de Zn e estabilidade para o teor de Mn.

Na fase EP observou-se acúmulo de Fe para ambas as sementes, ao passo que Mn e Zn sofreram decréscimo e acúmulo nas sementes selvagens e de clone, respectivamente. Na fase EO, para os nutrientes Fe e Zn observou-se decréscimo nas sementes selvagens e acúmulo nas sementes do clone e, o Mn apresentou acúmulo para ambas as sementes. Na última fase EO-EX os teores dos nutrientes Fe e Zn decresceram e, para o Mn, houve decréscimo para sementes selvagens e acúmulo para o clone.

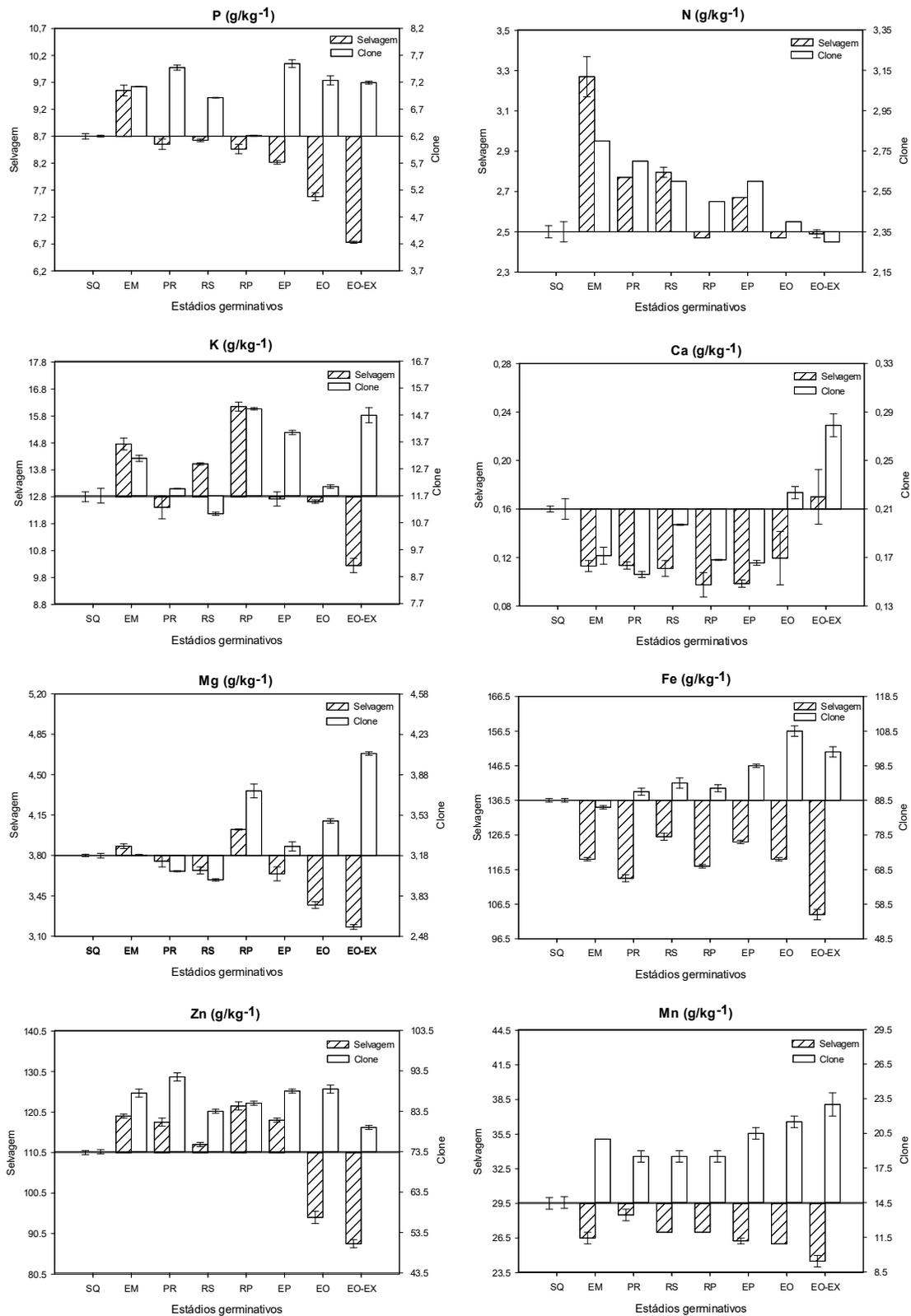


Figura 8. Alterações nos teores de macro e micronutrientes de *Hevea brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. **(A)** Fósforo. **(B)** Nitrogênio. **(C)** Potássio. **(D)** Cálcio. **(E)** Magnésio. **(F)** Ferro. **(G)** Zinco. **(H)**

Mangânês. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (SE), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX). *Erro padrão 0,06; 0,03; 0,19; 0,01; 0,03; 0,96; 0,81 e 0,47.

Resultados similares foram encontrados em sementes de *Hevea brasiliensis*, onde os autores encontraram valores para os macronutrientes, Ca de 2,4 e 850×10^{-3} mg/g e Mg de 9,29 mg/g (Oyekunle e Omode, 2008; Eka *et al.*, 2010). Assim, de acordo com a composição química das sementes de *H. brasiliensis*, as mesmas podem ser consideradas boas fontes de alimentos para animais e utilizadas para biocombustíveis e resíduos de plantações de borracha pode ser como subproduto.

Em sementes de *Jatropha curcas*, pertencente à mesma família da espécie em estudo, encontraram valores para os micronutrientes, na ordem de Fe 4,30 mg/g, Zn de 1,69 mg/g e Mn de 1,01 mg/g. Ao passo que estudos com sementes de *H. brasiliensis* encontraram Fe 1,7 e 10×10^{-3} mg/g, corroboram com os encontrados nesse estudo para sementes de *H. brasiliensis* selvagens e de clone, que apresentou maiores porcentagens de Fe, seguido de Zn e Mn (Oyekunle e Omode, 2008; Souza *et al.*, 2009; Eka *et al.*, 2010).

As plantas necessitam de macros e micronutrientes para o desenvolvimento e o crescimento inicial das plântulas. Assim, esses nutrientes minerais são armazenados nas sementes para suprir as demandas do crescimento e desenvolvimento do embrião até a plântula se tornar um organismo autotrófico e captar os nutrientes presentes nos substratos (Jacob-Neto e Rosetto, 1998).

3.6 Atividades enzimáticas durante a germinação

O metabolismo orgânico e também mineral, mediado por enzimas, em sementes durante o processo de germinação e crescimento inicial de plântulas passa por intensas e rápidas alterações mediante vários componentes associados ao processo. Assim, nas sementes, as principais reservas primárias, os lipídeos, os carboidratos e as proteínas podem ser mobilizados rapidamente através da hidrólise por enzimas chaves liberando componentes menores como glicerol, glicose e aminoácidos.

3.6.1 Lipase

A atividade da lipase durante a germinação de *Hevea brasiliensis* de sementes selvagens e clone foi intensa após a fase EM, já na fase PR observou-se acúmulo para sementes selvagens e decréscimo para clone, mantendo-se estável até a fase RS, seguida de diminuição na atividade até a fase EP, aumentando a atividade nas últimas fases da mobilização EO e EO-EX e para o clone após a fase RS observou-se intensa atividade até o final do crescimento inicial das plântulas (Figura 9A).

Estes dados consubstanciam com os resultados obtidos na avaliação da mobilização de lipídeos no endosperma (Figura 9B), onde evidenciou grande mobilização de lipídeos na fase EM e durante as fases de crescimento inicial das plântulas EP, EO e EO-EX.

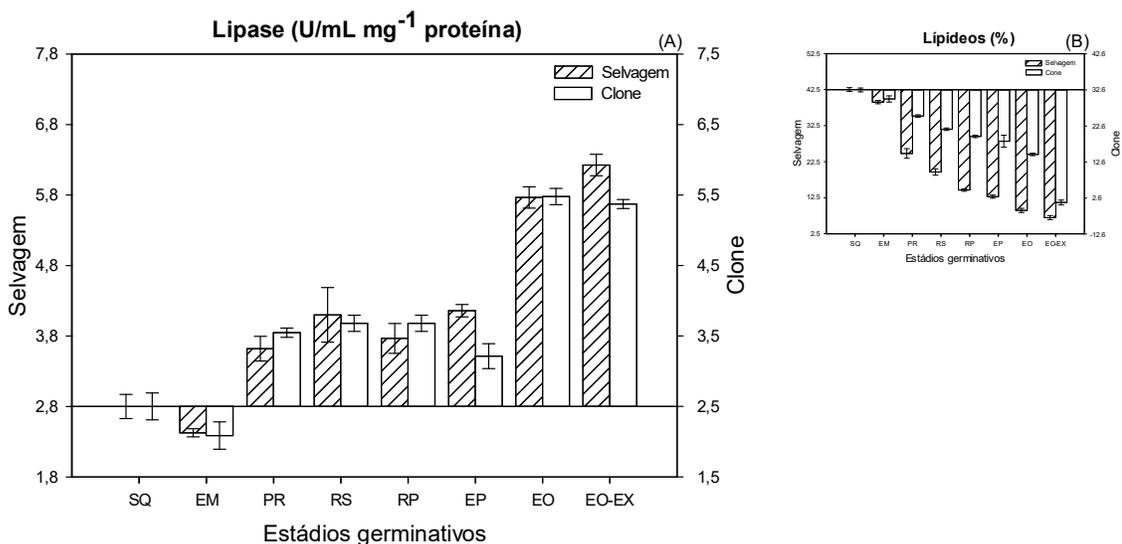


Figura 9. Alteração nos teores de atividade específica da lipase em sementes de *Hevea brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (EM), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX). *Erro padrão= 0,08.

Nas plantas, as lipases desempenham papel relevante na mobilização de reservas de lipídeos (armazenadas como triacilgliceróis) durante a germinação de oleaginosas. Essas enzimas são ubíquas pertencentes à classe de hidrolases séricas (triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3). Elas catalisam principalmente a hidrólise de ligações éster em mono, di e triacilgliceróis formando ácidos graxos livres e glicerol na interface óleo/água (Beisson *et al.*, 2000; Graham, 2008; Vijayakumar *et al.*, 2012).

3.6.2 Atividade proteolítica total

A atividade proteolítica total durante a germinação de *Hevea brasiliensis* de sementes selvagens e clone foi intensa na fase EM, já na fase PR observou-se um decréscimo para ambas as sementes, seguida de uma intensa atividade na fase RS, voltando a cair na fase RP. Observou-se uma intensa atividade nas fases RP, EP, EO e EO-EX para sementes selvagens e clone (Figura 10A).

Estes dados consubstanciam os resultados obtidos na avaliação da mobilização de proteínas totais e solúveis no endosperma (Figura 10B e C), onde evidenciou grande mobilização de proteínas na fase RS e nas fases EP, EO e EO-EX, caracterizando maior mobilização dessa reserva no início do desenvolvimento das plântulas.

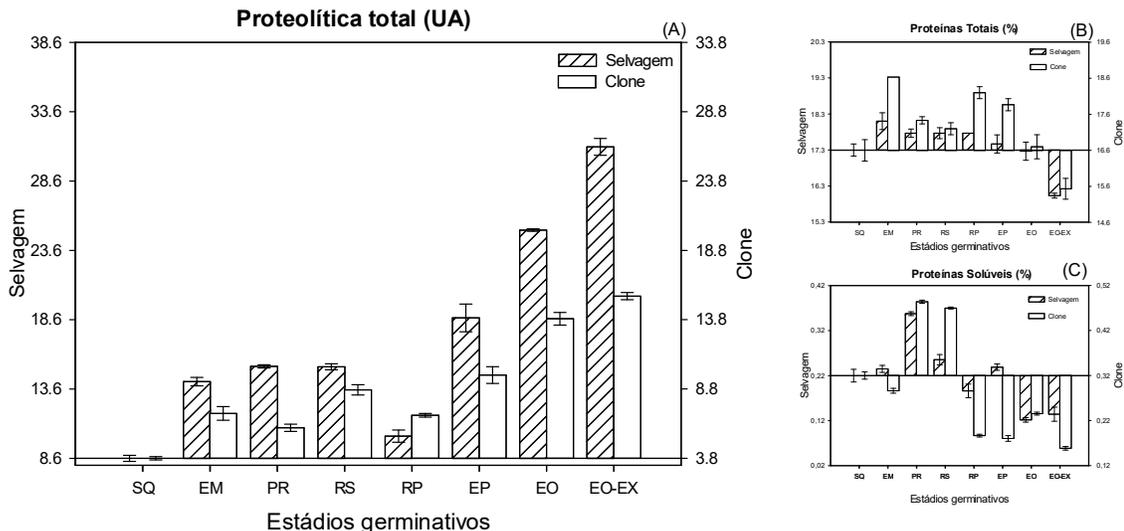


Figura 10. Alteração nos teores de atividade proteolítica total em sementes de *Hevea brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (EM), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX). *Erro padrão= 0,42.

As proteases são enzimas proteolíticas que exercem funções tanto metabólicas quanto regulatórias, são enzimas chaves do início de degradação dos corpos proteicos, mediante a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas (Bewley *et al.*, 2013). Assim, as proteínas de reservas são hidrolisadas em períodos específicos da germinação, as mesmas são hidrolisadas a aminoácidos livres para síntese de novas proteínas (Zakharov *et al.*, 2004). Adicionalmente, a mobilização de proteínas de

armazenamento provém principalmente do endosperma durante a germinação e crescimento inicial das plântulas fornecendo reservas para o desenvolvimento e crescimento do embrião (Han *et al.*, 2017).

3.6.3 Alfa-amilase

A atividade da alfa-amilase durante a germinação de *Hevea brasiliensis* de sementes selvagens manteve-se estável e o clone diminuiu (Figura 11A), correlacionando com o intenso acúmulo de amido no início das fases da germinação (Figura 11B), que pode estar associada a pouca mobilização de amido no início da germinação das sementes.

A enzima alfa-amilase apresentou intensa atividade na fase PR para ambas as sementes, seguido de um declínio na fase RS, mantendo-se estável nas fases RP e EP e intensa atividade nas fases EO e EO-EX, correlacionando também com a hidrólise de amido nessas fases, sugerindo maior mobilização dessas reservas no início do desenvolvimento das plântulas. Assim, as amilases têm ação catalítica que promovem a hidrólise das reservas de amido durante a germinação e crescimento inicial de plântulas para produção de açúcares como glicose e maltose para geração de energia durante o processo germinativo.

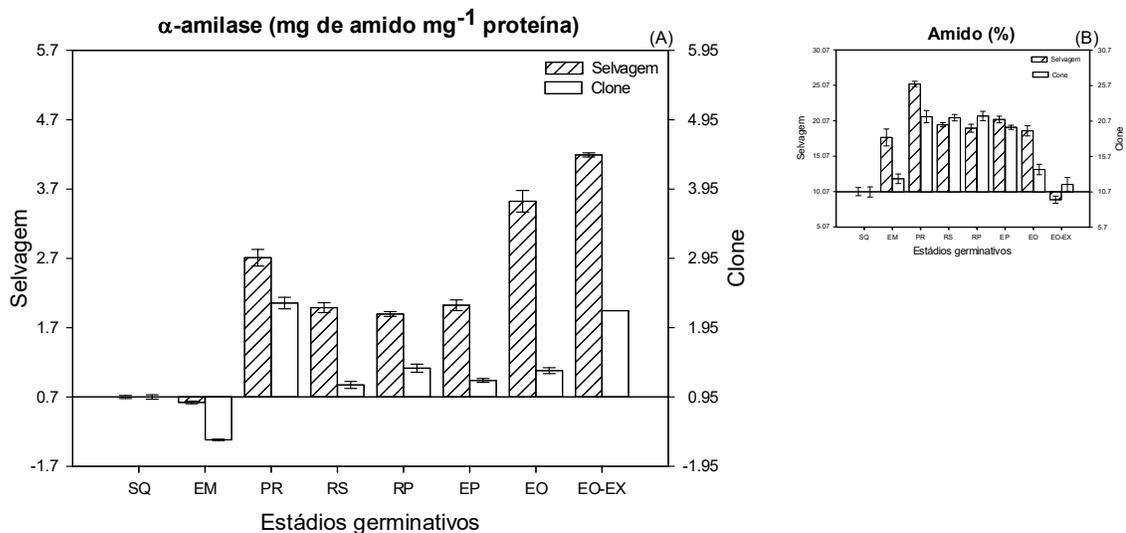


Figura 11. Alteração nos teores de atividade enzimática específica α -amilase em sementes de *Hevea brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (EM), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS),

alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eófilos (EO) e expansão dos eófilos (EO-EX). *Erro padrão= 0,06.

Corroborando com estudos que correlacionam o aumento da atividade da enzima alfa-amilase com o aumento do tempo de germinação e o valor máximo é atingido no sexto dia de germinação e começa a redução no sétimo dia de germinação (Aniche, 1989). Estudo com sementes *Hordeum Vulgar* L., verificaram atividade máxima e mínima da enzima alfa-amilase a partir de 3 dias e 7 dias de germinação, respectivamente (Farzaneh *et al.*, 2017). Estudo também tem relatado que os períodos de germinação são eficazes no aumento da quantidade de enzima alfa-amilase. Assim, a enzima altamente ativa é geralmente necessária para a conversão de amido em oligossacáridos para torna-se disponível para mobilização (Eneje *et al.*, 2004).

3.6.4 Fosfatase ácida

A atividade da fosfatase ácida durante a germinação de *Hevea brasiliensis* de sementes selvagens observou-se decréscimo na fase EM, seguido de pequeno acúmulo e manteve-se estável até a fase RP, na fase de EP ocorreu decréscimo da atividade, seguido de aumento nas fases seguintes, EO e EO-EX, já para sementes de clone, ocorreu aumento na atividade até a fase PR, seguido de decréscimo nas fases seguintes, RS, RP e EP, voltando a aumentar nas fases EO e EO-EX (Figura 12A).

Estes dados consubstanciam com os resultados obtidos na avaliação de mobilização de fósforo no endosperma (Figura 12B), onde evidenciou grande mobilização de fósforo para sementes selvagens durante a germinação e desenvolvimento das plântulas e para o clone, no início da germinação na fase RS e nas fases EP, EO e EO-EX, caracterizando maior mobilização dessa reserva no início do desenvolvimento das plântulas.

Fosfatases ácidas são importantes na germinação de sementes, mobilizando fosfato inorgânico para os embriões a partir dos tecidos de reserva (Granjeiro, 2008). Assim, a enzima fosfatase atua no metabolismo de carboidratos e fosfatos, participa da mobilização das proteínas de reserva, principalmente durante a germinação e crescimento da plântula, estando presente nos corpos de proteínas durante o

desenvolvimento da semente e sendo ativada durante a germinação e crescimento inicial das plântulas (Demason *et al.*, 1989).

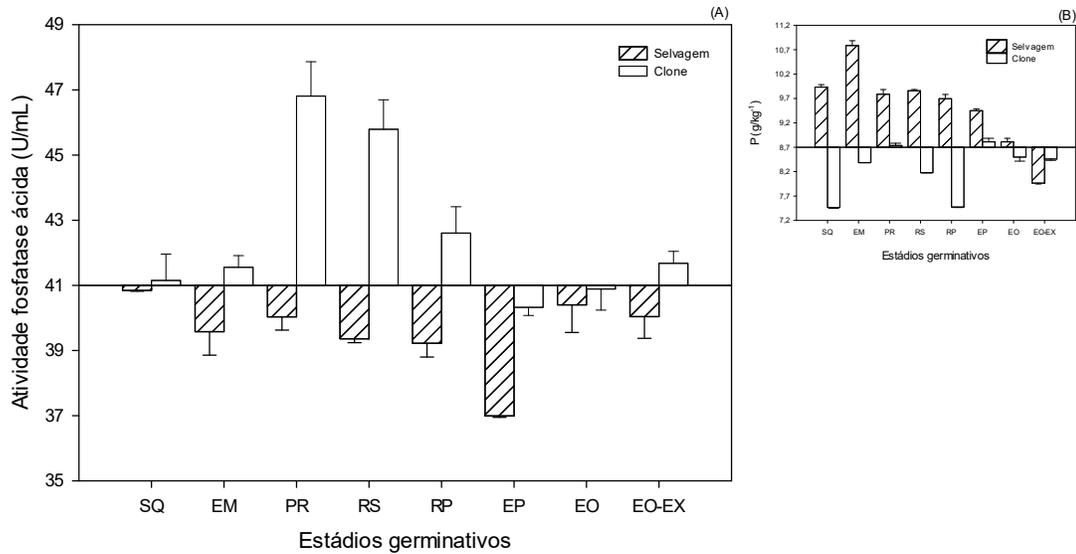


Figura 12. Alteração nos teores de atividade enzimática da fosfatase ácida em sementes de *Hevea brasiliensis* selvagem (●) e clone (○) em diferentes estádios de germinação. Sementes quiescentes (SQ), sementes com 24 horas de embebição (EM), emissão da parte radicular (PR), alongamento da raiz secundária (RS), alongamento da raiz primária (RP), emissão do epicótilo (EP), emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EO-EX). *Erro padrão= 0,61.

Após análise de componentes principais (PCA), observou-se uma tendência de formação de grupos entre os genótipos de sementes selvagens e do clone de *H. brasiliensis* para as variáveis estudadas, metabólitos (lipídeos, carboidratos, proteínas e nutrientes) e enzimas (lipase, proteases, α -amilase e fosfatase ácida) (Figura 13).

Verificou-se que para as sementes selvagens proporcionou maior explicação na formação dos grupos para as variáveis lipase, ferro, manganês, zinco, magnésio, fósforo, potássio, proteínas totais foram superiores e para as sementes do clone as variáveis proteínas solúveis e cálcio. Neste trabalho, identificou-se a dimensionalidade dos resultados obtidos, que os dois primeiros eixos PC1 (32%) e PC2 (19%) têm poder de explicação de 51% da variação no que se refere às diferenças encontradas entre os genótipos das sementes.

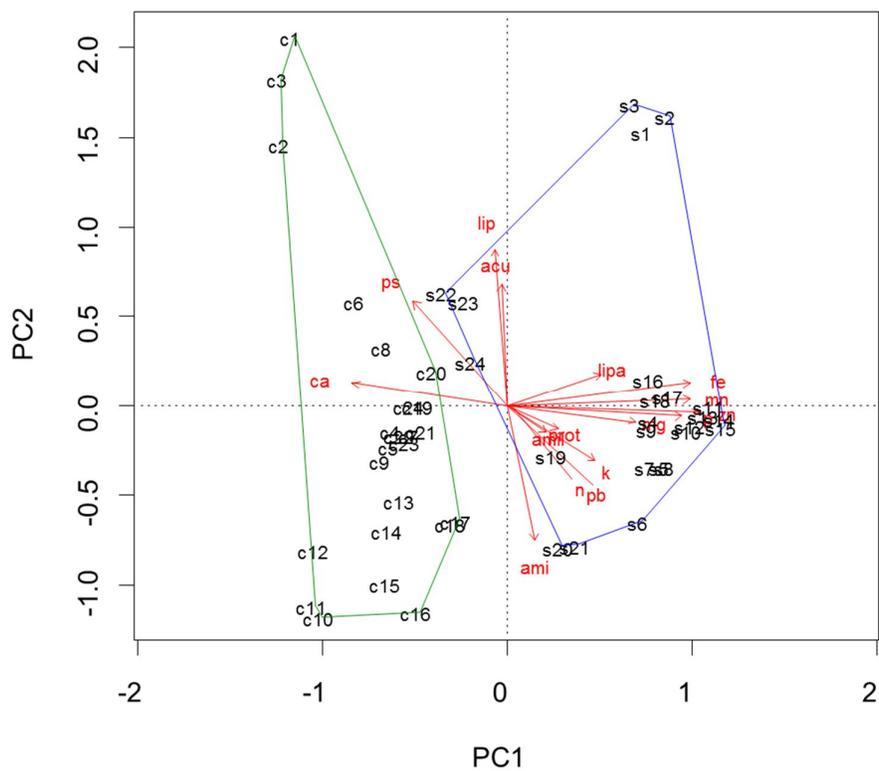


Figura 13. Análise de componentes principais (PCA) considerando as variáveis: metabólitos primários (lipídeos, carboidratos, proteínas e nutrientes) e enzimas (lipase, proteases, α -amilase e fosfatase ácida). Polígono verde: clone; Polígono azul: selvagem.

4. CONCLUSÃO

- Os lipídeos, correspondem às reservas majoritárias estocadas no endosperma de sementes da espécie *Hevea brasiliensis* selvagens e clone, as proteínas e os carboidratos constituem a segunda reserva mais expressiva.
- As sementes selvagens e do clone apresentaram mobilização de lipídeos e proteínas durante a germinação e crescimento inicial de plântulas, quanto aos açúcares solúveis para sementes selvagens foram mobilizados principalmente no início da germinação, e o clone no início do crescimento inicial das plântulas. As reservas de amido para ambas as procedências se observou mobilização no início do crescimento inicial das plântulas.
- Sementes de *H. brasiliensis* exibiram bandas proteicas nas faixas de 7 a 30 kDa que podem esta associadas as principais proteínas da rota de síntese do látex.
- As reservas de nutrientes minerais foram mobilizadas durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.
- As sementes selvagens apresentaram alta atividade da lipase durante a germinação e crescimento inicial das plântulas e o clone durante o crescimento inicial das plântulas. As atividades de proteases tanto para sementes selvagens quanto do clone apresentaram alta atividade no início do crescimento inicial das plântulas, quanto à atividade da α -amilase ambas as sementes apresentaram maiores atividades durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas e a enzima fosfatase ácida para sementes selvagens apresentaram atividade no início do crescimento inicial das plântulas e as do clone no início da germinação e crescimento inicial das plântulas.

Nossos resultados demonstraram mudanças fisiológicas distintas durante a germinação e crescimento inicial das plântulas, tanto para as sementes selvagens quanto de clone.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah, B.M., e Salimon, J. 2009. Physicochemical characteristics of Malaysian rubber (*Hevea Brasiliensis*) seed oil. *European Journal of Scientific Research*, 31(3), 437-445.
- Ahmad, J.; Yusup, S.; Bokhari, A.; Kamil, R.N.M. 2014. Study of fuel properties of rubber seed oil based biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 78: 266–275.
- Alencar, N.L.M.; Gadelha, C.G.; Gallão, M.I.; Dolder, M.A.H.; Prisco, J.T.; Gomes-Filho, E. 2015. Ultrastructural and biochemical changes induced by salt stress in *Jatropha curcas* seeds during germination and seedling development. *Functional Plant Biology* 42 (9) 865-874.
- Aniche, G.N. 1989. Studies on the effect of germination on the malting quality of a two maize varieties, *Process Biochem.* 24(5): 183–186.
- Beisson, F.; Tiss, A.; Rivière, C.; Verger, R. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102: 133–153.
- Berthelot, K.; Lecomte, S.; Estevez, Y.; Peruch, F.E. 2014. *Hevea brasiliensis* REF (Hev b 1) and SRPP (Hev b 3): An overview on rubber particle proteins. *Biochimie*, 106: 1-9.
- Bewley, J.D.; Black, M. 1994. Seeds: Physiology of development and germination. *Plenum Press*. New York, U.S.A., pp. 1-31.
- Bewley, J.D. 2001. Seed Germination and Reserve Mobilization. *Encyclopedia of Life Sciences / Nature Publishing Group / www.els.net*.
- Bewley, J.D.; Bradford, K.J.; Hilhorst, H.W.M.; Nonogaki, H. 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. Springer New York Heidelberg Dordrecht London, Lexington, KY, USA. 392p.
- Bezerra, I.W.L.; Teixeira, F.M.; Oliveira, A.S.; Araújo, C.L.; Leite, E.L.; Queiroz, K.C. S.; Sales, M. P. 2004. α -amilase inhibitors from *Ficus* sp. seeds and their activities towards Coleopteran sect pests. *Protein and Peptide Letters*, 11(2):181-187.
- Black, M.; Corbineau, F.; Grzesik, M.; Guy, P.; Côme, D. 1996. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *Journal Experiment of Botanic*, 47(295): 161-169.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1): 248-254.
- Buckeridge, M.S.; Santos, H.P e Tiné, M.A.S. 2000. Mobilization of storage cell wall polysaccharides in seed. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38:141-156.
- Buckeridge, M.S.; Santos, H.P.; Tiné, M.A.S.; Aidar, M.P. 2004. *Mobilização de reservas*. In: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 324p.
- Bremner, J.M. 1969. Nitrogen-total. In: SPARKS, D. (Org.). *Methods of Soil Analysis, Part 3 - Chemical Methods*. ed. Madison: Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, p. 1085-1121.
- Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. 1988. Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção. 3 ed. Campinas: Fundação Cargill, 424p.
- Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: FUNEP, 429p.
- Celus, I.; Brijs, K.; Delcour, J.A. 2006. The effects of malting and mashing on barleyprotein extractability, *J. Cereal Sci.* 44(2): 203–211.
- Chaiya, C e Reubroycharoen, P. 2013. Production of Bio Oil from Para rubber seed using Pyrolysis Process. *Energy Procedia*, 34: 905 – 911.
- Chanjula, P.; Siriwathananukul, Y.; Lawpetchara, A. 2011. Effect of Feeding Rubber Seed Kernel and Palm Kernel Cake in Combination on Nutrient Utilization, Rumen Fermentation Characteristics, and Microbial Populations in Goats Fed on Briachiaria humidicola Hay-based Diets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(1): 73-81.
- Dantas, B.F.; Soares, F.S de. J.; Lúcio, A.A.; Aragão, C.A.. 2008. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). *Revista Brasileira de Sementes*, 30(2): 214-219.
- Delgado, C.M.L.; Coelho de, C.M.; Buba, G.P. 2015. Mobilization of reserves and vigor of soybean seeds under desiccation with glufosinate ammonium. *Journal of Seed Science*, 37(2): 154-161.
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. e Smith, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-355.

- Eka, H.D., Tajul Aris, Y. and Wan Nadiah, W.A. 2010. Potential use of Malaysian rubber (*Hevea brasiliensis*) seed as food, feed and biofuel. *International Food Research Journal* 17: 527-534.
- Eneje, L.O.; Ogu, E.O.; Aloh, C.U.; Odibo, F.J.C.; Agu, R.C.; Palmer, G.H. 2004. Effect of steeping and germination time on malting performance of Nigerian white and yellow maize varieties, *Process Biochem.* 39(8):1013–1016.
- Ezeagu, I.E.; Petzke, J.K.; Metges, C. C.; Akinsoyinu, A. O.; Ologhobo, A. D. 2002. Seed Protein Contents and Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Some Uncultivated Tropical Plant Seeds. *Food Chemistry*, 78(1): 105-109.
- Farzaneh, V.; Ghodsvali, A.; Bakhshabadi, H.; Zared, Z.; Carvalho, I.S. 2017. The impact of germination time on the some selected parameters through malting process. *International Journal of Biological Macromolecules.* 94: 663–668.
- Fu, Q, Wang, B. C, Jin, X.; Li, H.; Han, P.; Wuei, K. H.; Zhang, X. M.; Zhu, Y. X. 2005. Proteomic analysis and extensive protein identification from dry, germinating *Arabidopsis* seeds and young seedlings. *J. Biochem Mol Biol*, 38: 650-660.
- Gimbun, J., Ali, S., Kanwal, C.C.S.C., Shah, L.A., Hidayah, N., Cheng, C.K., Nurdin, S., 2012. Biodiesel production from rubber seed oil using activated cement clinker as catalyst. *Procedia Eng.* 53: 13-19.
- Gomez, J. B. 1982. Anatomy of *Hevea* and its influence on latex production. Malays Rubber Research and Development Board.
- Granjeiro, P. A.; Veríssima, C. F.; Aoyama, H. 2008. Uso de fosfatase ácida como biomarcador durante a germinação de sementes de mamona (*Ricinus communis*). *Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia*, 5(3).
- Graham, I.A. 2008. Seed storage Oil Mobilization. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 115-142.
- Han, C.; Zhen, S.; Zhu, G.; Bian, Y.; Yan, Y. 2017. Comparative metabolome analysis of wheat embryo and endosperm reveals the dynamic changes of metabolites during seed germination, *Plant Physiology and Biochemistry*. S0981-9428 (17) 30132-8.
- Hossain M.E., Karim M.H., Alam S. e Nath S. K. 2015. Valor nutricional de sementes de borracha (*Hevea Brasiliensis*). *J. Anim. Feed Res.*, 5(1): 18-21.
- Jacob-Neto, J.; Rosetto, C. A. V. 1998. Concentração de nutrientes nas sementes: o papel do molibdênio. 5(1): 171-183.
- Jibrail, K., Keat, T.L. and Subhash, B. 2008. *Cerbera odollam* (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. *Fuel*, 88: 1148-1150.

- Kummar, S.; Kikon, K.; Upadhyay, A.; Kanwar, S.S.; Gupta, R. 2005. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expr Purif.* 41(1): 38-44.
- Lalonde, L.; Fountain, D.W.; Kermode, A.; Ouellette, F.B.; Scott, K.; Bewley, J.D.; Gifford, D.J. 1984. A comparative study of the insoluble storage proteins and the lectins of seeds of the Euphorbiaceae. *Canadian Journal of Botany.* 62: 1671-1677.
- Leitão, L.R.G.; Costa, G.V da.; Bertini, C.H.C de. M.; Gallão, M.I. 2015. Caracterização química de sementes de genótipos de pinhão manso de diferentes origens. *Enciclopédia biosfera*, 11(22).
- Linkies A, Graeber K, Knight, C. 2010. The evolution of seeds. *New Phytol*, 186: 817-831.
- Lopes, L de. S.; Gallão, M.I.; Bertini, C.H.C de. M. 2013. Mobilisation of reserves during germination of *Jatropha* seeds. *Revista Ciência Agronômica*, 44(2): 371-378.
- Lourith, N.; Kanlayavattanakul, M.; Sucontphunt, A.; Ondee, T. 2014. Rubber seed oil: new promising unconventional oil for cosmetics. *J. Oleo Sci.* 63 (7): 709-16.
- Maia, F.C.; Moraes, D.M de.; Moraes, R de. C.P. 2000. Atividade total da fosfatase ácida e da α -amilase induzidas por ácido jasmônico em sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, 22(1): 259-263.
- Martins, M.T.C.S.; Porto, N.A.; Canuto, M.F.S.; Bruno, R.L.A. 2007. Composição Química de Sementes de Espécies de *Manihot Mill.* (Euphorbiaceae). Nota científica. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(1): 621-623.
- Mesquita, A.C.; Oliveira, L.E.M de. 2010. Características anatômicas da casca e produção de látex em plantas de seringueira não enxertadas. *Acta Amazônica.* 40(2): 241-246.
- Miyazawa, M.; Pavan, M.A; Muraoka, T.; Carmo, C.A.F. de S. do; Mello, W.J. de. 1999. Análises químicas de tecido vegetal. In: Silva, F.C. da. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Rio de Janeiro: Embrapa Solos / Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, p.171-223.
- Morshed, M., Ferdous, K., Khan, M.R., Mazumder, M.S.I., Islam, M.A. and Uddin Md.T. 2011. Rubber Seed Oil As a Potential Source for Biodiesel Production in Bangladesh, *Fuel*, 90, 2981.

- Mohd-Setapar, S.H., Nian-Yian, L., Kamarudin, W.N.W., Idham, Z. and Norfahana, A.T. 2013. Omega-3 emulsion of Rubber (*Hevea brasiliensis*) seed oil. *Agricultural Sciences*, 4: 84-89.
- Mohd-Setapar S.H., Nian-Yian L. and Mohd-Sharif N.S. 2014. Extraction of Rubber (*Hevea brasiliensis*) Seed Oil Using Soxhlet Method, Proceeding Regional *Annual Fundamental Science Symposium*.
- Murphy, J. e Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27: 31-36.
- Nonogaki, H.; Bassel, G.W.; Bewley, J.D. 2010. Germination-still a mystery. *Plant Science*, 179(6): 574-581.
- Onoji, S.E.; Iyuke, S.E.; Igbafe, A.I. 2016. *Hevea brasiliensis* (Rubber Seed) Oil: Extraction, Characterization, and Kinetics of Thermo-oxidative Degradation Using Classical Chemical Methods. *Energy Fuels*, 30(12): 10555–10567.
- Oyekunle, J.A.O and Omode, A.A. 2008. Chemical composition and fatty acid profile of the lipid fractions of selected Nigerian indigenous oilseeds. *International Journal of Food Properties*, 11: 273-281.
- Pujar, A.; Jaiswal, P.; Kellog, E.A.; Ilic, K. Vincent'.; L, Avraham, S.; Stevens, P.; Zapata, F.; Reiser.; L, Rhee, S.Y.; Sachs, M.M.; Schaeffer, M.; Stein, L.; Ware, D.; McCouch, S. 2006. Whole-plant growth stage ontology for angiosperms and application in plant biology. *Plan Physiol*. 142: 414-428.
- Reshad, A.S.; Tiwari, P.; Goud, V.V. 2015. Extraction of oil from rubber seeds for biodiesel application: Optimization of parameters. *Fuel*. 150(15): 636-644.
- Rochast, W.; Siritanon, T.; Yoosuk, B. 2017. Rubber seed oil as potential non-edible feedstock for biodiesel production using heterogeneous catalyst in Thailand. *Renewable Energy* 101: 937-944.
- Sano, N., Permana, H., Kumada, R., Shinozaki, Y., Tanabata, T., Yamada, T., Hirasawa, T., Kanekatsu, M., 2012. Proteomic analysis of embryonic proteins synthesized from long-lived mRNAs during germination of rice seeds. *Plant Cell Physiol*. 53: 687-698.
- Silva, D. J. 1990. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 165p.
- Soltani, A, Gholipor, M.; Zeinali, E. 2006. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. *Environ Exp Bot*, 55: 195-200.

- Suda, C.N.K. e Giorgini, J.F. 2000. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12(3): 226-245.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2013. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed. p.449-484.
- Tan-Wilson, A. L.; Wilson, K. A. 2012. Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum* 145:140–153.
- Teixeira, S. P.; Machado, S. R. 2008. Storage sites in seeds of *Caesalpinia echinata* and *C. ferrea* (leguminosae) with considerations on nutrients flow. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(1): 127-136.
- Teulat-Merah, B.; Morere-Le Paven, M.C.; Ricoult, C.; Aubry, C.; Peltier, D. 2011. cDNA-AFLP profiling in the embryo axes during common bean germination. *Biologia Plantarum*, 55(3): 437-447.
- Weitbrecht, K.; Müller, K.; Leubner-Metzger, G. 2011. First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62(10): 3289-3309.
- Widyarani., Ratnaningsihc, E., Sanders, J.P.M.; Bruinsa, M.E. 2014. Biorefinery methods for separation of protein and oil fractions from rubber seed kernel. *Industrial Crops and Products*, 62: 323–332.
- Xavier-Filho, J.; Campos, F.; Maria, A.P.; Ary, B.; Silva, C.P.; Carvalho, M.M.M. 1989. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37: 1139-1143.
- Yang, M.F.; Liu, Y.J.; Liu, Y.; Chen, H.; Chen, F.; Shen, S.H. 2009. Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and post germination development of *Jathropa curcas*. *Journal of proteome research*, 8: 1441-1451.
- Yu, Y., Guo, G., Lv, D., Hu, Y., Li, J., Li, X., Yan, Y., 2014. Transcriptome analysis 558 during seed germination of elite Chinese bread wheat cultivar Jimai 20. *BMC 559 Plant Biol.* 14: 20.
- Zakharov, A.; Carchilam, M.; Stepurina, T.; Rotari, V.; Wilson, K.; Vaintraub, I. 2004. A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean *Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. *Journal of Experimental Botany*, 55(406): 2241-2249.

Zhou, H.; Yue, H.; Ai, X.; Chen, G.; Cun, M.; Xie, J.; Tian, Y. 2015. Poor seed dispersal, seed germination and seedling survival explain why rubber trees (*Hevea brasiliensis*) do not expand into natural forests in Xishuangbanna, southwest China. *Forest Ecology and Management*, 358: 240–247.

CAPÍTULO III

Efeito de diferentes reguladores de crescimento na germinação e no estabelecimento de plântulas *in vitro* a partir de embriões zigóticos de *Hevea brasiliensis*

EFEITO DE DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO NA GERMINAÇÃO E NO ESTABELECIMENTO DE PLÂNTULAS *IN VITRO* A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *HEVEA BRASILIENSIS*

RESUMO – O presente estudo teve como objetivo determinar o efeito de diferentes dosagens dos reguladores de crescimento ácido-indol-3-acético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP) e suas interações, visando analisar o perfil proteico das plântulas nas diferentes dosagens de reguladores de crescimento. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal – LFBV/INPA. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, obedecendo esquema fatorial 4x2 (3 dosagens de reguladores de crescimento e meio MS x 2 genótipos) com 4 repetições por tratamento. Os eixos embrionários foram excisados das sementes e inoculados individualmente em cada tubo de ensaio contendo 20 mL do meio de cultura acrescidos de reguladores de crescimento em meio MS (Murashige & Skoog), AIA (0,5 mg/L), BAP (1,0 mg/L) e interação de auxina e citocinina nas respectivas proporções: (0,5 de AIA+ 1,0 BAP). O experimento foi conduzido durante 30 dias sob condições controladas de cultivo, com fotoperíodo de 16 horas/luz, intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura variando de 30° C (dia) a 20° C (noite). As variáveis analisadas foram: a porcentagem de germinação dos embriões zigóticos, emissão de hipocótilo, raiz secundária, primária, epicótilo, eofilos, número de folhas. As proteínas solúveis foram extraídas por método de extração salina em NaCl 0,15 M (10% p/v) e as análises dos perfis proteicos foram realizadas por SDS-PAGE. As estruturas morfológicas das plântulas *in vitro* para sementes selvagens e clone foram similares. O cultivo de embriões zigóticos apresentou alta porcentagem de germinação para sementes selvagens e do clone. Maior media de comprimento de parte aérea foi em meio de cultivo BAP e radicular, o AIA para ambas procedências. As maiores concentrações de proteínas na parte aérea e radicular foram observadas nos meios de cultivo AIA e MS. Os tecidos de plântulas de *H. brasiliensis* (parte aérea e radicular) exibiram bandas proteicas nas faixas de 7 a 30 kDa, que podem estar associadas às principais proteínas da rota de síntese do látex.

Palavras-chave: seringueira, propagação convencional, micropropagação e perfil proteico.

EFFECT OF DIFFERENT GROWTH REGULATORS IN GERMINATION AND ESTABLISHMENT OF SEEDLINGS IN VITRO OF ZYGOTIC EMBRYOS OF *HEVEA BRASILIENSIS*

ABSTRACT– The aim of the present study was to determine the effect of different dosages of indole-3-acetic acid (AIA) and 6-benzylaminopurine (BAP) growth regulators and their interactions, in order to analyze the protein profile of the seedlings in the different dosages of growth regulators. The experiment was conducted at the Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry - LFBV/INPA. The experimental design was completely randomized, obeying a factorial scheme 4x2 (dosages of growth regulators x seed sources) with 4 replicates to treatment. The embryonic axes were excised of the seeds and inoculated individually in each test tube containing 20 mL of culture medium MS (Murashige & Skoog) with growth regulators, AIA (0.5 mg/L), BAP (1, 0 mg/L) and auxin and cytokinin interaction in respective proportions: (0.5 AIA + 1.0 BAP). The experiment was conducted for 30 days under controlled growing conditions, with photoperiod of 16 hours/light, light intensity of 1000 lux and temperature ranging from 30 °C (day) to 20 °C (night). The analyzed variables were: the percentage of germination of the zygotic embryos, hypocotyl emission, secondary root, primary, epicotyl, eophils, number of leaves. Soluble proteins were extracted in 0.15 M NaCl (10% w / v) and the protein profile analyzes were performed by SDS-PAGE, both in reducing and non-reducing conditions. The morphological structures of *in vitro* seedlings for seeds and clones were similar. The cultivation of zygotic embryos showed high percentage of germination for wild seeds and clones. The highest mean length was in culture medium MS with growth regulator BAP and the highest root mean length in AIA for both provenances. The highest concentrations of proteins in shoot and root were observed under the effect of AIA and MS in the absence of growth regulators. The tissues of *H. brasiliensis*, shoot and root showed protein bands between 7 to 30 kDa, which may be associated to the main proteins of the latex synthetic route.

Keywords: rubber tree, conventional propagation, micropropagation and protein profile.

1. INTRODUÇÃO

A *Hevea brasiliensis*, pertencente à família Euphorbiaceae é uma das espécies mais importante economicamente do gênero *Hevea*, devido a sua madeira e maior produtividade e qualidade de látex, fonte primária de borracha natural no mundo (Ighere *et al.*, 2011). As seringueiras são tradicionalmente propagadas por enxertia a partir de clones selecionados provenientes de mudas ou de plantas de pomares de sementes. Este processo é feito a longo prazo, uma vez que são requeridos um a dois anos antes das plantas poderem ser transplantadas para o campo (Mendanha *et al.*, 1998).

Além da técnica de enxertia, a propagação da *Hevea brasiliensis* e de outros cultivos podem ocorrer de forma *in vitro*, técnica promissora para a produção em larga escala de plantas, pois gera novas plantas a partir de sementes, fragmentos de tecido vegetais ou embriões (Andrade, 2002). Por sua vez, a cultura de embriões zigóticos pode permitir a propagação de plantas num menor tempo e representa importante desdobramento da técnica para o avanço de determinadas espécies. A partir dela, existe a possibilidade de reproduzir e avaliar o desenvolvimento embrionário, a quebra da dormência e os passos da formação das plântulas (Pinheiro, 1986; Hu e Ferreira, 1998).

A eficiência da cultura de embriões *in vitro* depende principalmente de diferentes genótipos, podem apresentar diferentes respostas na fase do embrião, formulação de meios de cultivo: sais minerais, hidratos de carbono, reguladores de crescimento, vitaminas, etc. e condições de inoculação (temperatura, luz /Escuro) (Monnier, 1995; Razdan, 2003; Kothari *et al.*, 2010; Manzur *et al.*, 2013).

A cultura de tecidos vegetais emergiu como uma técnica com o potencial não só para clonagem e propagação em massa das espécies vegetais, que são necessárias em grande número nos programas de reflorestamentos, mas também para a conservação de espécies importantes e raras, assim como pode também auxiliar na identificação de marcadores bioquímicos como expressão de proteínas ou enzimas (Pawłowski e Staszak, 2016). Adicionalmente, também fornece abordagens para a produção das plantas, que são de alto rendimento e resistentes a agentes abióticos, a técnica tem sido amplamente utilizada em vários setores da horticultura e silvicultura, e contribuiu de maneira significativa para a produção melhorada de plantios de alto desempenho.

A melhoria genética da Hevea é muito lenta e demorada, como em muitas outras espécies florestais. As principais limitações são as bases genéticas muito estreitas, floração não sincronizada, baixa produção de frutos, longo período de formação dos frutos e ausência de parâmetros de seleção precoces totalmente confiáveis (Venkatachalam *et al.*, 2004). Além dessas limitações, a espécie apresenta sementes com características recalcitrantes, que perdem a viabilidade em curto período de tempo. Assim, o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos pode aumentar e assegurar a viabilidade da germinação e o desenvolvimento embrionário, bem como possibilitar o seu uso em trabalhos de criopreservação e a criação de bancos de germoplasmas (Fonseca e Freire, 2003).

A técnica de micropropagação permite a produção em massa de plantas de qualidade, livre de doenças e uniforme (Kumar e Rao, 2012). Uma das vantagens da micropropagação é a possibilidade do maior controle do crescimento dos explantes *in vitro* e não seriam possíveis, sem adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, compostos orgânicos dos quais em baixas concentrações, promovem, inibem, ou, ainda, modificam o crescimento vegetal quando cultivados em ambientes de cultivo *in vitro* (Hartmann *et al.*, 2002). Assim, as taxas de crescimento elevadas envolvidas na cultura de tecidos incluem a formulação do meio, hormônios de crescimento, enraizamento e genótipo (Santos *et al.*, 2003). Entre as substâncias reguladoras de crescimento de plantas mais conhecidas e de interesse na propagação de plantas, destacam-se as auxinas, as giberelinas, as citocininas, o etileno e o ácido abscísico. Adição de reguladores de crescimento ao meio de cultivo é utilizado para suprir possíveis deficiências endógenas e melhorar as características de cultivo *in vitro*. Mas, fundamentalmente efetivos eventos celulares em cascatas que culminam com a formação completa das plantas.

As principais aplicações das auxinas na propagação de plantas são a indução de raízes adventícias em estacas e o controle da morfogênese na micropropagação, sendo o ácido-indol-3-acético (AIA) a principal auxina presente nos vegetais e varias outras substâncias com funções regulatórias de crescimento semelhantes e com aplicação na propagação de plantas são produzidos sinteticamente: ácido indol-3-butírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) e outros (Xavier *et al.*, 2013). Por sua vez, as citocininas constituem um grupo de substâncias de crescimento de grande importância com efeitos sobre a divisão celular e morfogênese *in vitro*, devido à indução na formação de caule, expansão foliar e no

movimento dos compostos orgânicos e minerais, aumentando a força dos drenos (Taiz; Zeiger, 2013). Nestes casos as auxinas e giberelinas são as substâncias de crescimento mais necessárias para iniciar qualquer processo de crescimento vegetal.

As citocininas de maior interesse na propagação de plantas e de ocorrência natural são a zeatina (ZEA) e a isopenteniladenina (2iP) e as produzidas sinteticamente, 6-benzilaminopurina (BAP), a cinetina (KIN) e o thidiazuron (TDZ). Assim, o crescimento e o desenvolvimento das plantas são controlados por reguladores de crescimento como as auxinas, as citocininas, as giberelinas, o ácido abscísico, o etileno e outros compostos, a ação dos reguladores de crescimento pode ser mediada por peptídeos (Wang *et al.*, 2016). Assim, os reguladores de crescimento podem influenciar no metabolismo protéico e aumentar a síntese de proteínas no processo de germinação e crescimento inicial de plântulas.

Devido ao aumento da demanda por produtos de borracha, há necessidade de utilização de técnicas *in vitro* para propagação em larga escala de *H. brasiliensis*. Assim, a utilização da micropropagação utilizando como fonte de explantes embriões zigóticos pode garantir a viabilidade das sementes de *Hevea brasiliensis*. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer a cultura da *H. brasiliensis in vitro* e avaliar o efeito de diferentes dosagens dos reguladores de crescimento ácido-indol-3-acético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP) e suas interações, bem como verificar o perfil proteico das plântulas nas dosagens de reguladores de crescimento em meio MS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

2.1.1 Procedência do material biológico

Sementes selvagens provenientes de cinco matrizes de *Hevea brasiliensis*, as sementes foram coletadas em área localizada no Ramal Tatajuba km 17, município de Altamira-PA. As coletas foram realizadas no dia 22 e 23 de janeiro de 2016, localizado nas coordenadas geográficas S 03° 18' 05" e W 052° 17' 12". As sementes de clone provenientes de cinco matrizes de *Hevea brasiliensis* foram coletadas em um plantio de seringueira, localizado próximo a rodovia BR 163, município de Belterra-PA, mesorregião do Baixo Amazonas. As coletas foram realizadas no dia 27 e 28 de

janeiro de 2016, localizado nas coordenadas geográficas S 02° 38' 17" e W 054° 58' 34".

Após a coleta, os frutos foram acondicionados em sacos de polietileno e transportados para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV-INPA), local onde foi realizado o beneficiamento das sementes.

2.1.2 Condução do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal – LFBV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, localizado no Campus III-V8, Manaus - AM.

2.1.3 Assepsia das sementes

As sementes passaram por dois processos de assepsia, dentro e fora da câmara de fluxo laminar. Primeiramente, as sementes foram lavadas com água e detergente ainda com tegumento, imersas em hipoclorito de sódio a 5%, durante 20 minutos, em seguida, foram retirados os tegumentos das sementes e feita à segunda assepsia em câmara de fluxo laminar, onde foram imersas em álcool 70% durante 2 minutos sob constante agitação e lavadas com água destilada autoclavada. Posteriormente, foi feita a desinfestação em hipoclorito 2%, durante 5 minutos, também sob constante agitação, e, por último, foi feita tríplice lavagem com água destilada autoclavada.

2.1.4 Preparação dos meios de cultivo MS e reguladores de crescimento

O meio de cultura utilizado foi o M.S. descrito por Murashige e Skoog (1962), suplementado com 3% de sacarose e vitaminas, (2,5 g.L⁻¹ de Phytigel®) acrescidos de reguladores de crescimento conforme tratamentos: AIA (0,5 mg/L), BAP (1,0 mg/L) e interação de auxina e citocinina nas respectivas proporções: (0,5 de AIA+ 1,0 BAP).

Logo após, os pH das soluções foram ajustados para 5,8 e, então, adicionado aos meios de crescimento 1,8 g de ágar em cada uma das soluções. Depois, foi realizada a autoclavagem durante 15 minutos a temperatura 121°C.

2.1.5 Inoculação dos eixos embrionários

Os eixos embrionários foram excisados das sementes, cortando-os transversalmente no centro e inoculados individualmente em cada tubo de ensaio contendo 20 mL do meio de cultura. Em seguida, os tubos foram vedados com parafilme e levado para a sala de incubação sob condições controladas de cultivo, com fotoperíodo de 16 horas/luz, intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura variando de 30°C (dia) a 20°C (noite) (Figura 1).



Figura 1. Sala de crescimento de cultura de tecidos.

2.1.6 Condução do experimento e coleta de dados

O experimento foi conduzido durante 30 dias e foram avaliadas as seguintes variáveis: a porcentagem de germinação dos embriões zigóticos (todos os embriões entumecidos); emissão de hipocótilo, raiz secundária, primária, epicótilo, eófilos, bem como a contagem do número de folhas, raízes e medições do comprimento das raízes, hipocótilo e epicótilo. A avaliação, dependendo da variável, foi realizada diariamente.

Após a semeadura das sementes e inoculação dos embriões, foram calculadas as porcentagens de germinação (G%), o índice de velocidade de germinação (IVG), conforme metodologia de Biruel *et al.*, (2007), e o tempo médio de germinação (TMG) de acordo com Labouriau e Valadares (1976).

Descritas nas seguintes equações:

$$(G\%) = (N/A).100$$

G = porcentagem de germinação;

N = número de sementes germinadas;

A = número total de sementes colocadas para germinar.

$$IVG = 1/t$$

IVG = índice de velocidade média de germinação;

t = tempo médio de germinação

$$(TMG) = (\sum n_i t_i) / \sum n_i$$

TMG = tempo médio de incubação;

n_i = número de sementes germinadas por dia;

t_i = tempo de incubação (dias).

2.1.7 Morfologia da germinação

A caracterização morfológica das sementes de *H. brasiliensis* foi realizada em amostras de doze (12) unidades de cada fase da germinação e formação da plântula. As observações foram executadas com auxílio de lupa de mão com aumento de 75 mm. Características morfológicas do eixo embrionário (forma e posição, eixo hipocótilo-radícula) e das plântulas (emissão da raiz primária, secundária, hipocótilo, epicótilo e eofilos) foram descritas tanto para o material proveniente de sementes selvagens e do clone.

2.2 Extração de proteínas solúveis

O material finamente pulverizado, provenientes dos tecidos de parte aérea e radicular das plântulas dos diferentes meios de cultivo (MS, AIA, BAP e AIA x BAP), foram submetidos à extração em NaCl 0,15 M (10% p/v). A extração ocorreu sob homogeneização durante duas horas à temperatura ambiente ($26 \pm 3^\circ\text{C}$), seguida de centrifugação a $11.000 \times g$ durante 20 minutos a 10°C . O sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante 72 horas, para retirada do sal e, então, liofilizado durante 96 horas, resultando no extrato proteico.

2.3 Quantificação de proteínas solúveis

O extrato proteico (2mg) foi ressuspenso em 1 mL de água destilada e a concentração de proteínas foi estimada a partir da incubação de 100 µL do extrato com 3 mL do reagente de Bradford (BioAgency) durante 10 minutos à temperatura ambiente ($26 \pm 3^\circ\text{C}$), utilizando-se a albumina sérica bovina (BSA, BioAgency) como padrão, de acordo com o método descrito por Bradford (1976). O teor de proteínas foi determinado por meio de leituras espectrofotométricas a 595 nm (UV /Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences).

2.4 Eletroforese em SDS-PAGE

Os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% e de N-N'-metilenobis-acrilamida 0,8% m/v. O gel de concentração a 5% foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e o gel de separação 12,5%, em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, sendo acrescentado em ambos SDS 20% m/v. A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED e PSA 10% m/v.

A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1%, a 200 volts, 15 mA/ gel, durante 2 horas. Marcadores de massas moleculares da marca Promega foram utilizados com faixa de 10 kDa - 100 kDa.

Após as corridas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue dissolvido em ácido acético 0,1% v/v, etanol e água destilada 1:4:5 v/v/v durante 2 horas e, então, descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v) durante 1 hora.

2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), utilizando dois tipos de sementes (selvagem e clone) e meio MS com três dosagens de reguladores de crescimento (AIA, BAP e AIA x BAP) com 4 repetições cada tratamento, sendo cada repetição constituída por três tubos de ensaio contendo um explante, constituindo um esquema fatorial de 4x2.

As análises estatísticas dos dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro Wilks) e homogeneidade de variância (teste F) e, atendendo essas premissas, foram realizados à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas

pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado para a realização das análises foi o SigmaPlot 12.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização morfológica

Quanto à caracterização morfológica, a germinação *in vitro* de *Hevea brasiliensis*, provenientes de sementes selvagens e de clone apresentaram embrião com eixo hipocótilo-radícula curto, cilíndrico e reto. Quanto à morfologia das plântulas, iniciou o processo germinativo com o intumescimento do eixo embrionário aos 2 e 3 dias, com início de pigmentação esverdeada (Figura 2). Logo após, iniciou a formação do hipocótilo aos 4 e 5 dias com média de 0,6 e 0,8 cm para sementes selvagens e clone, respectivamente, com coloração esverdeada e na região basal, apresentando estruturas em sua extremidade que deram origem aos tecidos radiculares (Figura 2).

Aos 5 e 8 dias teve início com o alongamento das raízes secundárias nas sementes selvagens e de clone, com média de 2 e 2,5 cm, respectivamente, com coloração amarelada, e aos 7 e 8 dias iniciou o alongamento das raízes primárias, com média de 4 e 6 cm, respectivamente, com coloração verde claro. Aos 8 e 9 dias iniciou-se a emissão do epicótilo, com 4 e 5 cm, como coloração verde escuro, e aos 10 e 12 dias iniciou o aparecimento da gema apical de coloração esverdeada, que deram origem aos eófilos. De 13 a 15 dias sobrevêm a emissão dos eófilos, verdes-claros e com média de 1,2 e 1,8 cm, seguida de sua expansão foliar, de cor verde-escuro (Figura 2).



Figura 2. Estádios de germinação e estabelecimento das plântulas *in vitro* de *Hevea brasiliensis*. (En): eixo embrionário entumescido. (Hp): hipocótilo. (Pr): primórdios radiculares. (Rp): raiz primária. (Rs): raiz secundária. (Ep): epicótilo. (Eo): eófilo.

É importante entender as características morfológicas das sementes *in vitro*, bem como o processo germinativo, para interpretar o que pode estar associado ao fator viabilidade da espécie por apresentar sementes recalcitrantes. Condições *in vitro* comprometem a morfologia das folhas, expansão da folha e massa seca, estas características afetam negativamente a capacidade de aclimação *ex vitro*, mas pode variar de acordo com o ambiente *in vitro* e as espécies vegetais estudadas (Kozai *et al.*, 1992; Llorente e Apóstolo, 1998). Plântulas *in vitro* que se desenvolvem em condições controladas, bem como, temperatura e luz, fonte de água e carboidratos, ocasiona morfologia, fisiologia e anatomia anormal, portanto as plântulas *in vitro* devem ser submetidas ao estágio de aclimatização em estufas para a modificação dessas características anormais (Darwesh *et al.*, 2015). Assim, as sementes selvagens e do clone não apresentaram diferenças morfológicas durante o estabelecimento das plântulas *in vitro*.

3.2 Germinação

De maneira geral, após dois dias de inoculação observou-se o intumescimento dos embriões tanto para sementes selvagens quanto o clone. Os dados de porcentagem, índice de velocidade e tempo médio de germinação nos diferentes meios de cultivo MS com reguladores de crescimento são apresentados na Tabela 1. O maior valor de porcentagem de germinação em sementes selvagens ocorreu no meio MS, 67% e para sementes de clone ocorreram maiores médias no BAP e AIA + BAP, 83 e 75%, respectivamente, apresentando diferença significativa entre as sementes selvagens e clone ($p < 0,042$) com a adição dos reguladores de crescimento BAP e para os tratamentos com MS e AIA, não houve diferença ($p > 0,05$) (Figura 3A).

As médias de porcentagem de emissão parte radicular também foram maiores nos reguladores de crescimento AIA e AIA + BAP, para sementes selvagens, cerca de 50%, e AIA e AIA + BAP para sementes de clone, 58 e 75%, respectivamente, apresentando diferença ($p < 0,001$) para as sementes selvagens e clone em meio com regulador de crescimento BAP (Figura 3B). Para as variáveis, alongamento de raiz secundária e primária, as sementes selvagens apresentaram médias 50% em meio AIA, já o clone apresentou cerca de 67%, em meio BAP e AIA + BAP, sendo as médias diferentes para estes tratamentos ($p < 0,005$) (Figura 2C e D). Quanto à emissão do epicótilo e eofilos, as maiores médias ocorreram no MS, 33% para sementes

selvagens e nas sementes de clone em meio AIA + BAP, apresentando diferenças significativas entre as sementes selvagens e de clone nos meios com os reguladores de crescimento BAP e AIA + BAP ($p < 0,041$) (Figura 2E e F).

Ambientes convencionais, as sementes de *H. brasiliensis* apresentam baixas porcentagens de germinação de 58 a 80%, devido às características recalcitrantes das sementes e alto índice de infestação por microorganismos, que perdem sua viabilidade rapidamente (Garcia *et al.*, 1994; Paula *et al.*, 1997). Adicionalmente, no presente estudo o cultivo de embriões zigóticos apresentaram porcentagens de germinação próximas ao ambiente convencional, o que torna uma vantagem para a propagação da espécie em larga escala, pois os embriões inoculados são todos viáveis, maduros e passam por um processo de assepsia, aumentando assim as taxas de germinabilidade dos mesmos.

Estudos afirmam que quanto mais jovens forem os embriões, mais difícil será seu cultivo *in vitro*, devido ao seu pequeno tamanho, a danos que podem ocorrer durante sua retirada e suas exigências nutricionais serem mais complexas. Estudo com embriões de *Jatropha curcas*, pertencente à mesma família da espécie em estudo, encontrou baixa porcentagem de germinação dos embriões (2-5%) (Hu e Ferreira, 1998; Mohan *et al.*, 2011).

Tabela 1. Médias de porcentagem, índice de velocidade e tempo médio de germinação, primórdios radiculares, alongamento raiz secundária e primária, emissão do epicótilo e dos eofilos de plântulas de *Hevea brasiliensis* em diferentes reguladores de crescimento.

Variáveis analisadas	Meios de cultivo MS e reguladores de crescimento							
	MS		AIA		BAP		AIA + BAP	
	Selvagem	Clone	Selvagem	Clone	Selvagem	Clone	Selvagem	Clone
(%)								
Germinação	66.7 aA	66.7 aA	58.3 aA	66.7 aA	33.3 bA	83.3 aA	58.3 aA	75.0 aA
Primórdios radiculares	41.7 aA	25.0 aB	50.0 aA	58.3 aAB	16.7 bA	66.7 aA	50.0 aA	75.0 aA
Raiz secundária	41.7 aA	25.0 aA	50.0 aA	50.0 aAB	16.7 bA	58.3 aAB	41.7 aA	66.7 aB
Raiz primária	41.7 aA	25.0 aA	50.0 aA	50.0 aAB	16.7 bA	58.3 aAB	41.7 aA	66.7 aB
Epicótilo	33.3 aA	16.7 aA	25.0 aA	41.7 aA	16.7 bA	41.7 aA	25.0 bA	50.0 aA
Eofilos	33.3 aA	16.7 aA	25.0 aA	41.7 aA	16.7 bA	41.7 aA	25.0 bA	50.0 aA
(IVG)								
Germinação	0.202 aA	0.177 aA	0.221 bA	0.353 bA	0.148 aA	0.223 aAB	0.219 bA	0.350 aB
Primórdios radiculares	0.143 aA	0.121 aA	0.225 aA	0.298 aB	0.134 aA	0.128 aA	0.135 aA	0.201 aAB
Raiz secundária	0.129 aA	0.129 aA	0.200 aA	0.167 aA	0.155 aA	0.156 aA	0.164 bA	0.417 aB
Raiz primária	0.129 aA	0.129 aA	0.200 aA	0.167 aA	0.155 aA	0.156 aA	0.164 bA	0.417 aB
Epicótilo	0.120 aA	0.115 aA	0.125 aA	0.127 aA	0.095 aA	0.089 aA	0.175 aB	0.188 aB
Eofilos	0.120 aA	0.115 aA	0.125 aA	0.113 aA	0.095 aA	0.089 aA	0.175 aB	0.096 bA
(TM)								
Germinação	6.125 aA	7.375 aA	6.250 aA	4.125 aAB	7.000 aA	6.375 aAB	6.500 aA	3.125 bB
Primórdios radiculares	7.750 aA	9.875 aA	4.500 aA	4.333 aB	7.500 aA	7.417 aAB	6.750 aA	5.125 aB
Raiz secundária	8.750 aA	8.000 aA	5.000 aB	6.000 aA	6.500 aAB	6.375 aA	6.375 aAB	2.500 bB
Raiz primária	8.750 aA	8.000 aA	5.000 aB	6.000 aA	6.500 aAB	7.625 aA	6.375 aAB	2.500 bB
Epicótilo	8.333 aAB	8.750 aA	8.000 aA	8.000 aA	10.500 aB	11.250 aB	6.000 aC	5.375 aC
Eofilos	8.333 aAB	8.750 aA	8.000 aA	9.000 aA	10.500 aB	11.250 aB	6.000 aC	10.375 bAB

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As letras minúsculas referem-se à diferença entre as espécies no mesmo tratamento e letras maiúsculas referem-se à diferença entre tratamentos na mesma espécie. O teste tukey foi aplicado ao nível de 5% de probabilidade.

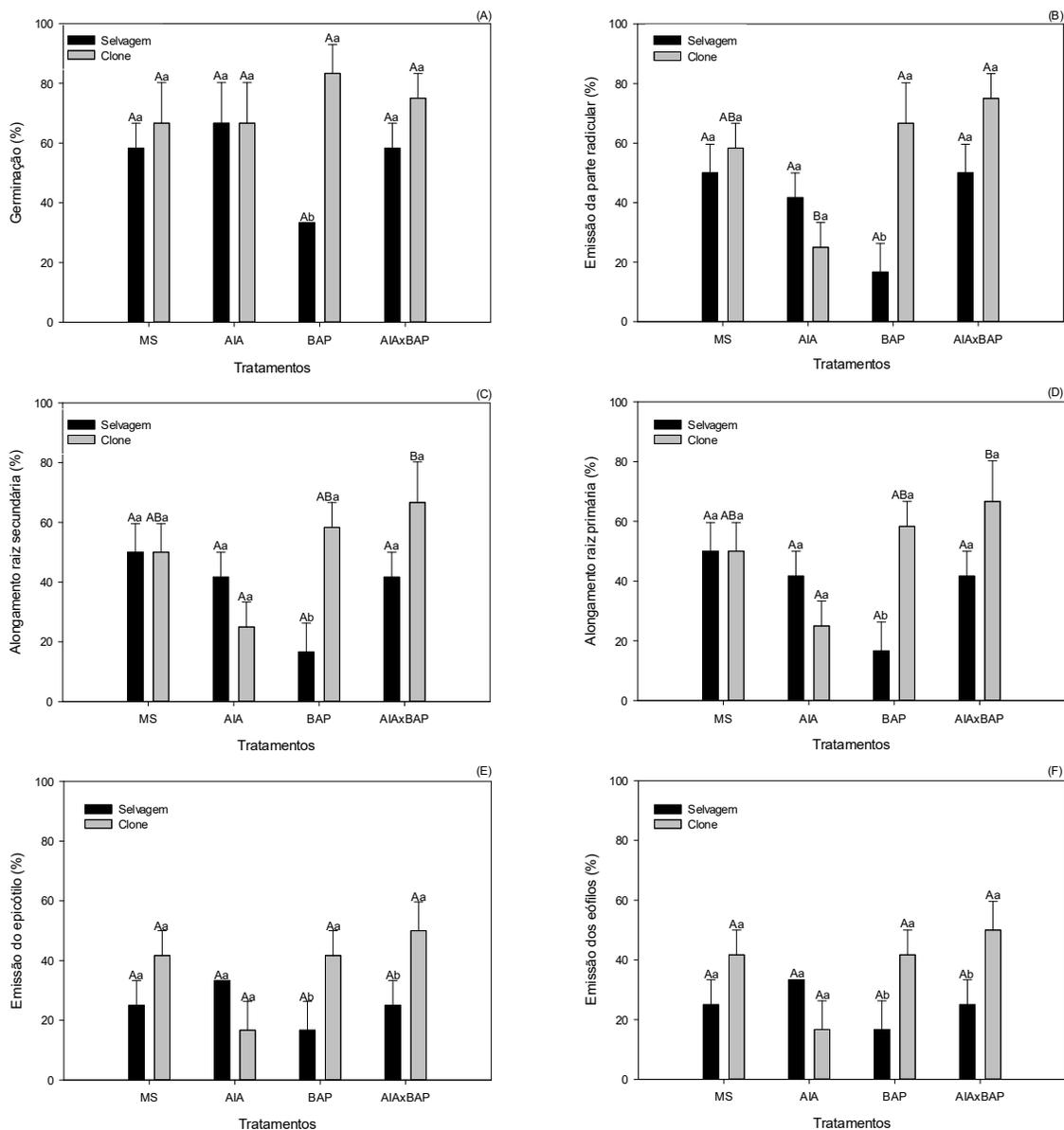


Figura 3. Médias de Porcentagem. (A) germinação, (B) emissão parte radicular, (C) alongamento raiz secundária (D) e primária, (E) emissão do epicótilo (F) e dos eófilos submetidos a diferentes reguladores de crescimento (n=12). As letras minúsculas referem-se à diferença entre as espécies no mesmo tratamento e letras maiúsculas referem-se à diferença entre tratamentos na mesma espécie. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os maiores valores de índice de velocidade de germinação para as sementes selvagens e clone ocorreram no meio de cultivo MS com adição de reguladores de crescimento AIA e AIA + BAP, apresentando diferenças significativas para os mesmos ($p < 0,030$). As maiores médias de velocidade de emissão de primórdios radiculares

foram em meio MS com reguladores de crescimento AIA, para sementes selvagens (0.225) e de clone (0.298), não apresentando diferenças significativas para os tratamentos.

Os maiores valores de velocidade de alongamento de raiz secundária e primária para sementes selvagens (0.200) e de clone (0.417) ocorreram no meio de cultivo MS com reguladores de crescimento AIA e AIA + BAP, com diferença significativa ($p < 0,001$) no tratamento com AIA + BAP. Para a emissão do epicótilo, as maiores médias de velocidade foram em meio MS com reguladores de crescimento AIA + BAP para as sementes selvagens (0.175) e de clone (0.188), não apresentando diferença significativa em nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$). A velocidade de emissão dos eofilos para as sementes selvagens foram maiores em meio acrescido de AIA + BAP (0.175) e para as sementes de clone em meio MS (0.115) com diferença significativa em meio AIA + BAP ($p < 0,001$).

Para o tempo médio de germinação não observada diferença significativa entre os meios MS, AIA e BAP para sementes selvagens e clone ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Quanto a contaminação dos embriões, observou-se ocorrência entre 3 e 6 dias após a inoculação (Figura 4), ao passo que a oxidação dos embriões ocorreu entre 5 e 8 dias.

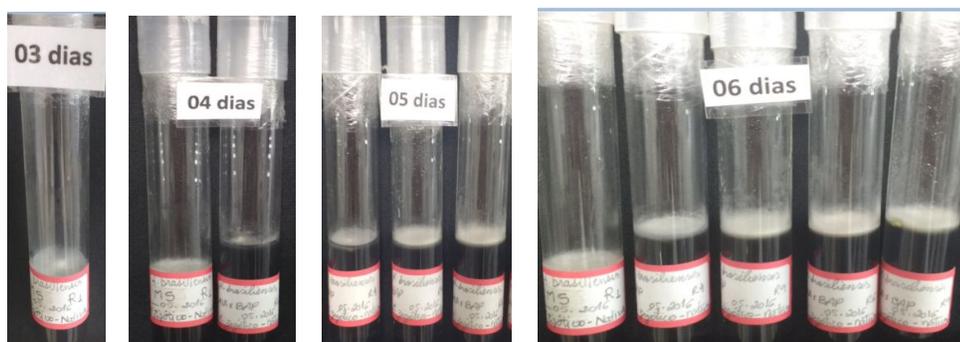


Figura 4. Contaminação dos explantes em meio MS com diferentes reguladores de crescimento.

Resultados similares em cultivo *in vitro* com a espécie *H. brasiliensis* apresentaram pouca contaminação nos explantes, conforme encontrado no presente estudo, enquanto para a espécie *Jatropha curcas*, pertencente à mesma família da

espécie em estudo, observou alta porcentagem de contaminação e formação de plântulas anormais (Ighere *et al.*, 2011; Mohan *et al.*, 2011). Assim, um passo de iniciação de cultura de tecido bem sucedida começa, frequentemente, com uma técnica de esterilização de explantes eficazes e, na micropropagação de *H. brasiliensis*, o estabelecimento de uma cultura axênica é um dos passos desafiadores. Outro problema encontrado na micropropagação de *H. brasiliensis* é a ocorrência de oxidação dos embriões (Moradpour *et al.*, 2016).

3.3 Crescimento das plântulas

Para o crescimento das plântulas foram avaliadas as seguintes variáveis: altura, comprimento das raízes secundária e primária, hipocótilo, diâmetro do colo, número de folhas, massa fresca da parte aérea e radicular. As figuras 5A, B, C e D mostram as imagens das plântulas de *H. brasiliensis* em meio de cultura com diferentes reguladores de crescimento. O maior comprimento de parte aérea foi observado no BAP, (3,35-3,50 cm), seguidos dos meios de cultivo MS e interação AIA + BAP, apesar de não haver diferenças significativas para sementes selvagens e clone ($p>0,05$). Estudos com a mesma espécie também encontraram maiores médias de altura (2,55 cm) com o regulador de crescimento BAP (Asseara *et al.*, 1998; Ighere *et al.*, 2011).

Estudo com *Jatropha curcas*, em meio MS com e sem BAP observou a formação de plântulas em meio MS basal e com BAP (0,1 mg/L) (Mohan *et al.*, 2011). No entanto os melhores resultados foram encontrados com a indução da citocinina, BAP, resultados similares ao encontrado nesse estudo para *H. brasiliensis*.

No comprimento de raízes secundárias e primárias, os maiores valores foram observados em meio de cultivo AIA, e apresentou diferenças significativas entre sementes selvagens e de clone para as raízes secundárias ($p<0,032$) e primárias ($p<0,004$). Resultado semelhante foi encontrado em meio de cultivo MS com regulador de crescimento AIA para a espécie *Euphorbia heterophylla*, pertencente à mesma família da espécie em estudo, sendo o mesmo eficiente na formação de raízes para os explantes radiculares (Colussi *et al.*, 2008). Assim, deve-se considerar que nem sempre as auxinas naturais ou sintéticas induzem primórdios radiculares em explantes *in vitro* (Jardim *et al.*, 2010).

Quanto às variáveis comprimento do hipocótilo, diâmetro do colo e número de folhas, não foi observada diferenças significativas ($p>0,05$). Estudo similar ao

encontrado no presente estudo, para a variável número de folhas, observou-se que para a espécie *Ocimum basilicum*, à medida que foi adicionado os reguladores de crescimento BAP e AIA ao meio de cultura, não houve diferença significativa (Costa *et al.*, 2015).

Para a variável massa fresca da parte aérea observou-se maiores médias no meio de cultivo MS com o regulador de crescimento BAP, apresentando diferenças significativas entre os tratamentos com adição de BAP e AIA + BAP ($p < 0,042$), (Tabela 3). Estudos afirmam que o regulador de crescimento, BAP é muitas vezes adicionado ao meio de cultura visando melhorar a micropropagação, com aumento no número de gemas, folhas e brotos, e para induzir um acréscimo na produção de massa fresca e qualidade das plantas cultivadas (Rubin *et al.*, 2007). Assim, para o presente estudo observou-se, quanto à massa fresca de parte radicular, maiores médias no meio de cultivo com reguladores de crescimento AIA, porém não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

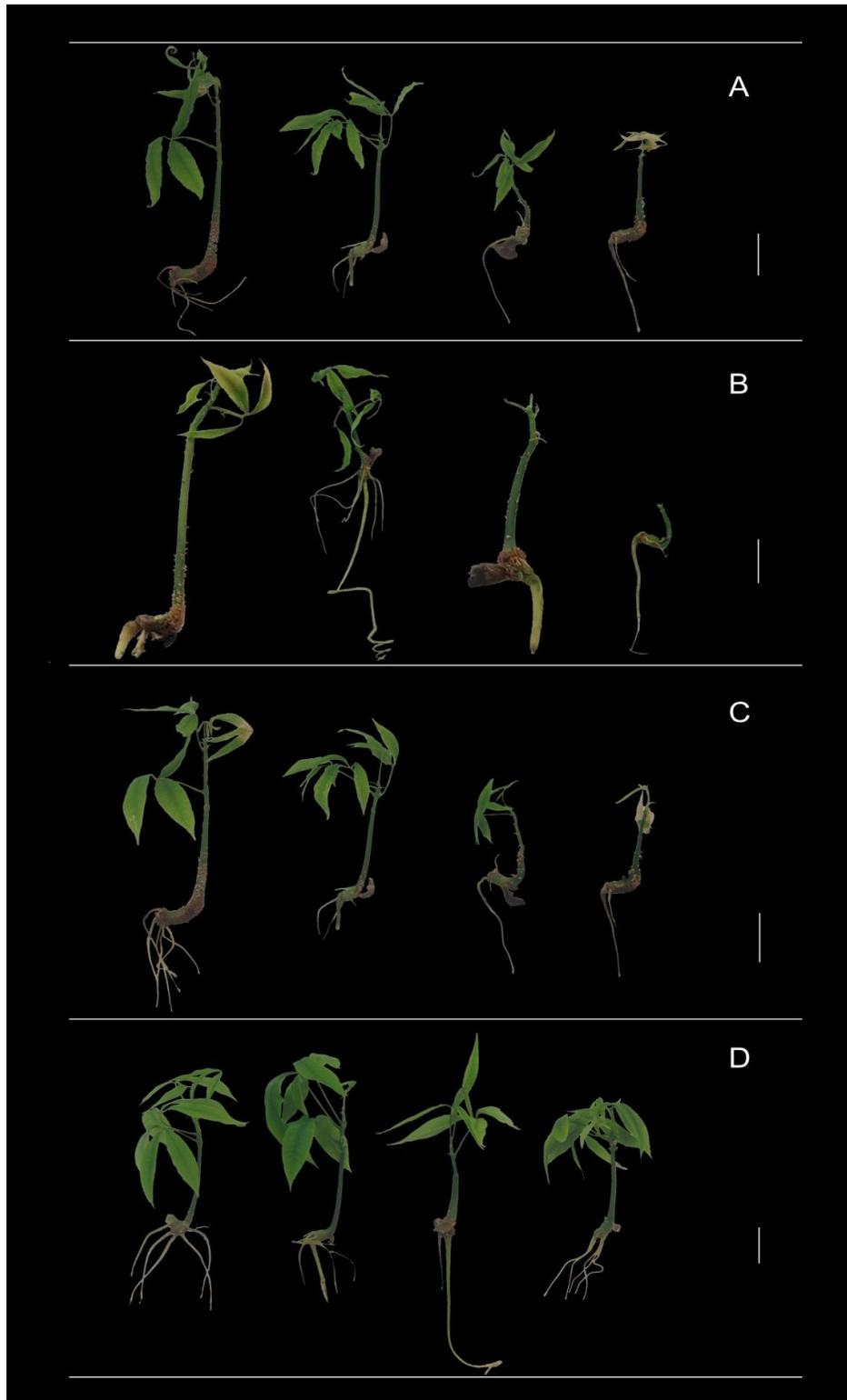


Figura 5. Parte aérea e sistema radicular de plantas de *Hevea brasiliensis* em diferentes meios de cultura, aos 40 dias. A) Murashige & Skoog (MS). B) Ácido indol acético (AIA). C) Benzilaminopurina (BAP). D) Interação AIA + BAP.

Tabela 2. Médias de comprimento da parte aérea (CPA) e raiz secundária (CRS), raiz primária (CRP), hipocótilo (CH), diâmetro do colo (DC) e número de folhas (NF) de plântulas de *Hevea brasiliensis* em diferentes meios de cultivo.

Variáveis analisadas	Meios de cultivo							
	MS		AIA		BAP		AIA x BAP	
	Selvagem	Clone	Selvagem	Clone	Selvagem	Clone	Selvagem	Clone
Altura (cm)	2.233 aA	4.000 bA	1.600 aB	1.800 aB	3.467 aC	3.217 aC	2.700 aA	2.633 aD
Raiz secundária (cm)	2.167 aA	3.800 bA	5.200 aB	2.300 bB	2.490 aA	2.040 aB	2.433 aA	2.500 aB
Raiz primária (cm)	3.333 aA	3.933 aAB	9.070 aB	4.433 bA	2.033 aA	2.000 aB	2.300 aA	2.633 aAB
Hipocótilo (cm)	0.650 aA	0.783 bAC	0.650 aA	0.650 aB	0.703 aAB	0.717 aAB	0.750 aB	0.833 bC
Diâmetro do colo (mm)	2.533 aA	2.333 bA	3.000 aB	3.533 bB	2.497 aA	2.280 bB	2.613 aA	2.333 bB
N. de folhas (qnt.)	2.333 aA	3.333 bAB	4.000 aB	3.833 aA	2.000 aA	3.000 bAB	2.333 aA	2.667 aB
Massa Fresca PA (g)	0.143 aA	0.170 bA	0.143 aA	0.123 bB	0.210 aB	0.123 bB	0.213 aB	0.203 aC
Massa Fresca PR (g)	0.113 aA	0.107 aA	0.213 aB	0.133 bB	0.113 aA	0.120 aAB	0.120 aA	0.103 aA

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. O teste de tukey foi aplicado ao nível de 5% de probabilidade.

3.4 Proteínas solúveis e perfil proteico

As concentrações de proteínas solúveis da parte aérea de plântulas de *Hevea brasiliensis* de explantes provenientes de sementes selvagens e clone apresentaram diferenças significativas ($p < 0,001$) para o meio de cultivo MS e com regulador de crescimento AIA, sendo os maiores teores encontrados em meio contendo AIA. Assim, as proteínas presentes na parte aérea de sementes de clone foram maiores quando comparadas as sementes selvagens. Quanto às proteínas solúveis da parte radicular de plântulas de *Hevea brasiliensis*, houve diferenças estatísticas para sementes selvagens e de clone em meio MS com adição de regulador de crescimento AIA ($p < 0,021$), sendo os maiores teores de proteínas na parte radicular observados nos meios de cultivo MS (Figura 6A e B). Segundo Piza *et al.*, (2003), as proteínas em plantas, como em outros organismos, são constantemente degradadas e restabelecidas e permite às plantas a reutilização de aminoácidos, alterando seu conteúdo protéico durante o desenvolvimento, a fim de se adaptar a novas condições ambientais.

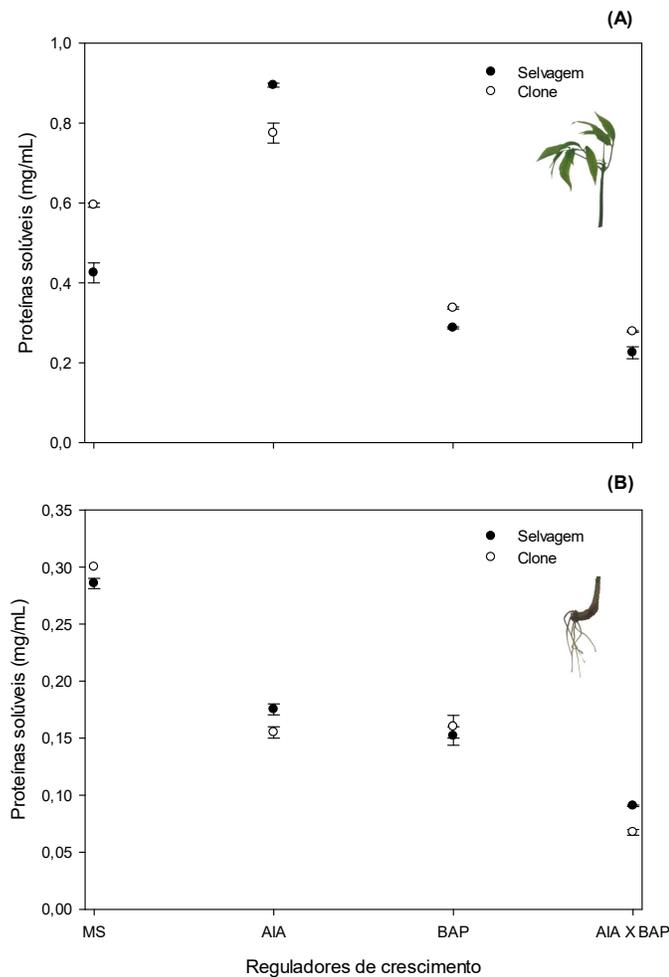


Figura 6. Alterações nos teores de proteínas solúveis em tecidos de plântulas de *Hevea brasiliensis* *in vitro* em diferentes meios de cultivo. **(A)** Parte aérea. **(B)** Parte radicular. Selvagem (■) e Clone (□).

Quanto à análise em SDS-PAGE observou-se bandas proteicas em tecidos da parte aérea e radicular de plântulas de *Hevea brasiliensis*, revelaram a ocorrência de faixas de bandas proteicas na faixa de 7 a 30 kDa.

Nos tecidos de parte aérea e radicular, tanto para explantes provenientes de sementes selvagens quanto de clone observou-se padrão de bandas proteicas de massa molecular aparente de 12, 20 e 30 kDa nos diferentes meios de cultivo. As proteínas com massa molecular aparente de 30 kDa são bem evidentes nos tecidos de parte aérea, com regulador de crescimento AIA e interação AIA + BAP e já no MS e BAP apresentam menor concentração. As proteínas com massa molecular aparente de 30 kDa são pouco evidentes nos tecidos de parte radicular nos diferentes meios de cultivo para ambas as sementes (Figura 7).

Assim sugere-se maior concentração de proteínas de 20 e 30 kDa da parte aérea, quando há presença da auxina AIA e quanto a parte radicular observou-se um padrão de bandas proteicas de massa molecular de 20 e 30 kDa, independente dos meios de cultivo com ou sem reguladores de crescimento.

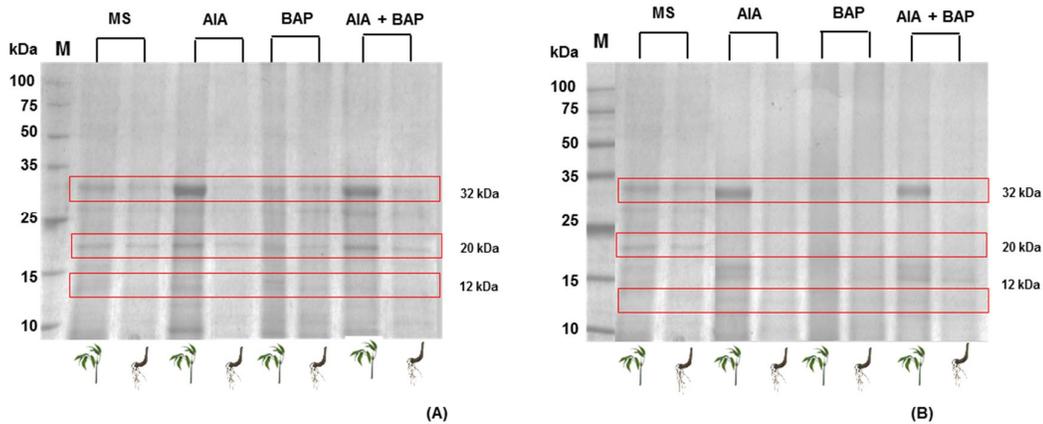


Figura 7. Perfil eletroforético dos extratos proteicos provenientes de parte aérea e radicular de plântulas de *Hevea brasiliensis* em *in vitro*. **(A)** Sementes selvagens. **(B)** Sementes de clone.

M- marcador de massa molecular (kDa). (1) MS- parte aérea. (2) MS- parte radicular. (3) AIA- parte aérea. (4) AIA- parte aérea. (5) BAP- parte aérea. (6) BAP- parte radicular. (7) AIA x BAP- parte aérea. (8) AIA x BAP- parte radicular.

A espécie em estudo apresenta grande importância econômica por seu látex e estudos de Gomez (1982), Mesquita e Oliveira (2010) têm relatado início da formação de laticíferos e síntese de látex em sementes de *H. brasiliensis*. Segundo estudos de Berthelot, (2014) a via mevalonato tem sido estipulada como rota de síntese do látex e, dentre as proteínas com papel fundamental nesta rota estão, as proteínas de fator de alongação de borracha (*rubber elongation factor* – REF) que possui massa molecular de 14,7 kDa e as proteínas de partículas pequenas de borracha (*small rubber particle protein* - SRPP) de 22,3 kDa. A partir da observação dos perfis proteicos, constatou-se a presença de proteínas na faixa de 20 kDa, tanto na parte aérea quanto radicular para ambos os genótipos, sugerindo-se que essa faixa de proteínas possa estar associada a SRPP, proteína associada à síntese do látex, ao passo que, observou-se a presença de proteínas na faixa de 14 kDa, que pode estar associada a uma das principais proteínas de alongamento da borracha, a REF.

As diferenças no perfil proteico de um organismo podem ser atribuídas aos tipos de tecidos e aos estádios de desenvolvimento e condições internas e externas (Shepard *et al.*, 2000). A cultura de tecidos vegetais pode ser o sistema mais adequado de produção de pequenas e médias quantidades de proteínas de alta pureza, de alto valor e com diversas aplicações dependendo do ambiente cultivado.

São complexas as interações que ocorrem entre as sementes em formação e a planta-mãe, o que torna difícil a identificação de quais hormônios vegetais está envolvido no crescimento e desenvolvimento das sementes e no acúmulo de proteínas (Nascimento e Mosquim, 2004). Adicionalmente, além de influenciar o crescimento e desenvolvimento das sementes, os hormônios vegetais podem induzir a síntese protéica, conforme verificado no presente estudo, corroborando com Van Huizen *et al.*, (1996), em que observou a síntese de proteínas em sementes de ervilha foi detectada dentro de seis horas após a aplicação de auxinas e giberelinas e Nascimento e Mosquim, (2004) com sementes de soja, a adição de reguladores de crescimento o ANA e o BAP foram os mais eficientes no acúmulo de proteínas, tanto isolados como combinados.

4. CONCLUSÃO

- As estruturas morfológicas das plântulas *in vitro* tanto para explantes provenientes de sementes selvagens quanto do clone foram similares.
- O cultivo de embriões zigóticos apresentou alta porcentagem de germinação para sementes selvagens e clone.
- O protocolo de desinfestação foi eficaz, com baixa contaminação dos embriões *in vitro*.
- O estabelecimento de plântulas de *Hevea brasiliensis* tanto para sementes selvagens e de clone foi melhor em meio MS contendo o regulador de crescimento BAP para a parte aérea e AIA para a parte radicular.
- As maiores concentrações de proteínas na parte aérea e radicular foram observadas nos meios de cultivo MS e com o regulador de crescimento AIA.
- Os tecidos de plântulas de *H. brasiliensis* (parte aérea e radicular) exibiram bandas proteicas nas faixas de 7 a 32 kDa, que podem estar associadas as principais proteínas da rota de síntese do látex.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, R.A.; Martins, A.B.G. 2003. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(1): 134-136.
- Asseara, B.L.M.; Roberto, A.A.T.; Adelson, B.F. 1998. Micro-propagation of rubber. *Genet. Mol. Biol.*, 21: 3.
- Berthelot, K.; Lecomte, S.; Estevez, Y.; Peruch, F.E. 2014. *Hevea brasiliensis* REF (Hev b 1) and SRPP (Hev b 3): An overview on rubber particle proteins. *Biochimie*, 106: 1 e 9.
- Biruel, R.P.; Aguiar, I.B.; Paula, R.C. 2007. Germinação de sementes de pau-ferro submetidas a diferentes condições de armazenamento, escarificação química, temperatura e luz. *Revista Brasileira de Sementes*, 29 (3):151-159.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Chaari-Rkhiss, A.; Maalej, M.; Drira, N. 2003. Micropropagation of Tunisian olive varieties: Preliminary results. *Olivae*, 95: 19-23.
- Costa, A. S. da.; Arrigoni-Blank, M. de F., Silva, J.H.S.; Torres, M.F.; Santos, O.N. A.; Blank, A.F. 2015. Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de manjeriço. *Scientia Plena*, 11: 010201.
- Colussi, F.; Dabul, A.N.G.; Ayub, R.A. 2008. Regeneração de *Euphorbia heterophylla* L. *in vitro*. *Ciênc. agrotec.*, 32(4): 1317-1321.
- Darwesh, R.S.S. 2015. Morphology, physiology and anatomy *in vitro* affected acclimatization ex vitro date palm plantlets: A Review. *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences (IJCEBS)*, 3(2).
- Fonseca, S.C.L.; Freire, H.B. 2003. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. *Bragantia*, 62(2): 297-303.
- Garcia A.; Vieira D. R. 1994. Germinação, armazenamento e tratamento fungicida de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Revista Brasileira de Sementes*, 6(2): 128-133.
- Hartmann, H.T.; Kester, D.E.; Davies, J.F.T.D.; Geneve, R.L. 2002. Plant propagation: principles and practices. PrenticeHall/Englewood Cliffs, New Jersey. 7th ed. Upper saddle River: Prentice Hall.

- Hu, C. Y.; Ferreira, A. G. 1998. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C. et al. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ. 1: 371-393.
- Ighere, A.D.; Okere, A.; Elizabeth, J., Olayode, M.; Olatunde, F.; Abiodun, S. 2011. In-vitro culture of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) embryo. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 3(9): 185-189.
- Jardim, L.S.; Sampaio, P de. T.B.; Costa, S.D.S.; Gonçalves, C.D.Q.B.; Brandão, H. L.M. 2010. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). 40(2): 275–280.
- Kothari, S.L.; Joshi, A.; Kachhwaha, S.; Ochoa-Alejo, N. 2010. Chili peppers: a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28: 35-48.
- Kozai, T., S. Kino, B.R. Jeong, M. Hayashi, M. Kinowaki, M. Ochiai and K. Mori. (1992). A sideward lighting system using diffusive optical fibers for production of vigorous micropropagated plantlets. *Acta Hort.* 319: 237-242.
- Kumar, K. and Rao, I.U. 2012. Morphophysiologicals problems in acclimatization of micropropagated plants in - *ex vitro* conditions-a review. *J. Ornament Hortic Plants*, 2(4): 271-283.
- Labouriau, L.G. 1983. *A germinação de sementes*. Organização dos estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Série de Biologia, 171 pp.
- Llorente, B.E.; Apóstolo, N.M. 1998. Effect of different growth regulators and genotype on *in vitro* propagation of jojoba. *Journal New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 26(1): 55-62.
- Manzur, J.P.; Penella, C.; Rodríguez-Burruezo, A. 2013. Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. *Scientia Horticultura*, 161: 181-187.
- Mendanha, A. B. L.; Torres, R. A de. A.; Freire, A de. B.. 1998. Micropropagation of rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Genet. Mol. Biol.* 21(3).
- Mesquita, A.C.; Oliveira, L.E.M de. 2010. Características anatômicas da casca e produção de látex em plantas de seringueira não enxertadas. *Acta Amazônica*. 40(2): 241–246.

- Mohan, N.; Nikdad, S.; Singh, G. 2011. Studies on seed germination and embryo culture of *Jatropha curcas* L. under in vitro conditions. *Biotechnol. Bioinf. Bioenergy*, 1: 187-194.
- Monnier, M. 1995. Culture of zygotic embryos. p. 117-153. In: Thorpe, T.A., ed. *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Moradpour, M.; Aziz, M. A.; Abdullah, S.N.A. 2016. Establishment of *in vitro* Culture of Rubber (*Hevea brasiliensis*) from Field-derived Explants: Effective Role of Silver Nanoparticles in Reducing Contamination and Browning. *Journal of Nanomedicine e Nanotechnology*, 7(3).
- Murashige, T. e Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nascimento, R do.; Mosquim, P.R. 2004. Efeito do ácido giberélico e diferentes aminoácidos sobre as atividades da sintetase da glutamina e sintase do glutamato e sobre o crescimento de frutos de soja. *Revista Brasil. Bot.*, 27(1): 63-70.
- Pawłowski, T.A.; Staszak, A.M. 2016. Analysis of the embryo proteome of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seeds reveals a distinct class of proteins regulating dormancy release. *Journal of Plant Physiology*, 195: 9-22.
- Paula, N.F.; Borges, E.E.L.; Borges, R.C.G.; Paula, R.C. 1997. Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 19(2): 326-333.
- Pinheiro, C.U.B. 1986. Germinação de sementes de palmeiras: revisão bibliográfica. Teresina: EMBRAPA UEPAE, 102 p.
- Piza, I.M.T.; Lima, G.P.P.; Brasil, O.G. 2003. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. *R. bras. Agrocência*, 9(4): 361-366.
- Razdan, M.K. 2003. *Plant Tissue Culture*. 2ed. Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Rubin, S.; Lima, C.S.M.; Bandeira, J de. M.; Ribeiro, M.V.; Benitz, L.C.; Peters, J.A.; Braga, E.J.B. 2007. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. Nota Científica. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2): 480-482.
- Santos, C.V.; Brito, G.; Pinto, G.; Fonseca, H.M.A.C. 2003. *In vitro* plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp., *maderensis*. *Scient. Hort*, 97(1): 83-87.

- Shepard, J.L., Olsson, B., Tendengren, M., Bradley, B.P. 2000. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs: copper and salinity stress. *Mar. Environ. Res.* 50: 337–340.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2013. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed. p.449-484.
- Van Huizen, R.; Ozga, J.A.; Reinecke, D.M. 1996. Influence of auxin and gibberellin on *in vivo* protein synthesis during early pea fruit growth. *Plant Physiology*, 112: 53-59.
- Venkatachalam, P.; Priya, P.; Saraswathy- Amma, C. K.; Thulaseedharam, A. 2004. Identification, cloning and sequence analysis of a dwarf genome-specific RAPD markers in rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.]. *Plant Cell Rep.*, 23: 327-332.
- Wang, G., Zhang, G., and Wu, M. 2016. CLE peptide signaling and crosstalk with phytohormones and environmental stimuli, *Front Plant Sci.*, 6: 1211.
- Xavier, A.; Wendling, R.L. da. S. 2013. Silvicultura Clonal: princípios e técnicas. 2 ed., ver. e ampl. Viçosa, MG: Ed. UFV, 279p.

6. CONCLUSÃO GERAL

Sementes de *Hevea brasiliensis* tanto de procedência para sementes selvagens quanto de clone demonstraram comportamentos distintos ao longo da germinação e o crescimento inicial das plântulas tanto em ambiente convencional quanto nas condições *in vitro*.

Sementes selvagens e do clone apresentaram respostas diferentes quanto às características morfofisiológicas e histoquímicas, sendo que as sementes selvagens exibiram maior tamanho, absorção de água mais lenta, alta germinabilidade e maior velocidade de germinação, produzindo plântulas mais vigorosas em comparação com as sementes do clone.

As sementes selvagens e de clone apresentaram respostas bioquímicas distintas para a mobilização das reservas primárias, nutrientes minerais e atividades enzimáticas, apresentando características de proteínas associadas à síntese de látex em ambas as sementes estudadas, sendo que as proteínas solúveis derivadas das sementes de clones apresentaram diferentes bandas proteicas em relação às sementes selvagens.

No ambiente *in vitro* as sementes selvagens e de clone apresentaram respostas distintas quanto aos teores de proteínas solúveis, sendo as maiores médias encontradas no meio MS e com regulador de crescimento AIA.

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que mesmo as sementes sendo da mesma espécie, características morfológicas interferem na germinação e no crescimento inicial das plântulas, bem como nas respostas morfofisiológicas e bioquímicas, abrindo perspectivas para novos estudos na área de fisiologia molecular associada ao processo de germinação e o crescimento inicial das plântulas de *Hevea brasiliensis*.