

Rosa Angelica Elias Da Silva

**Caracterização morfofisiológica e bioquímica do
desenvolvimento das sementes de *Trichocline
catharinensis* Cabrera.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Fungos, Algas e Plantas da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre Biologia de
Fungos, Algas e Plantas

Orientadora: Prof^a. Neusa
Steiner.

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Da Silva, Rosa Angelica Elias
Caracterização morfofisiológica e bioquímica do
desenvolvimento das sementes de *Trichocline catharinensis*
Cabrera. / Rosa Angelica Elias Da Silva ; orientadora,
Neusa Steiner - Florianópolis, SC, 2017.
114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2.
Embriogêneses. 3. Caracterização celular. 4. Fisiologia e
Anatomia das cipselas. 5. Proteínas e Poliaminas dos
embriões maduros. I. Steiner, Neusa. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Fungos, Algas e Plantas. III. Título.

A meu pai Miguel Humberto Elias (in memoriam) por seus conselhos e apoio incondicional; a minha mãe Arlette Da Silva que esteve sempre a meu lado compartilhando minhas alegrias, tristezas e por todo seu apoio para alcançar meus objetivos profissionais. Aos meus irmãos Martin, Miguel, Francisco, Susan, Katherine e Fatima, com quem compartilhei os melhores anos da minha infância.

Dedico e Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Neusa Steiner pela oportunidade, confiança e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fungos, Algas e Plantas, pelo grande aprendizado e ensinamentos transmitidos.

Ao laboratório de Biologia celular e do Desenvolvimento por permitir a realização das análises de microscopia de luz, em especial Eder Schmidt pela grande ajuda.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Prof. Miguel Guerra por permitir a realização das análises de proteínas e Hugo Fraga pela ajuda nas análises das poliaminas.

A Ana Paula Lando, Claudia Costa, Willian Viana e Priscilla Fernandez pela amizade, apoio, companheirismo, conselhos e amor dados durante toda nossa convivência. Muitos dos resultados foram graças ao apoio de vocês. Obrigada por formar parte de minha vida. Enxeram ela de amor, paciência e muita felicidade.

A Jacqueline Ortiz pela ajuda durante a coleta de material vegetal para a realização do trabalho, assim como pela amizade e carinho dados. Muito obrigada.

Aos demais colegas e amigos que tive o prazer de conhecer no transcurso destes dois anos dentro de PPGFAP. Obrigada pelos momentos de descontração e pelo companheirismo.

A Luiza, Isabel e Karem, pelos conselhos e a linda amizade que se formou durante esses dois anos de convivência.

A Ricardo Ferreira, por sempre estar disponível para ajudar quando necessário. Pessoa maravilhosa a quem tenho imenso carinho e respeito.

A Universidade Federal de Santa Catarina pelo ensino público gratuito e de qualidade.

A CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos, e ao CNPq pelos recursos financeiros que permitiram a realização de todo esse trabalho.

A todos que de alguma forma colaboraram para a concretização desse trabalho e cujos nomes não foram citados aqui.

*“Desapegue dos preconceitos e faça valer
cada momento desta bela viagem chamada
vida! ”*

RESUMO

O estudo da biologia reprodutiva e a conservação de sementes de espécies nativas ainda representam um desafio, já que os principais trabalhos são realizados com espécies exóticas e de importância agrônômica. A produção de sementes é uma importante etapa na vida vegetal, que se inicia com a embriogênese seguida pelo desenvolvimento dos tecidos nutritivos e de proteção. Este processo é complexo e altamente coordenado, o qual pode ser dividido em diferentes fases progressivas consistindo em: (1) embriogênese, (2) maturação do embrião e (3) dessecação, sendo esta última a fase em que as sementes atingem a maturação fisiológica. A compreensão destas fases é importante para o manejo da espécie permitindo por exemplo, determinar o melhor período em que as sementes apresentam a qualidade máxima de vigor e viabilidade. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o desenvolvimento e a formação das cipselas de *T. catharinensis* Cabrera incluindo parâmetros morfofisiológicos, perfil de proteínas e a análise de poliaminas. No capítulo 1, foram descritos a morfologia eo desenvolvimento do óvulo maduro e do ovário, a embriogênese ea organização morfológica e ultraestrutural da cipsela madura de *T. catharinensis* utilizando microscopia óptica e eletrônica. Foi observado que após a antese o ovário apresenta três regiões diferenciadas: epiderme externa com tricomas glandulares e tectores. Dentro do ovário, observou-se um óvulo maduro único onde foi observado o integumento, o endotélio ea zona periendotelial com células de paredes celulares espessos e com reação positiva do Azul de Toluidina (ATO) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). O saco embrionário é de tipo poligonal o qual apresenta a célula ovo, a célula central, três antípodas no polo da chalaza e duas sinérgidas no polo micropilar. O desenvolvimento completo do fruto de *T. catharinensis* ocorreu 21 DAP. Durante a embriogênese foi observado os estádios de desenvolvimento de pró-embrião, globular, coração, pré-cotiledonar e cotiledonar. Durante o desenvolvimento do embrião, o ovário sofre modificação formando o pericapo. O exocarpo (epiderme externa do ovário) é observado com uma única camada celular, o mesocarpo (mesofilo) e o endocarpo (epiderme interna) colapsaram durante o desenvolvimento. O tegumento da semente é formado pela epiderme externa do óvulo. No capítulo 2, foi

avaliado os aspectos fisiológicos durante a maturação, coleta e o armazenamento das cipselas de *T. catharinensis* mediante testes de vigor e viabilidade, da análise morfohistoquímica e bioquímica. Foram utilizadas neste trabalho sementes de *T. catharinensis* coletadas aderidas na inflorescência e dispersas no ambiente em dois anos distintos, 2014 e 2015. Os resultados obtidos mostraram que as sementes s apresentaram elevados valores de vigor e viabilidade nos eventos reprodutivos analisado. O teste de tetrazólio foi eficiente como indicador de viabilidade nas sementes de *T. catharinensis* corroborando com os dados do teste de germinação. Foi observado que as sementes aderidas já atingiram a maturidade fisiológica e podem ser coletadas antes da dispersão. Ainda identificamos que as sementes toleram o armazenamento a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ por um período de um ano sem perda do vigor e viabilidade. Em relação às análises bioquímicos foi observado a tolerância ao armazenamento está associada a proteínas de tolerância como as deidrininas e ao conteúdo de poliaminas especialmente a Putrescina (Put)

Palavras-chaves: Semente, Cipselas, Embriogênese, Vigor, Viabilidade, Proteínas, Poliamidas.

ABSTRACT

The study of reproductive biology and seed conservation of native species still represent a challenge, since the majority of studies is done with exotic species and of agronomic importance. Seed production is an important stage in plant life, starting with the embryogenesis followed by the development of nutrition and coat tissues. This process is complex and highly coordinated, which can be divided into different progressive stages consisting of: (1) embryogenesis, (2) embryo maturation and (3) desiccation, the latter being the phase in which the seeds reach the physiological maturity. The understanding of these phases is important to the management of the species, allowing, for example, to determine the best period in which the seeds present the maximum quality of vigor and viability. The objective of this work was to characterize the development and formation of *T. catharinensis* Cabrera cypselas including morphophysiological parameters, protein profile and polyamine analysis. In Chapter 1, the morphology and development of the mature ovule and ovary, the embryogenesis and the morphological and ultrastructural organization of the mature cypselas (seed) of *T. catharinensis* were described using optical and electron microscopy. It was observed that after the anthesis the ovary presents three differentiated regions: external epidermis with glandular trichomes and tectores. Within the ovary, a single mature ovule was observed where the integument, the endothelium and the periothelial zone were observed, with thick cell walls and with a positive reaction of TB-O and PAS. The embryonic sac is of polygonal type which presents the egg cell, the central cell, three antipodes at the pole of the chalaza and two synergates at the micropillar pole. The complete development of the *T. catharinensis* fruit occurred 21 DAP. During embryogenesis, the development of the stages pro-embryo, globular, heart, pre-cotyledonary and cotyledonary were observed. During the development of the embryo, the ovary undergoes modification forming the pericarp. The exocarp (external ovary epidermis) is observed with a single cell layer, the mesocarp (mesophyll) and the endocarp (internal epidermis) collapse during development. The integument of the seed is formed by the external epidermis of the ovule. In Chapter 2, the physiological aspects during maturation,

harvesting and storage of *T. catharinensis* cipselas (seeds) were evaluated through vigor and viability tests, morphohistochemical and biochemical analysis. Seeds of *T. catharinensis* were collected, adhered to the inflorescence and dispersed in the environment in two distinct years, 2014 and 2015. The results showed that the seeds had high values of vigor and viability in the reproductive events analyzed. The tetrazolium test was efficient as an indicator of viability in the seeds of *T. catharinensis* corroborating with the germination test data. It was observed that the adhered seeds already reached the physiological maturity and can be collected before dispersion. We further identified that seeds tolerate storage at $\pm 4^{\circ}\text{C}$ for a period of one year without loss of vigor and viability. In relation to the biochemical analyzes it was observed the tolerance to storage is associated to tolerance proteins like the dehydrins and to the content of polyamines especially Putrescin (Put).

Keywords: Seeds, Cypselae,

Semente, Cipselas, Embryogenesis, Vigor, Viabilite, Proteins, Polyamines.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1. External Morphology of the inflorescence and infructescence of *T. Catharinensis*. a. Inflorescence at anthesis. b. Inflorescence showed senescence of the structure of the florets. c. Infructescence at dispersion stage. d. Mature fruit (cypsela) showing bristles pappus. 39

Figure 2. Light microscopy analysis of the florets in *T. catharinensis* stained with TB-O (a,b,c,e,h,i), PAS (f,d) and CBB (g). a. Florets at anthesis showed the inferior ovary (ova), the ovule (ov) with short funicle, the micropilar region (mi) and the chalaza region (ch). In the upper part of the ovary, the pistil (pi), stamens (st) and the bristles (br). b. Details the cell that make up carpels(c), stamens (st), and insertion bristles (br).c. detail of the tector (tt), glandular (tg) trichomes and the schizogenous spaces (stars).d. Characteristic of the ovary regions, showed the outer epidermis (oe), mesophyll region (me) with the schizogenous spaces (stars) and the inner epidermis (ie). The ovule showed the outer epidermis (arrow), integument (in), periendothelial zone (pe), and podium (p). Into the ovary and ovule was observed interlayer space (double arrow). e. Characteristic of the ovary showed outer epidermis (oe), mesophyll region (me) and the inner epidermis (ie). The ovule showed the outer epidermis (arrow), integument (in), periendothelial zone (pe), and podium (p).f. Details of the cells of the endothelium (e), podium and periendothelial zone (pe).g. details the podium cells (p).h,i. Details of the endothelium cell (e), surrounded the embryo sac, containing the egg cell (ec), The synergids (s) and the antipodals cells (a). Bars: a-g 20 μm , h-i 40 μm 42

Figure 3. Light microscopy analysis of the fruits and seed development of *T. catharinensis* stained With TB-O (a-g,i) and double stained CBB+PAS (h). a. Pro-embryo (e) with 3-cells and surrounded nuclear endosperm (ed). Details the periendothelial zone (pe), endothelium ,integument cells (in). b. Pro-embryo (e) with 4-cells and the endosperm with 7-cells, endothelium with increment cell in the chalaza region and the periendothelial zone

(pe). c. Globular embryo (ge) stage with suspensor (s) in the chalaza regions. The endosperm (ed) with higher free nuclei. Desintegration of the periendothelial zone (pe). Endothelium (e) with cellular division in the chalaza pole. d. Heart embryo (he) stage. Endothelium (e) layer surrounded the embryo and remaining endosperm (ed) showing cellular dismantling. e-f. The precotyledonary embryo (pe) stage. Details the endothelium (e), periendothelial zone (pe) and endosperm (ed). Integument parenchyma (in) remains with the presence of vascular bundles (vb) and the outer epidermis increases the cellular volume (oe). Collapse of the middle region of the ovary (me). g-h. The cotyledonay embryo stage showed the reduce endosperm (en) two cotyledons (c), with cell isodiametric with evident nuclei (n), vacuoles (v) showed proteins storage (CBB positive) and the wall cell (wc) PAS positive. In the cotyledons cells showed bundle vascular (vb) in direction the shoot apical meristem (sam) and root apical meristem (ram), surrounded the embryo is observed the protoderme (e). i. Details the outer epidermis with elongate cells (oe), showed collapse cellular (star). Bars: a-c, h 20µm, d-g, i 80 µm45

Figure 4. Light Microscopy analysis of the mature cypsela (seed) of the *T. catharinensis* stained in TB-O (a) and double stained CBB+PAS (b-f). a. Details of the reduce endosperm (ed), exotesta with parenchyma in palisade cells (et) and exocarp with collapsed cell (ex). Apical region of the embryo showing the shoot apical meristem (sam), root apical meristem (ram), procambium (pc) and the root cap (star). c. Details the cell of the shoot apical meristem (sam) and procambium. d. Details of the cell the root apical meristem (ram), procambium and the root cap (star). e-g. Details of the cotyledons cells (c) showing the vascular bundle (vb) and vacuoles CBB positive showed proteins of reserve (v). Bars: a-b 90 µm c-f 20µm.47

Figure 5. Ultrastructural characterization of the embryo of *T. catharinensis* by TEM analysis. a. characteristic of the meristem cells with thin wall cell (wc), with plasmodesmata (p), one large central nucleus (n) with two nucleoli (nu), heterochromatin (he) and euchromatin (eu). Proteins bodies (pb) and lipid bodies (lb). b. Cotyledons cells showing one nucleus (n) with nucleoli (nu) and heterochromatin (he). Abundant Proteins bodies (pb), surrounded

for lipid bodies (lb). c. Details of ;proteins bodies (pb) with granular matrix cellular and lipid bodies (lb). d-f. Details of the vacuoles (v) engulfed vesicles and portions of cytoplasm. Endoplasmic reticle (re) associated a vacuoles, Mitochondria (m) and Golgi bodies (g). Bars: a 1µm, b 2µm, c-d 0,5µm, e-f 0,2µm..... 49

Figure 6. Resumo gráfico do capítulo 1. Linha de tempo com características mais ressaltantes do desenvolvimento para a formação da cipsela de *T. catharinensis*.....58

CAPÍTULO 2

Figura 1. Características gerais das Infrutescência de *T. catharinensis*. (a-c) infrutescência com frutos aderidos coletadas no ano-2015. (a) características externas das infrutescências. (b) corte longitudinal da infrutescência. (c) Característica da cipsela aderida na infrutescência. (d-f) infrutescência maduras prontas para dispersão coletadas no ano 2015. (d) características gerais da infrutescência. (e) características das cipselas ainda na infrutescência. (f) cipselas com a características morfológicas quando madura. (g-h) cipselas mostrando características após beneficiamento (Barras=1cm) 83

Figura 2. Porcentagem do grau de umidade de sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. Medias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey (P<0,05). Barras verticais representam ± desvio padrão das medias..... 84

Figura 3. a. embrião de *T. catharinensis* com reação positiva ao teste de tetrazólio. b. Porcentagem de reação positiva das sementes de *T. catharinensis* ao Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio ao 5% (teste de tetrazólio) em diferentes tempos de embebição indicando a viabilidade das sementes coletadas no período 2014-2015. (▲ Aderidas-2015: $Y=-0,125X^2+1,478571X+95,85714$; $R^2 =0,97$. ● Dispersas-2015: $Y= 0,742857X+91,61905$; $R^2 =0,85$. ■ Dispersas-2014: $Y= 1,617650104X+77,97273982$; $R^2 =0,87$). (Barras=5mm) 85

Figura 4. Variação da condutividade elétrica ($\mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$) nas sementes de *T. catharinensis* coletadas nos períodos 2014-2015 em função aos diferentes tempos de embebição. (▲ Aderidas-2015: $Y=-0,0222x^2 + 2,4713x + 85,454$; $R^2 = 0,9653$. ● Dispersas-2015: $Y= -0,0306x^2 + 3,5026x + 146,4$; $R^2 =0,9299$. ■ Dispersas-2014: $Y= -0,0498x^2 + 5,4562x + 316,15$; $R^2 =0,8812$)..... 86

Figura 5. Condutividade elétrica ($\mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$) após 72 horas de embebição em sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. Medias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($P<0,05$). Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias..... 86

Figura 6. Curva da dinâmica durante a embebição das sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015 em função ao incremento de massa ao longo do tempo. (▲ Aderidas-2015: $Y=-2,1 \times 10^{-6} X^3 + 0,001762X^2 + 178,5459$, $R^2 = 0,94$. ● Dispersas- 2015: $Y= 3,3 \times 10^{-12} X^3 + 1,41 \times 10^{-17} X^2 + 1,61 \times 10^{-38}$, $R^2 = 0,94$. ■ Dispersas-2014: $Y= 0,010115X^3 + 2,1X^2 + 3,5 \times 10^{-37}$, $R^2 = 0,96$ 87

Figura 7. Curva da dinâmica de germinação das sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. Aderidas-2015, Dispersas-2015,, Dispersas-2014. Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias. 88

Figura 8. Porcentagem de germinação de sementes de *T. catharinensis* coletadas no período de 2014-2015 aos 43 dias após semeadura a uma temperatura de 20°C. Medias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($P<0,05$). Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias. 89

Figura 9. Índice de velocidade de germinação de sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. Medias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($P<0,05$). Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias. 90

Figura 10. Morfometria (cm) das plântulas de *T. catharinensis* coletadas no período de 2014-2015. Após 43 dias de germiu Medias seguida pela mesma letra não diferem estatística

entre si pelo teste de tukey ($P < 0,05$). Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias. 91

Figura 11. Microscopia de luz dos cotilédones de embriões de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. (a,e) submetidos a coloração com ATO e (c-d) submetidos a histoquímicas com (CBB+PAS). (a) sementes de *T. catharinensis*. (b) células dos cotilédones do embrião das sementes aderidas-2015. (c) células dos cotilédones do embrião das sementes dispersas-2015. (d,e) Células dos cotilédones das sementes dispersas-2014 após armazenadas a $\pm 4^{\circ}\text{C}$. (C: cotilédones; Seta: parede celular, V: vacúolos, N: núcleo; PVS: vacuolos com conteúdo proteico) (Barras: (a) = 200 μm . (b-d)= 8 μm). 92

Figura 12. Concentração de proteínas totais e proteínas termoestáveis de *T. catharinensis*. Medias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($P < 0,05$). Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias. 93

Figura 13a. Perfil de proteínas dos embriões das sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. Corridos em Gel de SDS-page ao 17.5 % b. Detecção de proteínas deidrinadas de aproximadamente 25 KDa nas sementes dispersas-2015 utilizando um anticorpo específico para segmento K. Abrv.A-15: aderidas-2015, D-15: dispersas-2015, D-2014: dispersas-2014. 94

Figura 14. Conteúdo de poliaminas (PAs) livres nas sementes de *T. catharinensis* coletadas no período de 2014-2015. Put: putrescina, Spd: espermidina, Spm: spermina. Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias 95

Figura 15. Conteúdo da ração da poliaminas (PAs) totais de *T. catharinensis* coletadas nos períodos de 2014-2015. Abrev. Put: putrescina, Spd: espermidina, Spm: spermina. Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias. 95

Figura 16. Resumo gráfico do capítulo 2. Mostrando os principais resultados observados nos testes fisiológicos, anatômicos e bioquímicos nas cpselas de *T. catharinensis*. 103

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Figura 1. Resumo gráfico das conclusões e perspectivas do capítulo 1 e capítulo 2.....115

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	18
1.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2. Objetivos Específicos.....	30

CAPÍTULO 1

ANATOMICAL AND ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THE FLORETS STRUCTURE, CYPSELA (SEED) AND EMBRYO DEVELOPMENT OF THE THREATENED AND ENDEMIC SPECIE <i>Trichocline catharinensis</i> FROM BRAZIL.	31
ABSTRACT.....	32
ABBREVIATIONS.....	34
2.1. INTRODUCTION.....	35
2.2. MATERIAL AND METHODS	37
2.3. RESULTS.....	39
2.4. DISCUSSION	50
2.5. REFERENCES.....	61

CAPÍTULO 2

ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE SEMENTES DE <i>Trichocline catharinensis</i> CABRERA.	71
RESUMO.....	72
ABREVIACÕES.....	74
3.1. INTRODUÇÃO	75
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	77
3.3. RESULTADOS.....	82

3.4.	DISCUSSÃO	96
3.5.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	106
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	115

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1.1.1. Importância de *Trichocline catharinensis* (Cabrera)

A Asteraceae é uma das principais famílias de plantas com flores dentre as Angiospermas por apresentar o maior número de espécies descritas e aceitas até o momento. Estimativas mostram que apesar das 24.000 espécies já descritas, pode existir aproximadamente 30.000 distribuídas 1600 - 1700 gêneros (Funk et al., 2009). Devido a seu extraordinário poder de adaptação ambiental, essas espécies podem ser encontradas nos mais diversos habitats e em variadas condições climáticas, desde regiões tropicais, subtropicais até temperadas (Mondin, 2006). A grande distribuição deve-se principalmente à sua grande capacidade de dispersão devido à presença de sementes com pápus plumosos, apêndices e estruturas de aderência (Venable & Levin, 1983). A família conta atualmente com 12 subfamílias e 43 tribos reconhecidas (Funk et al., 2009), sendo a tribo Mutisieae a mais representativa, constituída por 43 gêneros e 500 espécies predominantemente sul-americanas com representantes na América Central, Ásia, África e Austrália (Katinas et al., 2008). A tribo passou por diversas mudanças em sua classificação, tendo como características predominantes sua corola bilabiada e anteras caudadas em forma de estilete (Cabrera, 1977). O gênero *Trichocline* é um dos representantes da tribo na América do sul. Caracterizam-se principalmente por apresentar cipselas truncadas no ápice, tricomas 2-4 seriados densamente agrupados ou esparsamente distribuídos (Cabrera, 1977; Pasini & Ritter, 2012).

O gênero compreende 22 espécies com distribuição desde o sul do Peru até a região central da Argentina e Chile (Katinas et al., 2008), com exceção de uma espécie disjunta ocorrente no oeste da Austrália (Zardini, 1975). No Brasil ocorrem oito espécies do gênero (Zardini, 1975; Mondin, 1996; Monge, 2012), em ambientes campestres, ou transicionais entre campo e floresta. Seis espécies do gênero foram registradas para a Região do Rio Grande do Sul (Pasini & Ritter, 2012).

Trichocline catharinensis (Cabrera) é conhecida como cravo-do-campo, espécie nativa, rústica e adaptada às condições ambientais do sul do Brasil, distribuída nos estados de Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As características

morfológicas da espécie, especialmente das flores, justificam seu potencial como planta ornamental, tornando-se uma planta de interesse econômico para a Região (Pasini & Ritter, 2012). A espécie também apresenta tolerância a pragas e doenças. Sugere-se que é possível a utilização dessa espécie no paisagismo, em bordaduras e forrações, devido à boa cobertura de solo e em decorrência do vigoroso crescimento foliar (Cardoso et al., 2007). É considerada uma espécie endêmica dos campos de altitude do sul do Brasil (Zaninet al., 2009; Buckup, 2010; Monge, 2012; Cabrera & Klein, 1973). As fitofisionomias vegetacionais que a espécie habita encontram-se atualmente ameaçadas, devido ao cultivo de espécies exóticas, prática de queimadas, presença intensiva de gado além da coleta de material *in situ* para fins medicinais (Zanin et al., 2009). Devido a este cenário atualmente esta espécie está classificada como espécie vulnerável de acordo à lista de espécies da flora ameaçada de extinção no estado do Rio Grande do Sul (2014).

1.1.2. Morfofisiologia do desenvolvimento de sementes

A morfologia e a dinâmica fisiológica das sementes são características importantes para compreender o padrão de distribuição sazonal e espacial das espécies (Imbert, 2002). Estas características também são importantes para o estabelecimento de condições de armazenamento eficiente, sem causar danos à qualidade fisiológica e ao sucesso da propagação da espécie (Scalon et al., 2012). De acordo com Nambara & Nonogaki (2012) os estudos que visam aprimorar conhecimentos sobre o desenvolvimento da semente e a sua composição química são passos essenciais para garantir o estabelecimento de estratégias de conservação de sementes. Ainda é importante considerar que a longevidade das sementes é determinada pelo seu potencial genético e fisiológico e qualquer deterioração ocorrida antes ou durante o armazenamento, bem como a interação com fatores ambientais podem reduzir a viabilidade e a conservação *ex situ* (Floriano, 2004; Walters et al., 2005). Também é importante conhecer às diferentes fases do desenvolvimento da semente, os mecanismos de dormência e germinação, bem como as proteínas acumuladas às quais fornecem informações valiosas sobre a bioquímica de tais processos (Nambara & Nonogaki, 2012).

Considerando o mencionado, estudos com a espécie *T. catharinensis* podem gerar dados inéditos e úteis da biologia do desenvolvimento das sementes desta espécie e seu comportamento, assim como o conhecimento dos estágios iniciais do desenvolvimento vegetal, permitindo estimar as influências dos fatores bióticos e abióticos envolvidos no processo da germinação (Baskin & Baskin, 1998). O estudo da fisiologia de sementes para esta espécie representa um desafio já que, pouco se conhece sobre os aspectos do desenvolvimento, maturação, longevidade, germinação, assim como a biologia reprodutiva.

1.1.3. Proteínas em sementes

O desenvolvimento da semente está marcado por eventos morfológicos e fisiológicos específicos, o qual está dividido convenientemente em três fases confluentes (Ferreira & Borguetti 2004). A primeira fase é caracterizada pelo crescimento inicial devido à divisão celular e a um aumento rápido no peso fresco da semente inteira e no conteúdo de água; a histodiferenciação e a morfogênese da semente acontecem à medida que o zigoto se submete a divisões mitóticas extensivas, e as células resultantes se diferenciam para dar forma ao plano básico do corpo do embrião. Simultaneamente, há a formação do endosperma (Castro et al. 2004; Bove et al. 2001; Ferreira & Borguetti 2004).

Depois disso há uma fase de maturação, na qual a semente aumenta de tamanho devido, principalmente, à expansão das células e à deposição de reservas (normalmente proteínas junto com lipídeos ou carboidratos) inicialmente nos tecidos de armazenamento (nos cotilédones, no endosperma). Durante essa fase, os vacúolos diminuem de tamanho à medida que os compostos de armazenamento se acumulam e o peso aumenta. Finalmente, o desenvolvimento da maioria das sementes termina com uma fase pré-programada da secagem de maturação ou dessecação, essas sementes são chamadas ortodoxas por que se submetem algum grau de secagem e aquelas que não passam por este processo são chamadas de recalcitrantes (Bove et al. 2001; Castro et al. 2004; Ferreira & Borguetti 2004). No caso das sementes ortodoxas este processo é seguido pelo acúmulo de água e reinício do metabolismo e conseqüentemente a germinação.

O desenvolvimento das sementes recalcitrantes difere das sementes ortodoxas por não apresentar a fase de desidratação

(Farrant et al.1988), ou seja, no ponto de maturidade fisiológica ocorre um declínio do teor de água das sementes, sendo, entretanto, não significativo quando comparado à fase de desidratação, propriamente dita, das sementes ortodoxas (Kikuti 2000). A ausência de tolerância à desidratação é uma desvantagem em termos de adaptação das sementes limitando a viabilidade em condições ambientais severas e em longos períodos de armazenamento.

No desenvolvimento fisiológico das sementes ortodoxas, durante a fase da desidratação, ocorre a redução gradual do metabolismo, tornando o embrião metabolicamente inativo ou quiescente (Kermode et al. 1989). Já em sementes recalcitrantes diferentes estratégias de armazenamento precisam ser adotadas visando conservação das sementes por maiores períodos, uma vez que estas não toleram a desidratação.

Deidrininas são uma classe de proteínas descritas como LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) e tem sido associada à aquisição de tolerância a dessecação em sementes em desenvolvimento (Bewley & Black, 1994). Estas proteínas são acumuladas ao longo do último estágio da maturação das sementes, quando o embrião adquire tolerância à dessecação ou quando ocorre algum déficit de água durante o ciclo de vida da planta. Tal fato sugere que elas atuem como proteínas protetoras quando ocorre alguma limitação na quantidade de água disponível nas sementes (Garay-Arroyo et al., 2000; Hoekstra et al., 2001). De acordo com Kermode (1997), a síntese de deidrininas faz parte do programa de desenvolvimento de sementes ortodoxas. Carjuza et al. (2008) estudaram diferentes deidrininas nas sementes ortodoxas de duas cultivares de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Os resultados das análises de Western Blot das proteínas revelaram muitas bandas de deidrininas (30, 32, 50 e 55 kDa, 28, 34, 38 e 40 kDa), dependendo do cultivar e local de cultivo. Neste mesmo trabalho, as análises de imunolocalização *in situ* detectaram a presença de deidrininas em ambos cultivares, em todos os tecidos de eixo e cotilédones, principalmente na membrana plasmática e corpos proteicos. Deidrininas também foram isoladas e purificadas em sementes de milho (Campbell et al., 1998), vigna (Ismail et al., 1999) e plântulas de aveia e milho (Close et al., 1989).

No entanto, deidrininas também foram localizadas em sementes recalcitrantes de *Araucaria angustifolia* (Farrant et al., 1996; Farias-Soares et al., 2013), e *Catanospermum australe*, uma

espécie tropical recalcitrante, quando esta foi cultivada em clima temperado (Farrant et al., 1996). Já em *Euterpe edulis* a recalcitrância das sementes foi associada à baixa síntese e acúmulo de deidrinhas (Panza et al., 2007). Estes estudos têm confirmado que as deidrinhas são acumuladas durante a dessecação das sementes e também em respostas ao déficit de água induzido pela seca, baixas temperaturas ou salinidade (Karlson et al., 2003a, 2003b). Para as sementes de *T. catharinensis* não há registro na literatura de estudos sobre a caracterização protéica das sementes, neste sentido o estudo detalhado do perfil de acúmulo de proteínas deidrinhas durante os estádios de desenvolvimento de sementes de *T. catharinensis* pode ajudar a elucidar os padrões para a determinação de classificação das sementes em recalcitrantes ou ortodoxas. Estas proteínas são fisiologicamente importantes para conhecer os processos dinâmicos de maturação de embriões zigóticos e das sementes. Estes estudos geram subsídios que podem ser empregados para aprimorar técnicas de uso e conservação desta espécie incluindo armazenamento e a tolerância à dessecação, uma característica conferida pelas deidrinhas.

1.1.4. Poliaminas

As poliaminas (PAs), Putrescina (Put), Spermidina (Spd) e Espermina (Spm) são pequenos compostos orgânicos (Hussain et al., 2011; Anwar et al., 2015) policatiônicos de baixo peso molecular os quais são encontrados em varios organismos vivos, incluindo as plantas. (Martin-Tanguy, 2001); sua natureza policatiônica facilita sua interação eletrostáticas com macromoléculas tais como DNA, RNA, fosfolipídios, assim como componentes da parede celular e proteínas (Wallace et al., 2003; Baron & Stasolla, 2008). As PAs são sintetizadas através da descarboxilação de aminoácidos. Os aminoácidos arginina e ornitina são precursores da putrescina. A espermidina é sintetizada a partir da putrescina e a espermina a partir de espermidina com S-adenosilmetionina na presença de spermina sintase (Kakkar et al., 2000; Urano et al., 2003; Podwyszynska et al., 2015).

As PAs podem ocorrer de forma livre (PAs solúveis), conjugadas a compostos de baixo peso molecular (PAs solúveis em ácido) ou ligadas a macromoléculas (PAs insolúveis em ácido) (Urano et al., 2003). Em plantas as PAs são encontradas principalmente em tecidos que crescem ativamente, sendo

consideradas reguladoras de crescimento que influenciam vários processos fisiológicos e de desenvolvimento (Kaur-Sawhney et al., 2003; Kosson & Prange 2005; Hussain et al., 2011; Anwar et al. 2015). Essas moléculas estão envolvidas na divisão celular, embriogênese somática, crescimento radicular, desenvolvimento de tubérculos, senescência e resposta das plantas à tolerância ao estresse abiótico e biótico (Podwyszyńska et al., 2015).

A função exata das poliaminas em plantas e sementes ainda permanece desconhecida (Podwyszyńska et al., 2015). Nas sementes as PAs são produzidas no embrião e desempenham papéis importantes durante o desenvolvimento e crescimento (Urano et al., 2005). Essas moléculas possuem papel na fase de maturação em resposta ao processo de tolerância a dessecação e na tolerância a elevada salinidade (Urano et al., 2005), atuando como sinais celulares com algumas vias hormonais, incluindo a regulação do ácido abscísico (ABA) durante as respostas de estresse abiótico (Alcázar et al., 2010).

1.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231:1237–1249

Anwar R, Mattoo AK, Handa AK (2015). Polyamine interactions with plant hormones: cross talk at several levels. In: Kusano T, Suzuki H (eds) *Polyamines: universal molecular nexus for growth, survival, and specialized metabolism*. Springer, Japan, pp 267–302

Baron K, Stasolla C (2008). The role of polyamines during in vivo and in vitro development. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 44:383–395

Baskin JM, Baskin C I (1998). *Seeds, ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. New York. Academic Press. 666p

Bewley JD, Black M (1994). *Seeds: physiology of development and germination*. 2.ed. New York: Plenum Press, 445p

Bove J, Jullien M, Grappin P (2001). Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* 3: 1-5

Buckup GB Org. (2010). *Biodiversidade dos campos de cima da serra*. 2. ed. Libretos: Porto Alegre, 196p

Cabrera AL, Klein RM (1973). *Compostas Tribo: Mutisieae*. 1. ed. Itajaí: P. Raulino Reitz. 124p

Cabrera AL (1977). *Mutisieae systematic review*. Pp. 1039–1066 in: Heywood VH, Harborne JB, Turner BL (eds). *The Biology and Chemistry of the Compositae*, vol. 2. Academic Press, London

Campbell SA, Crone DE, Ceccardi TL, Close TJ (1998). A ca. 40kDa Maize (*Zea mays* L.) embryo dehydrin is encoded by the Dhn2 locus on chromosome 9. *Plant Molecular Biology* 38 (3): 417-23

Cardoso RDL, Scheffer-Basso SM, Grando, MF (2007). Divergência genética em um conjunto de acessos de *Gerbera* e cravo-do-campo-catarinense. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre-RS 5(1):465-467

Carjuzaa P, Castellión M, Distéfano AJ, del Vas M, Maldonado S (2008). Detection and subcellular localization of dehydrin-like proteins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) embryos. *Protoplasma* 233: 149–156

Castro RD, Bradford KJ, Hilhorst HWM (2004). Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In *Germinação: do básico ao aplicado* (AG Ferreira & F Borghetti, orgs.). Porto Alegre, Artmed 51-67

Close TJ, Kortt AA, Chandler PMA (1989). cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol Biol.* 13:95-108

Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P (1988). Recalcitrance: a current assessment. *Seed Science and Technology*, Zurich 16:155-166

Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P, Farnsworth EJ, Vertucci, CW (1996). Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds maybe related to habitat. *Seed Science Research* 6: 175–182

Farias-Soares FL, Burrieza HP, Steiner N, Maldonado S, Guerra MP (2013). Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos *Protoplasma* 250(4):911-8

Ferreira AG, Borghetti F (2004). *Germinação do Básico ao Aplicado*. Porto Alegre: artmed p.251-252

Floriano E (2004). *Armazenamento de sementes florestais*. anorgs, Santa Rosa. 10 p

Hussain SS, Ali M, Ahmad M, Siddique KH (2011). Polyamines:natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnol Adv* 29:300–31

Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RJ (2009). *Systematics, Evolution and Biogeographics of Compositae*. IAPT, Vienna 965 pp

Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA, Highly (2000). Hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water déficit. *J Bio Chem* 275:5668-5674

Hoeksstra FA, Golovina EA, Buititink J (2001). Mechanisms of plant dessication tolerance. *Trends in plant science* 6 (94): 31-438

Hussain SS, Ali M, Ahmad M, Siddique KH (2011) Polyamines:natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance inplants. *Biotechnol Adv* 29:300–311

- Imbert E (2002). Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 5:13–36
- Ismail AM, Hall AE, Close TJ (1999). Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seed ling emergence of cowpea. *Plant Physiol* 120:237–244
- Kakkar RK, Nagar PK, Hhuja PS, Rai VK (2000). Polyamines and plant morphogenesis. *Biol Plantarum* 43:1–11
- Kaur-Sawhney R, Tiburcio AF, Altabella T, Galston AW (2003). Polyamines in plants: an overview. *J Cell Mol Biol* 2:1–12
- Karlson DT, Fujino T, Kimura S, Baba K, Itoh T, Ashworth EN (2003a). Novel Plasmodesmata association of dehydrin-like proteins in cold-acclimated red-osier dogwood (*Cornussericea*). *Tree Physiol* 23:759-767
- Karlson DT, Zeng Y, Stirm VE, Joly, RJ, Ashworth EN (2003). Photoperiodic regulation of a 24-kD dehydrin-like protein in cold acclimated red-osier dogwood (*Cornussericea*) in relation to freeze-tolerance. *Plant Cell Physiol.* 44:25-34
- Katinas L., Pruski JF, Sancho G, Telleria MC (2008). The subfamily Mutisioideae (*Asteraceae*). *Botanical Review* 74: 469–716
- Kermode AR, Oishi MY, Bewley JD (1989). Regulatory roles for desiccation and abscisic acid in seed development: a comparison of the evidence from whole seeds and isolated embryos. In: Stanwood PC, Mcdonald MB. *Seed moisture*. Madison: CSSA, p.23-50
- Kermode AR (1997). *Approches to elucidate the basics of desiccation-tolerance in seeds*. *Seeds Science Research*, Wallingford 7 (2):75-95
- Kikuti ALP (2000). *Aplicação de antioxidantes em sementes de cafeeiro visando à preservação da qualidade*. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras
- Kollöffel C, Geuns J, Lambrechts H (1992). Changes in free polyamine contents in Tulip bulbs cv. Apeldoorn during dry storage. *Acta Hort* 325:247–252
- Kosson R, Prange R (2005). The occurrence, physiological role and nutritive importance of polyamines in vegetables and fruits. *Veg Crops Res Bull* 65:5–24
- Rio grande do Sul (2014). Decreto nº 52.109, de 1º de dezembro de 2014. Espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul 3: 1-6

Martin-Tanguy J. (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* 34 (1): 135-148

Monge M (2012) *Trichocline*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB005516>>. Acesso em: 09 maio 2014

Mondin CA (1996). A tribo mutiseae Cass. (Asteraceae) sensu Cabrera, no Rio Grande do Sul e suas relações biogeográficas. Dissertação de mestrado em Bôtanica, Instituto de Biociências, universidade federal do Rio grande doSul. Porto alegre 162p.

Mondin CA (2006). Riquezas genéricas e dados biogeográficos das Asteraceae Brasileiras. In: os avanços da botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética: conferência plenárias e simpósios do 57º congresso nacional de botânica. Porto Alegre, Sociedade botânica do Brasil 1:209-2011

Nambara E, Nonogaki H (2012). Seed Biology in the 21st Century: Perspectives and New Directions. *Plant Cell Physiol* 53: 1-4

Panza V, Distéfano AJ, Carjuzaa P, Láinez V, del Vas M, Maldonado S (2007). Detection of dehydrin-like proteins in embryos and endosperm of mature *Euterpe edulis* seeds. *Protoplasma* 231:1-5

Pasini E, Ritter RM (2012). *Trichocline cisplatina* (Asteraceae, Mutisieae), a new species from southern Brazil and Uruguay. *Phytotaxa* 42:19-25

Podwyszyńska M, Kosson R, Treder J (2015). Polyamines and methyl jasmonate in bulb formation of in vitro propagated tulips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 123(3):591-605

Scalon SDPQ, Neves EMDS, Maseto TE, Pereira ZV (2012). Sensibilidade à Dessecação e ao Armazenamento em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. (Uvaia). *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal* 34: 269-276

Urano K., YoshibaY, Nanjo T, Igarashi Y, Seki M, Sekiguchi, F, Shinozaki K (2003). Characterization of Arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant, Cell & Environment*, 26(11): 1917-1926

Urano K, Hobo T, Shinozaki K (2005). Arabidopsis ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Lett* 579:1557–1564.

Venable DL, Levin DA (1983). Morphological dispersal structures in relation to growth habit in the Compositae. *Plant Systematic Evolution* 143:1-16

Walters C, Wheeler LM, Grotenhuis J (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research* 15:1–20

Wallace HM, Fraser AV, Hughes A (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 376:1–14

Zanin A, Longhi-Wagner HM, Souza MLDR, Rieper M (2009). Fitofisionomia das formações campestres dos Campos dos Padres, Santa Catarina, Brasil. *Insula, Florianópolis-SC* 38:42-57

Zardini EM (1975). Revisión del género *Trichocline* (Compositae). *Darwiniana* 19:61 8-733

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar os aspectos morfofisiológicos, perfil de proteínas e a análise de poliaminas durante o desenvolvimento de cipselas de *Trichocline catharinensis* Cabrera, visando gerar subsídios para o uso e conservação desta espécie.

2.2. Objetivos Específicos

Estudar e caracterizar os aspectos morfoanatômicos e ultraestruturais do óvulo e ovário maduro e do desenvolvimento das cipselas assim como da organização celular dos meristemas e cotilédones do embrião de *T. catharinensis*

Determinar o ponto de coleta e a tolerância a armazenamento das cipselas de *T. catharinensis* com base em análises fisiológicas de vigor e viabilidade e da caracterização anatômica e bioquímica

Esta dissertação foi organizada em dois capítulos os quais refletem cada um dos objetivos específicos estipulados.

CAPÍTULO 1

**ANATOMICAL AND ULTRASTRUCTURAL
ANALYSIS OF THE FLORETS STRUCTURE, CYPSELA
AND EMBRYO DEVELOPMENT OF THE
THREATENED AND ENDEMIC SPECIES *Trichocline
catharinensis* FROM BRAZIL.**

ABSTRACT

Trichocline catharinensis is one species of the basal tribe Mutisieae (Asteraceae) with showy and attractive inflorescences as a characteristic ornamental plant. This species is considered endemic to the Atlantic rainforest biome of South Brazil and due to antropic action was considered in vulnerable situation. In the present study, we documented the characteristics of the mature ovule, embryo development and the morphological events during fruit (cypsela) formation as well ultrastructural organization of *T. catharinensis* seed. *T. catharinensis* inflorescence was observed as a solitary capitulum with inferior, unilocular, syncarpous and bicarpelar ovary that present three differentiated regions: outer epidermis with glandular and tector trichomes, the middle region with presence of the schizogenous space and the inner epidermis. Inside the ovary, it was observed a single, anatropous, unitegmic and tenuinucellate mature ovule. In the integument, the mature ovule observed the endothelium and the periendothelial zone with thick cell walls and with TB-O and PAS positive reaction. The embryo sac is polygonum type and we observed the central cell, in the chalaza region three antipodals cells, and in the micropyle region two synergids and the egg cells. The cypsela development in *T. catharinensis* is complete in 21 DAP, starting with the first cell division of embryo followed by a series of developmental stages: pro-embryo, globular, heart, pre-cotyledonary and cotyledonary. During the development, the ovary suffers modification forming the pericarp. The exocarp (outer epidermis ovary) is observed with a single cell layer, and the mesocarp (mesophyll) and the endocarp (inner epidermis) collapsed during the development. The seed coat is formed by the ovule with exotesta (outer epidermis ovule) conformed by parenchyma in palisade cells (macrosclereids) with lignificated cell wall. The mesotesta (integument cells) and the endotesta (endothelium) collapsed by the increment in size of the embryo during the development. The nutritive tissue (periendothelial zone and endothelium) showed abundant liquefaction and degradation of the cells during the embryogenesis, which suggests that this structure is for embryo nutrition. *T. catharinensis* present proteins as reserve storage, which was confirmed in MET analysis of cotyledons, being observed abundant proteins bodies surrounded by lipid bodies. Additionally,

in the characterization of the meristem cells is observed a large central nucleus with distinguishing heterochromatin and euchromatin and two nucleoli. The cell wall with plasmodesmata and several lipid bodies associated to the plasmatic membrane. Abundant proteins bodies in the cytoplasm surrounded of lipids bodies.

Keywords: Ovary. Ovule. Embryogenesis. Meristem cells. Proteins bodies. Cypsela. Asteraceae.

ABBREVIATIONS

BR	Bristles
C	Carpels
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DAA	Day After Anthesis
ER	Endoplasmic reticulum
LB	Lipid Bodies
LM	Light Microscopy
OB	Oil Bodie
PAS	Periodic Acid-Schiff
PB	Proteins Bodie
PI	Pistil
RAS	Root Apical Meristem
SAM	Shoot Apical Meristem
ST	Stamens
TB-O	Toluidine Blue
TEM	Transmission electron microscopy

3.1. INTRODUCTION

In angiosperms, seeds production is an important step of plant life and the embryogenesis initiates with the double fertilization, followed by the development of a seed covering by a coat tissue (or testa) derived from the ovule wall (Radchuk and Borisjuk 2014). This is a complex process and highly coordinated, divided in different phases that occur in progression and regulated for genetic mechanism and physiological pathways in response to environmental signals (Jimenez-Lopez et al. 2015). The progressive phases comprise: i) embryogenesis, where the body plan is established from a single-celled zygote and posterior differentiation of the shoot meristem (SAM), root meristem (RAM), cotyledons and hypocotyl ii) embryo maturation phase, in which storage organs like the cotyledons expand concomitantly with the deposition of storage compounds; iii) desiccation phase, generally marks the cessation of reserve synthesis and gradual reduction in metabolism with repression of germination. In this phase seeds are physiologically mature and the embryo has become tolerant to desiccation (West and Harada, 1993; Goldberg et al. 1994; von Arnold 2002; Brocard-Gifford et al. 2003; Weigel and Jürgens 2002; Zhang and Laux 2011). However, the double fertilization in angiosperms leads not only to the commencement of embryogenesis, but also to the differentiation of the surrounding ovule integuments (Western 2012) and of the complex structure of the ovary (Dinneny and Yanofsky 2004). The ovule plays an essential role in the different types of reproduction of angiosperms (Endress 2011; Musial et al. 2013). Angiosperm ovules are diverse in their position in the ovary, nucellus thickness, number and thickness of integuments, degree and curvature direction, formation of micropyle, funiculus length, degree of vascularization and histological differentiation (e.g. hypostase, postament and endothecium) (Endress 2011). In Asteraceae family, the structure of the ovule is widely studied among few taxa, especially the histological differentiation of the perioothelial zone; which is an internal part of the integument behind the endothelium (Koltunow et al. 1998; Figueiredo et al. 2006; Kościńska-Pająk, 2006; Musiał et al. 2013; Kolczyk et al. 2014; Płachno et al. 2015; Kolczyk et al. 2016). The modification in this structure was differentiated by three types of the ovule for Kolczyk et al. (2014) “*Taraxacum*”,

“Galinsoga” and “Ratibida”. The periendothelial zone together with the endothelium was described with probably nutritional role of the mature embryo sac and embryo development (Koltunow et al. 1998; Musial and Kościńska-Pająk 2013; Kolczyk et al. 2014; Plachno et al. 2016a). Also, in Asteraceae family was observed the liquefying and degradation of the integument tissue of the ovule to form a cavity that does allow the growing of the embryo (Cooper and Brink 1949; Figueredo 2006; Julio and Oliveira 2009; Musial et al. 2013; Kolczyk et al. 2014; Frangiote-Pallone and Souza 2014; Batista 2015; Plachno et al. 2016a; kolczyck et al. 2016). Sometimes, in the angiosperms the structure of the ovule suffer changes in the coat including specializations to enable protection of the embryo (polymers such as lignin or suberinas) well as to facilitate dispersal and eventual germination (Western 2012). However, the outermost inner in some species of the Asteraceae family suffer thickening of the wall and it transformed itself into the testa (Frangiote-Pollone and Souza 2014; Batista et al. 2015).

Usually, the pericarp in angiosperm is derived from the ovary and during fruit maturation several changes in histology occur where the diverse function is granted mainly those described for the seed coat. The pericarp can be developed by a diversity of fruit morphologies, including those that facilitate dispersal and inhibit seed germination (Eriksson 2008; Eriksson et al. 2000). Depending on the species, the fruit can be dehisce or indehiscent and act as the dispersal unit (Cousens et al. 2010; Mamut et al 2014). The fruits dispersion can be promoted by bracteoles (Ungar and Khan 2001), pappus (Bartle et al. 2013), hooks (Sorensen 1986), spines (Gutterman 2002), mucilaginous layer (Huang 2000) and hairs (Seiwa et al. 2008). (Mamut et al 2014). The indehiscent fruit with cellular collapse of the ovary tissue is described for the family Asteraceae gives lightness during the dispersion. The pappus, trichome and hairs have also been reported in the Asteraceae family and are related with Anemocoric dispersion described for the family (Martins and Oliveira 2007; Julio and Oliveira 2009; Galastri and Oliveira 2010; Marzinek and Oliveira 2010; Frangiote-Pollone and Souza 2014).

Take in account that the use of native plant genetic resources should be a strategy to improve the specie and ecosystem conservation, studies of the reproductive events should provide some scientific basis for further works of seed conservation and crop of this endemic specie as well to understanding the Asteraceae

abundancy family. Embryological value on the ontogenesis of angiosperms is long admitted and embryological characters are well documented in botanical literatures for many others species of angiosperms and in Asteraceae is restricted for some members. To the best of our knowledge, no embryological investigations have been directed for tribe Mutiseiae and the studies on the embryology of this genus still very limited. In this sense, the present study was undertaken to fill up a part of the large gap in our knowledge of the embryology development in *T. catharinensis*. We documented the histological characteristics of the mature ovule and described the embryo development and the morphological events during this process until the formation of the mature cypsela (seed). Cellular organization as well as the accumulation of storage products of the mature embryo by ultrastructural analysis was also documented. This work pinpoints the key histological events during the cypsela (seed) development in order to provide information that can be used as a reference for future work of developmental biology and plant genetic conservation.

3.1. MATERIAL AND METHODS

3.1.1. Plant material

Inflorescences and infrutescences of *T. catharinensis* at different developmental stages were collected in November and December in two natural populations, located in Curitiba city (960 m altitude, 27 19.975 south latitude and 50 34. 033 west longitude) Santa Catarina State, Brazil. To the reproductive developmental analysis tagged inflorescences were collected after anthesis, as the initial point, until the mature fruit stage (0, 1, 3, 5, 7, 16 and 21 days after anthesis (DAA)). The samples were keeping at 25 °C for two days and then individualized and fixed to microscopy analysis.

3.1.2. Light microscopy (LM)

The whole floret and fruit from different stages of development was processed for LM and carried out according to Schmidt et al. (2009). The samples were fixed in phosphate buffer 0.1 M (pH 7.2) containing 2.5 % formaldehyde overnight at room

temperature for 12 h. Subsequently, the samples were dehydrated in an increasing series of ethanol aqueous solutions. Then, were infiltrated with Historesin (Leica Historesin, Heidelberg, Germany) semi-thin sections (3 μm thick). Morphological characteristics and to identify acid polysaccharides (Gordon and McCandless 1973), section were stained with toluidine blue (TB-O) 0.5 %, pH 3.0 (Merck Darmstadt, Germany). Some of the sections were treated with different histochemical techniques. Periodic acid-Schiff (PAS) was used to identify neutral polysaccharides (Gahan 1984) and Coomassie Brilliant Blue (CBB) 0.4 % in Clarke's solution (Serva, Heidelberg, Germany) to identify proteins (Gahan 1984; Schmidt et al. 2010). Moreover, some of the sections were double-stained with PAS + CBB (Schmidt et al. 2012). Controls consisted of sections treated with the solutions without the staining component (e.g., omission of periodic acid in the PAS reaction). LM sections were analyzed in the Olympus BX 41 microscope equipped with Image Q Capture Pro 5.1 Software (QImaging Corporation, Austin, TX, USA).

3.1.3. Transmission electron microscopy (TEM)

The procedure for preparing samples for TEM was as described earlier (Schmidt et al. 2009, Rogge-Renner et al. 2012). For the electron microscopy studies of the apical and radicle regions samples and cotyledons of the mature embryo stage (approximately 2 mm long) were fixed in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) containing 4 % formaldehyde and 2.5 % glutaraldehyde for 12 h. The material was post-fixed with 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 1 % osmium tetroxide for 4 h, dehydrated in an increasing series of acetone aqueous solutions, and then embedded in Spurr's resin (Spurr 1969). Ultra-thin sections (70 nm thick) were collected on grids and stained with aqueous uranyl acetate followed by lead citrate. Two grids were then examined in the JEM 1011 TEM (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at 80 kV.

3.2. RESULTS

3.2.1. Morphologic description of the florets

T. catharinensis inflorescence was observed as a solitary capitulum at the apex of the pedicel. In the anthesis was observed the ray florets with the single petal in the periphery of the inflorescence and the tubular florets gamopetalous in the middle region (Figure 1a). Upon anthesis, it was observed that the senescence process started with a gradual browning of the disk florets (Figure 1b). The dispersion stage was characterized by the infructescence with indehiscent mature fruit truncate at the base (Figure 1c). The pappus showed bristles whitish and plumose in upper part of obovate fruit (cypsela) (Figure 1d).

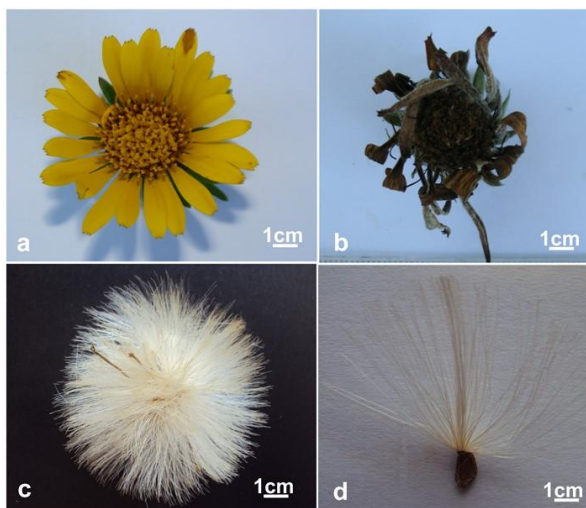


Figure 1. External Morphology of the inflorescence and infructescence of *T. Catharinensis*. **a.** Inflorescence at anthesis. **b.** Inflorescence showed senescence of the structure of the florets. **c.** Infructescence at dispersion stage. **d.** Mature fruit (cypsela) showing bristles pappus.

3.2.2. Characteristic the ovary, ovule and embryo sac mature

Florets of *T. catharinensis* showed an inferior (epigynous), unilocular, syncarpous, bicarpelar ovary with basal placentation. Inside of ovary tissue it was observed a single, asymmetric in the base, anatropous, unitegmic, tenuinucellated and slightly elongated mature ovule with short funiculus (Figure 2a). It was observed in the upper part of ovary from central position to the periphery pistils (pi), stamens (st) and the bristles (br) insertion (Figure 2a). Each bristle was composed by elongated cell, highly vacuolated with evident nuclei and with metachromatic reaction in the basal cell (Figure 2b). Next to the carpels insertion the cells were compacted and cubical shaped in the upper part (Figure 2b). The histological analysis revealed an ovary with three differentiated regions. The outer ovary epidermis was conformed by uniseriate and vacuolated cells which showed a thick cell wall with the presence of biseriated tector and glandular trichomes (Figure 2c,e). In the middle ovary region (mesophyll), it was observed a stratum of elongated cells and highly vacuolated what forming schizogenous spaces (Figure 2d,e). Finally, the inner ovary region showed the presence of uniseriated and elongated longitudinally cells (Figure 2d,e). The cells from inner epidermis and of the mesophyll layer showed PAS positive reaction indicate the presence of the neutral polysaccharides (Figure 2d). Adjacent to the inner layer of the ovary it was observed an outer epidermis of the ovule (integument). The integument was composed by the presence of uniseriated layer of elongated cells with dense cytoplasm and evident nuclei (Figure 2d,e). However was observed an inter layer space between the ovary and the ovule (Figure 2d). In the integument parenchyma, the cells are small with prominent nuclei (Figure 2e). The inner layer of the integument, adjacent the endothelium, is denominated periendothelial zone, composed of the cells arranged elongate longitudinally. The positive reaction of this cells to PAS and TB-O indicates the presence of insoluble polysaccharides neuters (Figure 2d) and polysaccharides acids (Figure 2e) respectively. This cells are wider in the chalaza region in comparison with the micropyla and the material deposited in this region is rich in water insoluble polysaccharides (PAS positive reaction) (Figure 2f). Inside the periendothelial zone, there is the especial differentiated arranged cells that are cubic, juxtaposed, with dense cytoplasm and evident

nuclei, the material deposited in these cells are rich in proteins (CBB positive reaction), which differ from the periendothelial cells (Figure 2g). The innermost layer of the integument forms the endothelium (integumental tapetum) and these cells are anticlinal elongated with thickened walls and evident nuclei (Figure 2 h,i). The mature embryo sac is polygonum type; it contains in the center the central cell in direction of the chalaza pole, where observed three antipodals cells (Figure 2h). In the micropyla pole was observed the egg apparatus which conforms for two synergids and the eggs cell (Figure 2i). The synergids in the pear shaped what they extend deeply into the micropyle with the filiform apparatus (Figure 2i).

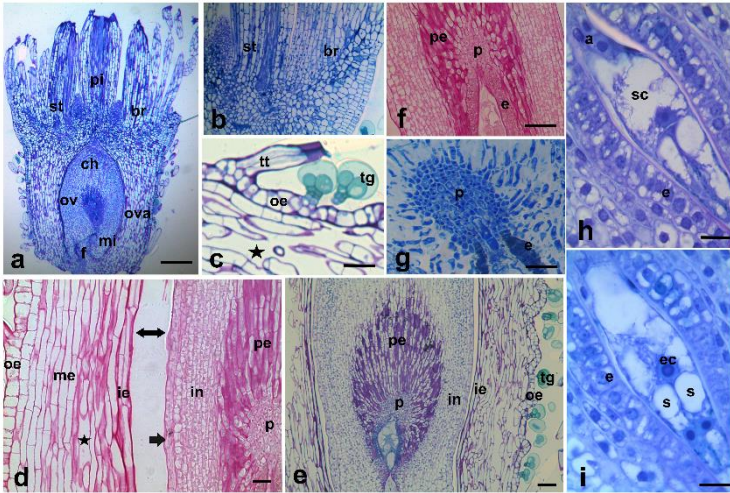


Figure 2. Light microscopy analysis of the florets in *T. catharinensis* stained with TB-O (**a,b,c,e,h,i**), PAS (**f,d**) and CBB (**g**). **a.** Florets at anthesis showed the inferior ovary (*ova*), the ovule (*ov*) with short funicle, the micropilar region (*mi*) and the chalaza region (*ch*). In the upper part of the ovary two carpels (*c*), the pistil (*pi*), stamens (*st*) and the bristles (*br*). **b.** Details the cell that make up carpels (*c*), stamens (*st*), and insertion bristles (*br*). **c.** detail of the tector (*tt*), glandular (*tg*) trichomes and the schizogenous spaces (*stars*). **d.** Characteristic of the ovary regions, showed the outer epidermis (*oe*), mesophyll region (*me*) with the schizogenous spaces (*stars*) and the inner epidermis (*ie*). The ovule showed the outer epidermis (*arrow*), integument (*in*), periendothelial zone (*pe*), and podium (*p*). Into the ovary and ovule was observed interlayer space (*double arrow*). **e.** Characteristic of the ovary showed outer epidermis (*oe*), mesophyll region (*me*) and the inner epidermis (*ie*). The ovule showed the outer epidermis (*arrow*), integument (*in*), periendothelial zone (*pe*), and podium (*p*). **f.** Details of the cells of the endothelium (*e*), podium and periendothelial zone (*pe*). **g.** details the podium cells (*p*). **h,i.** Details of the endothelium cell (*e*), surrounded the embryo sac, containing the egg cell (*ec*), The synergids (*s*) and the antipodals cells (*a*). Bars: a-g 20 μ m, h-i 40 μ m

3.2.3. Cypselas (seed) development and embryogenesis

The initiation of cypselas (seed) development in *T. catharinensis* was characterized by fecundation event, early embryogenesis stages and ovule tissue modification. The most significant event was observed in the innermost layer of the ovule, where occurs the differentiation of the endothelium cells adjacent to the periendothelial zone, in direction the chalaza (Figure 3a). In this moment, one day after anthesis (DAA), it was observed a pro-embryo with 3-cell; two apical and one elongated basal cell was identified (Figure 3a). Surrounded to the pro-embryo was observed the nuclear endosperm, with large vacuole and four nuclei; three in the micropyla region and one in the chalaza region (Figure 3a). After the division the apical cell, was observed the pro-embryo of 4-cells with evident and prominent nuclei (Figure 3b). In the endosperms was observed seven nuclei and also cellular division of endothelium in the chalaza region (Figure 3b). At 3 DAA, after multiples anticlinal and periclinal divisions, the number of cells increases to form the globular-shaped embryo. At this stage was observed the presence of protoderme, characterized by an outer layer cell with periclinal division (Figure 3c). It was observed the establishment of the radial symmetry the axis and the elongate suspensor cells fixed to the micropyla region (Figure 3c). In this phase the endosperm tissue showed a higher number of nuclei free with positive reaction to TB-O indicate the presence of acid polysaccharides (Figure 3c). This process was accompanied by beginning disintegration of the all periendothelial zone and endothelium layer, mainly in the micropyla pole (Figure 3c). However, the endothelium layer, in the chalaza pole, showed cellular division together with the embryo development (Figure 3c). Moreover in this phase, it was observed the interconnection between periendothelial zone and the upper part of endothelium layer by an opening in chalaza pole, where the periendothelial cells seem to dissipate (undergoes liquefaction) during embryo development (Figure 3c). After globular stage, at 5 DAA, was observed an embryo in the heart stage of development with the visivel differentiation the polar domains, apical and basal (shoot and root meristem) and the lateral domains with the initiation the differentiation of the cotyledons primordia (Figure 3d). In this embryo stage it was observed a consumption of all the tissue

adjacent to the embryo. The periendothelial zone, endothelium layer and remaining endosperm showed cellular dismantling, however with structural organization. It means that endothelium layer surrounded the embryo, like a delimitation cell layer and receives the periendothelial cells dissipated suggesting embryo nutrition (Figure 3d). The pre-cotyledonary embryo stage was identified at 7 DAA, with bilateral symmetry and differentiation of the protoderme, ground meristem and pro-cambium (Figure 3e). It was observed the initiation of cotyledons enlargement and hypocotyl region definition (Figure 3e). In this phase, similar to the heart stage the cells group around to the embryo remains like a nutrition source, however an interlayer space was observed between endothelium and ovary tissue (Figure 3e). Also, the integument parenchyma remains with the presence of vascular bundles and the outer epidermis increases the cellular volume with longitudinal shaped projection (Figure 3f). Moreover in this stage was observed cellular collapse in the middle ovary region (Figure 3f). Finally, in the last phases of embryo development, at 16 DAA; a cotyledonary embryo was observed (Figure 3g). At this stage the embryo consisted of a hypocotyl-radicle axis and two cotyledons; in the axis, the root apical meristem (RAM) and the shoot apical meristem (SAM) were distinguishable (Figure 3g). The protoderme delimited the peripheral region of the embryo and the cotyledons cells were vacuolated with one voluminous nucleus and evident nucleoli (Figure 3h). In response to double staining (CBB+PAS) was observed nuclei and in the cytoplasm of the cotyledon cells, showing the vacuoles, where Proteins Bodies (PBs) started to be distinguishable stained in blue. The wall cells of the cotyledonary embryo showed pink color, which also indicate the presence of neutral polysaccharides (Figure 3h). In this stage, it was observed that the nutritional tissue around of the embryo was reduced to the integument (parenchyma and outer epidermis ovule) with thickened of epidermis cell wall (Figure 3i).

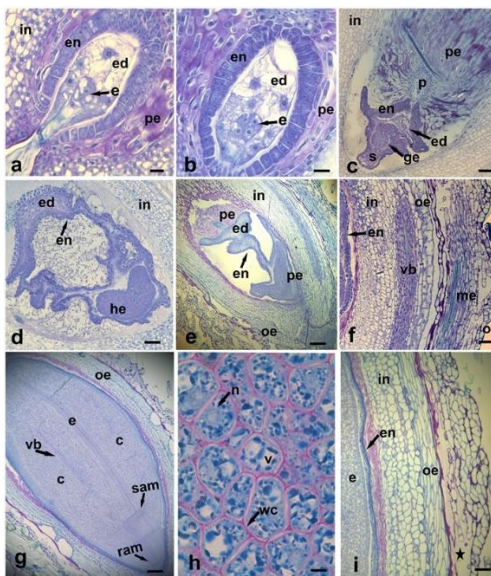


Figure 3. Light microscopy analysis of the fruits and seed development of *T. catharinensis* stained With TB-O (a-g,i) and double stained CBB+PAS (h). **a.** Pro-embryo (*e*) with 3-cells and surrounded nuclear endosperm (*ed*). Details the periothelial zone (*pe*), endothelium (*e*), integument cells (*in*). **b.** Pro-embryo (*em*) with 4-cells and the endosperm (*ed*) with 7-cells, endothelium with increment cell in the chalaza region and the periothelial zone (*pe*). **c.** Globular embryo (*em*) stage with suspensor (*su*) in the chalaza regions. The endosperm (*ed*) with higher free nuclei. Desintegration of the periothelial zone (*pe*). Endothelium (*e*) with cellular division in the chalaza pole. **d.** Heart embryo (*em*) stage. Endothelium (*e*) layer surrounded the embryo and remaining endosperm (*ed*) showing cellular dismantling. **e-f.** The pre-cotyledonary embryo (*em*) stage. Details the endothelium (*e*), periothelial zone (*pe*) and endosperm. (*ed*). Integument cell (*in*) remains with the presence of vascular bundles (*vb*) and the outer epidermis increases the cellular volume (*arrow*). Collapse of the middle region of the ovary (*me*). **g-h.** The cotyledonary embryo stage showed the reduce endosperm (*ed*) two cotyledons (*co*), with cell isodiametric with evident nuclei (*n*), vacuoles (*v*) showed proteins storage (CBB positive) and the wall cell (*wc*) PAS positive. In the cotyledons cells showed bundle vascular (*vb*) in direction the shoot apical meristem (*sam*) and root apical meristem (*ram*), surrounded the embryo is observed the protoderm (*pr*). **i.** Details the outer epidermis with elongate cells (*arrow*), showed collapse cellular (*star*). Bars: a-c,h 20 μ m, d-g,i 80 μ m

3.2.4. Mature cypsela (seed)

The light microscopy analysis showed that the mature fruit stage (cypsela) of *T. catharinensis* was clearly distinguishable from previous developmental stages wherein the structural characteristics of the ovary and the ovule changed completely. During the fruit development was observed that the pericarp develops from ovary regions. The outer epidermis of the ovary develops the exocarp as a single layer of the collapsed cells. Normally, the mesophyll ovary develops in mesocarp and the inner epidermis develops the endocarp. In *T. catharinensis* it was observed that both of them are absent because of cellular collapse (Figure 4a). It was observed that the seed coats develop from the integuments tissues of the ovule. The outer epidermis of the ovule develops the exotesta, with parenchyma in palisade cells (macrosclereids); with strong reaction to the TB-O indicate metachromatic reaction with phenol component from the cell wall lignification (Figure 4a). The integument cell develops the mesotesta, which together with the endothelial cells showed collapse cell (Figure 4a). The endosperm it reduces during the development being observed as one cell layer of ovoid shape with the thin wall (Figure 4a). The cell layers of the seed coat and the remnant of the exocarp maintained adnate among them (Figure 4a). Its events were observed at 21 DAA. In this moment the embryo reach the mature stage and showed morphological characteristic similar to the cotyledonary embryo stage. The major difference was observed in the cellular distribution of the meristematic cell (SAM, RAM) (Figure 4b). In reaction the double staining (CBB+PAS) both SAM and RAM showed isodiametric cells with granular cytoplasm and voluminous nuclei positioned in the central part of the cell (Figure 4c,d). The SAM and RAM cells had thin cell walls that stain with pink in reaction the PAS; indicating the presence of polysaccharides neutral while the cytoplasm showed positive reaction to CBB indicate the presence of proteins (Figure 4c,d). The pro-cambium tissue with elongate cell was observed between the SAM and RAM (Figure 4b,c). A root cap with isodiametric cells and nucleus with heterochromatin were identified in the RAM (Figure 4b,d). It was observed into the cotyledons abundant strand vascular bundle with elongated cells in direction the embryo axis (Figure 3g; 4e). In response the double

staining (CBB+PAS) the cytoplasm of the strand vascular bundle staining pink showed the presence of neutral polysaccharides and small vacuole stained in blue, indicate presence of proteins (Figure 4e,f). In the parenchyma cells of the cotyledons it was observed vacuoles with positive reaction to CBB indicate the presence of abundant protein reserves (Figure 4f).

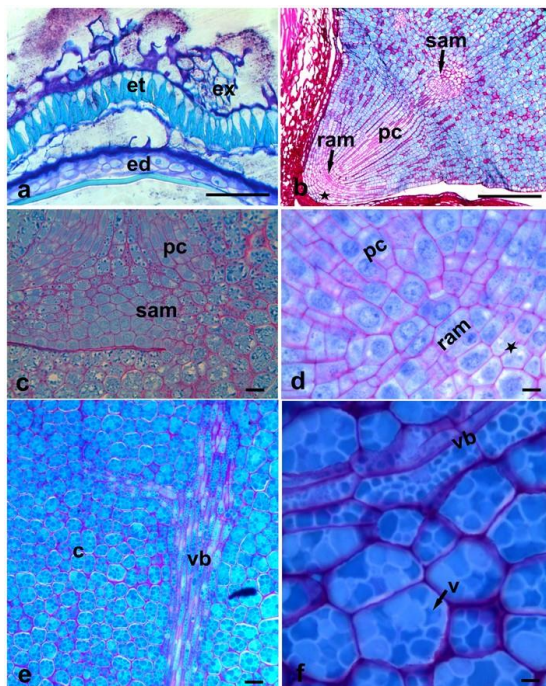


Figure 4. Light Microscopy analysis of the mature cypsela (seed) of the *T. catharinensis* stained in TB-O (a) and double stained CBB+PAS (b-f). **a.** Details of the reduce endosperm (*ed*), exotesta with parenchyma in palisade cells (*arrow*) and exocarp with collapsed cell (*ex*). Apical region of the embryo showing the shoot apical meristem (*sam*), root apical meristem (*ram*), procambium (*pc*) and the root cap (*star*). **c.** Details the cell of the shoot apical meristem (*sam*) and procambium. **d.** Details of the cell the root apical meristem (*ram*), procambium and the root cap (*star*). **e-g.** Details of the cotyledons cells (*co*) showing the vascular bundle (*vb*) and vacuoles CBB positive showed proteins of reserve (*v*). *Bars:* a-b 90 μ m c-f 20 μ m.

In the present work, TEM analysis of the meristem cells showed similar characteristics observed in LM a large central nucleus with distinguishing heterochromatin and euchromatin (Figure 5a). It was observed the presence of one or two nucleoli (Figure 5a). The cell wall was thin with presence of plasmodesmata (Figure 5a) and several lipid bodies (LB) were frequently observed in the periphery the membrane and surrounded of the protein body (PB) (Figure 5a). TEM analysis of cotyledons cells revealed a reduce and densely cytoplasmic with numerous PBs that consist of proteinaceous granular matrix electron-dense (Figure 5b,c). Surrounding the PBs and associated to the plasmatic membrane, were observed the LB showing small size compared with the much larger PB (Figure 5c,d). It was identified that the protein and lipid bodies occupy together a great proportion of cytoplasm cells (Figure 5b). Vacuoles with granular regions and electron-dense material, alternating with clearer areas was observed (Figure 5d,e). In some cells these vacuoles showed engulfed vesicles and portions of cytoplasm in a process apparently of autophagy (Figure 5d,e). The endoplasmic reticulum it showed itself associated with the membrane of the vacuole and the vesicles (Figure 5e,d,f). Mitochondria and Golgi body it was observed around the nucleus and adjacent to the wall cell (Figure 5d,e,f).

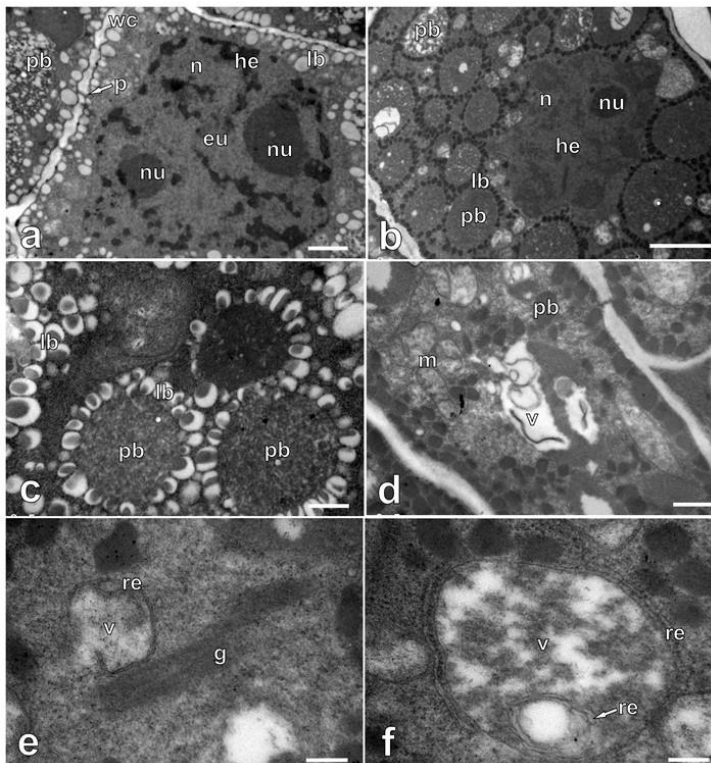


Figure 5. Ultrastructural characterization of the embryo of *T. catharinensis* by TEM analysis. **a.** characteristic of the meristem cells with thin wall cell (*wc*), with plasmodesmata (*p*), one large central nucleus (*n*) with two nucleoli (*nu*), heterochromatin (*he*) and euchromatin (*eu*). Proteins bodies (*pb*) and lipid bodies (*lb*). **b.** Cotyledons cells showing one nucleus (*n*) with nucleoli (*nu*) and heterochromatin (*he*). Abundant Proteins bodies (*pb*), surrounded for lipid bodies (*lb*). **c.** Details of ;proteins bodies (*pb*) with granular matrix cellular and lipid bodies (*lb*). **d-f.** Details of the vacuoles (*v*) engulfed vesicles and portions of cytoplasm. Endoplasmic reticle (*re*) associated a vacuoles, Mitochondria (*m*) and Golgi bodies (*g*). *Bars:* a 1 μ m, b 2 μ m, c-d 0,5 μ m, e-f 0,2 μ m

3.3. DISCUSSION

The present study described the morpho-hystological and ultrastructural characterization of the fruit (cypsela) development in *T. catharinensis* beginning with the mature ovary tissue, embryo development and mature seed. The ovarian characteristics in *T. catharinensis* with respect to position, carpel number and locules is typical as well described in several Asteraceae family members (Maheshwari and Srinivasan 1944; Cooper and Brink 1949; Ao 2007; Martins and Oliveira 2007; Julio and Oliveira 2009; Galastri and Oliveira 2010; Marzinek and Oliveira 2010; Musial et al. 2012; Musial et al. 2013; Frangiote-Pallone and Souza 2014; Batista et al. 2015; Franca et al. 2015; Janas et al. 2016; Kolczyk 2016). The morpho-hystological characterization allows us to identify an ovary with an inner and out epidermis and a mesophyll region with a stratum of elongated and highly vacuolated cells which form schizogenous spaces. In some Asteraceae as *Crepis japônica* (Frangiote-Pallone and Souza 2014), *Ageratum conyzoides*, *A. fastigiatum* (Franca et al. 2015), in species of Eupatorieae tribe (Marzinek and Oliveira 2010) and species of the genus Vernonia (Martins and Oliveira 2007; Galastri and Oliveira 2010) it was observed a mesophyll differentiated in two regions. Also, in *Bidens gardneri*, *B. pilosa* (Julio and Oliveira 2009), *Porophyllum ruderale* and *Tridax procumbens* (Frangiote-Pallone and Souza 2014) it was identified a mesophyll differentiated into three regions which is mainly due to the synthesis and accumulation of phytomelanin. According to these authors this substance was used as protection against sun exposure and predation. Despite to identify schizogenous spaces in *T. catharinensis* ovary, the phytomelanin in this study was not observed. The ovary regions differentiation has been reported as important features to characterization and differentiation taxonomic in Asteraceae (Marzinek and Oliveira 2010). Moreover, similarly to other species, in *T. catharinensis* it was observed a vascular system extending around the ovary in mesophyll region towards the micropyla region (Martins and Oliveira 2007; Marzinek and Oliveira 2010; Galastri and Oliveira 2010; Frangiote-Pallone and Souza 2014; Franca et al. 2015). In the present work, the outer epidermis ovary presents tector and glandular trichomes, both bisseriated and fully differentiated. These characteristics have been described by

Marzinek and Oliveira (2010) in the ovaries of six species of the Eupatorieae tribe, however in some *Vernonia* species at this stage ovary trichomes was not differentiated (Martins and Oliveira 2007; Galastri and Oliveira 2010). The presence of tector and trichomes as well the ribs was an important characteristics to Taxonomic studies (Franca et al. 2015), however the ribs was not observed in *T. catharinensis*.

The ovules are precursors of seeds and have an important role in apomictic and sexual reproduction in Asteraceae (Musial et al. 2013). However, it was reported that integument tissues, endothelium, micropyle characteristics, as well as the structures that make up the embryo sac in species from genera *Taraxacum* (Musial et al. 2013; Musial and Kóscińska-Pajak 2013; Plachno et al. 2015a,b), *Chondrilla* (Musial and Kóscińska-Pajak 2013) and *Cynara* (Jana and Mukherjee 2014) were independent of ploidy level or reproduction model. Thus, in *T. catharinensis* ovules tissue no evidences of apomictic reproduction it was observed and the differentiation of out epidermis, integument parenchyma as well the differentiation periendothelial zone and endothelium it was identify. These structures has been reported in other genera of Asteraceae family as *Taraxacum* (Musial et al. 2013; Musial and Kóscińska-Pajak 2013), *Solidago*, *Galinsoga*, *Ratibida* (Kolczyk et al. 2014), *Helianthus* (Gotelli et al. 2008) and *Cyanara* (Jana and Mukherjee 2014). The periendothelial zone was amply characterized as nutritive tissue with of mucilaginous thick cell walls, which is a common characteristic in Asteraceae species with high reproductive success (Plachno et al. 2015a). Considering periendothelial zone characteristics, Kolczyk et al. (2014) distinguished three ovules types “*Taraxacum*” type: with swollen cell walls of spongy structure; “*Galinsoga*” type, in which cells have more cytoplasm and thicker cell walls, and “*Ratibida*” type, in which consists of large highly vacuolated cells. According to this it was identify that *T. catharinensis* it was “*Taraxacum*” type, where the nutritive tissue is well developed and their cell walls have strongly swollen with mucilaginous structure (Musial and Kóscińska-Pajak 2013; Kolczyk et al. 2014; Plachno et al. 2015a). Also, in Asteraceae, it was reported that the periendothelial zone differentiation during development is related to the ovules maturation (Koltunow et al. 1998). In *T. catharinensis*, the periendothelial zone and the endothelium showed positive reaction to PAS, which indicates neutral polysaccharides deposition related

to the likely function of nourishment with probably nutritional role during embryo development (Koltunow et al. 1998). In the present work, it was observed that the mucilage was deposited on periendothelial zone and increases after fertilization, especially in chalaza region. According to recent studies, this increase is possibly for liquefying the periendothelial cells, which will apparently be used in the development of the embryo, since both processes start together (Musial et al. 2013; Musial and Kóscińska-Pajak 2013). Moreover, it was reported that the liquefaction process in cells from periendothelial zone can apparently be an additional source of nutrients for embryo development that may reduce the important role of the endosperm (Koltunow 1998; Musial and Kóscińska-Pajak 2013). Another probably nutritional way was associated with the endothelium once was reported that this tissue acts as an intermediary that metabolizes, accumulates and transports nutrients from the periendothelial zone to the embryo sac (Figueiredo et al. 2006; Chen et al. 2014). This finds leads us to suggest that in *T. catharinensis* the endothelium probably has similar function, once it was observed a layer of thick cell walls and dense cytoplasm between the periendothelial zone and embryo sac. According to Plachno et al. (2015b), the mucilage present in the periendothelial zone may facilitate the regulation of hydration during the early embryo development stages. These authors observed in the cytoplasm of the periendothelial zone cells, numerous organelles and profiles of rough endoplasmic reticulum, active Golgi, dictyosomes with vesicles and the presence of plasmodesmata. Thus, considering this, despite that we don't have ultrastructural analysis of this region, may in *T. catharinensis* this region have the same function, once a positive reaction to PAS and TB-O was observed.

Although fit with the characteristics *T. catharinensis* ovule presents a group of well-differentiated ovoid cells located in the distal end of the embryo sac which was named podium in *Cynara cardunculus* (Figueiredo et al. 2006). This structure consists of nucellar tissue, resistant to encroachment by the female gametophyte (Rudall 1997; Figueiredo et al. 2006). These authors not observed specific function for this structure. However, Kolckzyk et al. (2014) suggested that studies of ovule development in *Cynara* should help clarify the origin of this tissue once it is similar to the nutritive tissue of integument the other Asteraceae studied. Also, it was reported that the micropyle have a role in the

embryo sac nutrition which is full of extracellular matrix (Musial et al. 2013; Musial and Kóscińska-Pajak 2013, Kolczyck et al. 2014). Morpho-hystological characterization of micropyle in *T. catharinensis* allows us to identify similarities to those described for Asteraceae at early stages of embryo development. The mature embryo sac in *T. catharinensis* is Polygonum-type organization with an egg apparatus in the micropylar pole, three antipodals cells in the chalaza and large central cells. This type of sac embryo has been documented in other species of the Asteraceae family (Figueiredo et al 2006; Ao 2007; Deng et al. 2010; Plachno et al. 2013; Musial et al. 2013; Yurukova-Grancharova et al. 2013; Franca et al. 2015; Janas et al. 2016). After fertilization the layers cells of the integument suffer modification, differentiating in specialized cells that will protect the future mature embryo (Souza and Marcos-Filho 2001; Möise et al. 2005). In *T. catharinensis* was observed the degradation of the tissue of the periendothelial zone and integument cells forming a cavity in the ovule. Apparently, degradation of this tissue and the increasing of the cavity is a common feature within the Asteraceae as *Taraxacum* (Cooper and Brink 1949; Musial et al. 2013; Plachno et al. 2015a), *Solidago*, *Chondrilla*, *Ratibida* (Kolczyk et al. 2014), *Cynara* (Figueiredo 2006), *Opodurum* (kolczyck et al. 2016), species of Eupatorieae (Marzinek and Oliveira 2010), Vernonieae (Julio and Oliveira 2009), *P. ruderale*, *C. japonica*, *T. procumbens* (Frangiote-Pallone and Souza 2014). The degradation of these cells forms the space that is needed for the growing of the embryo (Plachno et al. 2015a). In *T. catharinensis* was observed that the periendothelial zone and integument cells degrade during the embryo develop while the endothelium increased the size. It was suggested that this process acting probably as a barrier preventing excessive growth of the embryo and endosperm (Weker 1997). These finds leads us to suggest that in *T. catharinensis* the endothelium probably has similar function during the development the embryo, once it was observed remnants the periendhotelial tissue and podium adhered the cells the distal region of the embryonic sac, until the precotyledonal stage of embryonic. The nutritional tissue (periendothelial zone and endothelium) in *T. catharinensis* dissipates during the last stage of the embryo development and the out epidermis of the integument showed elongated and thickening during the development. These characteristic also was reported for others members of Asteraceae family as *Hieracium* (Koltunow et

al. 1998), *Crepis japonica* (Frangiote-Pallone and Souza 2014), *Emilia sonchifoloi*, *Parthenium hysterophorus* (Batista 2015).

Plant embryo development can be divided into two main steps: embryogenesis *sensu stricto* and maturation of the embryo, followed by germination (Dodeman et al. 1997; Von Arnold et al. 2002). The embryogenesis *sensu stricto* is crucial as it is during this phase the three spatial domains are formed along the longitudinal axis: the apical domain composed of the cotyledons, shoot apex, and upper hypocotyl, the central domain including the majority of the hypocotyl and the basal domain consisting primarily of the root (West and Harada 1993; Von Arnold et al. 2002). During the embryogenesis *T. catharinensis* showed the pattern of differentiation similarly the *Arabidopsis thaliana* where the embryogenesis initiates with the first division of the zygote that generates from the smaller apical giving rise to the embryo and a larger basal cell suspensor (Yeung and Meinke 1993; Friml et al. 2003; Baud et al. 2008; De Smet et al. 2010; Zhang and Laux 2011; Radoeva and Weijers 2014). After the first cell division, *T. catharinensis* embryo showed a series of developmental stages: pró-embryo, globular, heart, pre-cotyledonary and cotyledonary. This pattern of development was also observed in *A. thaliana* where the plant embryogenesis was studied with details (Barton and Poethig 1993; Goldberg 1994; Jürgens 2001; Friml et al. 2003; Jenik et al. 2007) and others angiosperms species as *Mendicago truncatula* (Wang et al. 2012) and *Sedum acre* (Kozieradzka-kiskurno et al. 2011). This authors describe the histogenesis during the embryogenesis and the establishment of the main axis of polarity, with the shoot apical meristem (SAM) separated by hypocotyl from the root apical meristem (RAM) at the opposite pole at mature stage. Also, in the mature seed the embryo suffer expansion and maturation of the organs (Goldberg et al. 1994) as well the storage substances accumulation (Friml et al. 2003). Similar characteristics were observed in our histological results of the mature embryo of the *T. catharinensis*. Post-embryonically the SAM generates above ground tissues and organs (Nimchuk et al. 2015) and the RAM originates the primary root of the plant (Drisch and Stahl 2015). The RAM and the SAM show different structural organizations (Benfey and Scheres 2000), but both meristems act as discrete niche-like that contain stem cells (Nimchuk et al. 2015). The stem cells characterized by possessing pluripotent cells that have two principal functions: to produce new cells and to initiate

organ formation (Aichinger et al. 2012). According to Verdeil et al. (2007) the pluripotent cell showed characteristic structural differentiated the totipotent cell. The pluripotent cells are isodiametric, highly vacuolated and having a high nucleus/cytoplasm proportion (Yeung 1995; Verdeil et al. 2007). The nucleus is spherically shaped containing one or more nucleoli (Verdeil et al. 2007). In *T. catharinensis*, the section of the meristems cell that was stained with CBB+PAS showed evident nucleus that is confirmed in the TEM analyses, which showed big nuclei, abundant heterochromatin and two small nucleoli. Also, the cell wall in pluripotent meristematic stem cell is primary and thin with plasmodesmata connections (Verdeil et al. 2007). The pluripotent cell walls are conformed of polysaccharides and have key roles during the cell differentiation, intercellular communication and the regulation of the wall expansion during cell growth (Cosgrove 1993, 2005, 2015). The meristematic cells in *T. catharinensis* showed thin wall and positive reaction in PAS which confirmed the presence of polysaccharides neutral and confirm the main characteristics of pluripotent cells. TEM analysis allow us identify plasmodesmata connections between the cell walls. The main function of the plasmodesmata in the meristematic cells is the trafficking of intercellular nutrients and of signaling molecules including phytohormones (Nakajima and Benfey 2002; Haywood et al. 2002) and macromolecules (Haywood et al. 2002). In this work, the meristematic cell showed positive reaction in CBB and in TEM was observed the presence of proteins bodies and lipid bodies. The lipid bodies were observed surrounded the proteins bodies and in the periphery of the wall cell. The presence of lipids bodies in the wall meristem cells is suggested to be cellular protective during the process of seed desiccation (Wang et al. 2012). The presence of proteins bodies in *T. catharinensis* was related to storage products once in the mature stage the cotyledons become highly specialized and accumulate large amounts of storage proteins, carbohydrates and oils that will be mainly utilized as nitrogen or carbon source during seed germination and plant development (Goldberg et al. 1994; Müntz 1998; Zouhar et al. 2010; Kermode 2011; Tan-Wilson and Wilson 2012; Miquel et al. 2014). The storage reserve can be accumulated in compartmentalized structures in different organs such as endosperm, perisperm and cotyledons, or in the embryo (Maroder et al. 2003; Katavic et al. 2006; Martini et al. 2008; Moura et al.

2010; Crisafulli 2013; Kermode 2011). *T. catharinensis* showed high quantities of protein and lipids stored in the cotyledons. This was confirmed in staining in CBB+PAS and TEM analysis. The proteins bodies and lipids bodies have been reported in angiosperms and are widely studied in species of agronomic importance (Prego et al. 1998; Maroder et al. 2003; Katavic et al. 2006; Martini et al. 2008; Moura et al. 2010; Abirached-Darmency et al. 2012; Wang et al. 2012; Pavithra et al. 2013; Jimenez-Lopez et al. 2015). However, the information available about accumulation and characterization of storage reserves in the Asteraceae family is limited. The proteins bodies are stored in specialized vacuoles termed as protein bodies (PBs) (Baud et al. 2008) and the lipids bodies are stored in small spherical organelles termed oil bodies (OBs) (Katavic et al. 2006). The OBs are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) the exact mechanism of the biogenesis are not entirely understood (Murphy and Vance 1999; Robenek et al. 2004; Katavic et al. 2006). However, the synthesis and transport of the PBs is through of a complex system. The synthesis is in the endoplasmic reticulum (ER) (Herman and Larkins 1999; Müntz et al. 2001; Duarte 2005; Abirached-Darmency et al. 2012) and after formation the route of transport for the protein bodies may differ, can be transport via Golgi through dense vesicles, or sequestered into vacuoles by autophagy (Robbinson et al. 1998; Abirached-Darmency et al. 2012). This different type of transport are widely studied in different species (Hoh et al. 1995; Canhoto 1996; Prego et al. 1998; Abirached-Darmency et al. 2005; Katavic et al. 2006; Wang et al. 2012). In TEM analyses of *T. catharinensis* embryo we observed in the cotyledons, cell abundant ER as well as Golgi and vacuoles in apparently autophagy which suggested apparent transport of the PBs for two pathways. However, the relocation of storage proteins depends of the composition of newly proteins, species and the developmental stage (Müntz 1998; Abirached-Darmency et al. 2012). In Asteraceae family, the information available for protein body structure, synthesis and composition is quite limited. The composing of the matrix of the proteins bodies can be structurally different within the same cell; some protein bodies are simple and consist only of a proteinaceous matrix, whereas others have inclusions, such as globoids crystals, protein crystalloids or calcium oxalate crystals in the matrix (Lott 1981; Coimbra and Salema 1994). In *T. catharinensis* the cotyledon cells present

simple PBs with a granular proteinaceous composition of the matrix. In this work we observed in the cells of the cotyledons abundant PBs and LBs as well as absence of vacuoles and few organelles. Characteristics described by Moura et al (2010). These authors relate the absence of vacuoles and few organelles, except by the storage ones with the low metabolic state of the zygotic embryo and suggested an orthodox behavior of the seed at maturity. These characteristic confirmed the possible orthodox compartment of the seed of *T. catharinensis* when it reached maturity.

Finally, we identify that the *T. catharinensis* endosperm develops in two steps: a nuclear stage followed by a cellularization and differentiation stage. This type of development in the endosperm was report by others members Asteraceae family (Devi 1955; Pullaiah 1981). However, among the members of the family also there are reports of endosperm with nuclear (Devi 1957; Yurukova-Grancharova et al. 2006) and cellular development (Davis 1961; Marzinek and Oliveira 2010). During the *T. catharinensis* embryogenesis the endosperm is consumed and in the mature seed is observed as one layer cell and this characteristic was widely reported in the family (Marzinek 2008; Galastri and Oliveira 2010; Batista et al. 2015). The mature embryo presents specialized external tissues as seed coat (exotesta, endotesta and mesotesta) and pericarp (exocarp, mesocarp and endocarp) that protects the integrity of its parts and to transmit information regarding of the external environment. In many species its function is exercised solely by the seed coat (Souza and Marcos-Filho 2001; Radchuk et al. 2014). However in others species including of the members the family Asteraceae the dry seed is enclosed within a pericarp that can dehisces at fruit maturity, while in others the pericarp is indehiscent and the fruit is dispersal in the environmental (Cousens et al. 2010; Mamut et al. 2014). In the Angiosperms a myriad of fruit types can be recognized (Seymour et al. 2013). According to Marzinek et al. (2008), in Asteraceae the fruit can be called cypsela when is dry, indehiscent, unilocular with a single seed not adnate to the pericarp (linked only by the funicle) and was originated from an inferior ovary. Based on this description *T. catharinensis* fruit can be nominated as cypsela once present these characteristics. However, in *T. catharinensis* the pericarp showed collapsed cells by the process of development the embryo and dehydration of the seed. These characteristics are widely reported in the Asteraceae family (Martins and Oliveira

2007; Julio and Oliveira 2009; Marzinek and Oliveira 2010; Frangiote-Pallone and Souza 2014; Batista et al. 2015). The collapsing of these cells is considered a character of evolutionary importance in the family. The layers of collapsed cells give lightness to diaspore which facilitates and promotes the anemocoric dispersal (Martins and Oliveira 2007; Julio and Oliveira 2009; Galastri and Oliveira 2010; Marzinek and Oliveira 2010; Frangiote-Pollone and Souza 2014). Also, the seed coat in *T. catharinensis* is shaped by the exotesta of lignified cell wall (Macrosclerides) suggesting that it provide additional protection to the embryo (Frangiote-Pollone and Souza 2014; Batista et al. 2015).

In conclusion, based on morphological and cellular characteristics, our results allow us to describe, for the first time, the *T. catharinensis* ovule, ovary and seed development. Moreover, to the best of our knowledge, this is the first report showing anatomy data of specie within the Mutisieae tribe with basal position among the Asteraceae. The main results of our observation include: 1) characterization the collapsed of the ovary during the formation of pericarp and the thickening of the outer epidermis of the ovule for the formation of the exotesta of lignified wall cell. Characteristics considered of importance taxonomic for differentiation at nivel of tribe into the family Asteraceae. (2) Modification during the development in the nutritive tissue (periendothelial zone and endothelium) described which exclusive and mainly for species considered with high reproductive success and apomictic reproduction. The nutritive tissue is described amply in species of two tribes Chicorioideae and Asteroideae. However, for *T. catharinensis*, more studies of these structures with TM and immunohistochemistic are necessary. (3) Embryo development description and the characterization of pluripotency cell in the meristem of the mature embryo, as well as the description of the likely pattern PB formation and the distribution of OBs in the mature embryo cell. (4) Also it was characterized the mature and dispersion structures of this specie. Moreover, this study shows the cell biology and anatomy of seed development of this particular and basal Asteraceae and this could be useful to evolutionary studies in this area. Important aspects for future studies about the behavior of the seed regarding desiccation tolerance, storage, delimitation of characteristic recalcitrant or orthodox as well as the responses under a wide variety of environmental conditions. In

turn, the embryological features of *T. catharinensis* can be used to examine the evolutionary developmental of a suite of characters within the broader comparative context of the Asteraceae family. Finally, the work can be usefull for the studies of conservation of the species as well as in breeding programs for use as ornamental plant as well to promote the *ex situ* conservation of this native and endemic Asteraceae in Brazil.

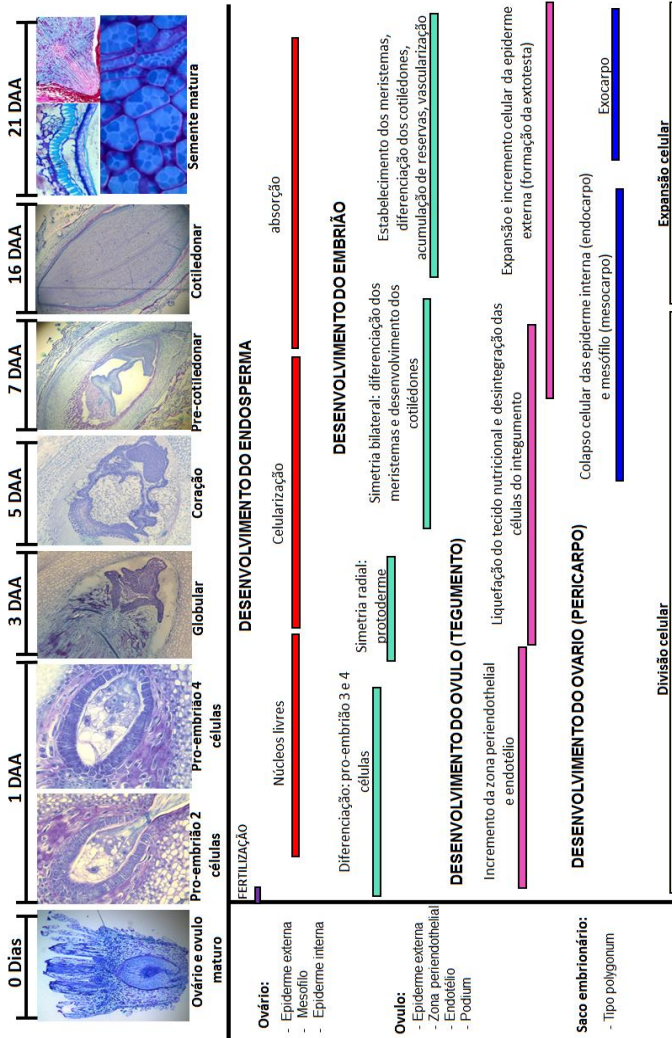


Figure 6. Resumo gráfico do capítulo 1. Linha de tempo com características mais ressaltantes do desenvolvimento para a formação da cipsela de *T. catherinensis*.

3.4. REFERENCES

Abirached-Darmency M, Abdel-Gawwad MR, Conejero G, Verdeil JL, Thompson R (2005). In situ expression of two storage protein genes in relation to histo-differentiation at mid-embryogenesis in *Medicago truncatula* and *Pisum sativum* seeds. *Journal of experimental botany* 56(418):2019-2028.

Abirached-Darmency M, Dessaint F, Benlicha E, Schneider C (2012). Biogenesis of protein bodies during vicilin accumulation in *Medicago truncatula* immature seeds. *BMC research notes* 5(1): 409

Aichinger E, Kornet N, Friedrich T, Laux T (2012). Plant stem cell niches. *Annual review of plant biology* 63: 615-636

Ao C. (2007). Comparative anatomy of bisexual and female florets, embryology in *Calendula officinalis* (Asteraceae), a naturalized horticultural plant. *Scientia Horticulturae* 114(3): 214-219

Bartle K, Moles AT, Bonser SP (2013). No evidence for rapid evolution of seed dispersal ability in range edge populations of the invasive species *Senecio madagascariensis*. *Austral Ecology* 38(8): 915-920

Batista MF, da Silva Santos L, Muller RH, de Souza LA (2015). Seed characters and their usefulness in the separation of Asteraceae species. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 37(4): 505

Barton MK, Poethig RS (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development* 119(3): 823-831

Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat, C, Lepiniec L (2008). Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*: metabolic and developmental control of seed filling. *The Arabidopsis Book*, e0113. doi: 10.1199/tab.0113

Brocard-Gifford IM, Lynch TJ, Finkelstein RR (2003). Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signaling. *Plant Physiology*, 131(1): 78-92.

Cabrera AL, Klein RM (1973). *Flora ilustrada catarinense: Compostas tribo Mutisieae*, by Reitz, PR. Itajai: Herbario 'Barbosa Rodrigues' 124p. Illustrations, dot maps

Canhoto JM, Mesquita JF, Cruz GS (1996). Ultrastructural changes in cotyledons of *pineapple guava* (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. *Annals of Botany* 78(4): 513-521

Coimbra S, Salema R (1994). *Amaranthus hypochondriacus*: seed structure and localization of seed reserves. *Annals of Botany* 74(4): 373-379

Cooper DC, Brink RA (1949) The endosperm-embryo relationship in the autonomous apomict, *Taraxacum officinale*. *Botanical Gazette* 111: 139-152

Cousens RD, Young KR, Tadayyon A (2010). The role of the persistent fruit wall in seed water regulation in *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *Ann Bot* 105:101-108

Cosgrove DJ (1993). Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth. *New Phytologist* 124: 1-23

Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 6:850-861

Cosgrove DJ (2015). Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. *Journal of experimental botany*, erv511

Chen BX, Shi CY, Huang JM, Wang, M, Liu JX (2014). Megasporogenesis, female gametophyte development and embryonic development of *Ambrosia* L. in China. *Plant systematics and evolution* 300(2): 197-208

Deng, Y, Chen S, Teng N, Chen F, Li F, Song A, Guan Z (2010). Flower morphologic anatomy and embryological characteristics in *Chrysanthemum multicaule* (Asteraceae). *Scientia horticulturae* 124(4): 500-505

Davis GL (1961). The life history of *Podolepis jaceoides* (Sims) Voss - II. Megasporogenesis, female gametophyte and embryogeny. *Phytomorphology* 11: 206-219

De Smet I, Lau S, Mayer U, Jürgens G. (2010). Embryogenesis—the humble beginnings of plant life. *The Plant Journal* 61(6): 959-970

Devi MH (1957). Embryological studies in Compositae III: *Gerbera jamesonii* Bolus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 46: 69-74

Dinneny JR., Yanofsky MF (2005). Drawing lines and borders: how the dehiscent fruit of *Arabidopsis* is patterned. *Bioessays* 27(1):42-49. doi.10.1002/bies.20165

Drisch RC, Stahl Y (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Frontiers in plant science*.

Dodeman, VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48: 1493–1509

Endress PK (2011) Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Ann Bot* 107:1465–1489

Eriksson O, Friis EM, Löfgren P (2000) Seed Size, fruit size, and dispersal systems in angiosperms from the Early Cretaceous to the Late Tertiary. *Am Nat* 156:47–58

Eriksson O (2008) Evolution of seed size and biotic seed dispersal in angiosperms: paleoecological and neoecological evidence. *Int J Plant Sci* 169:863–870

Figueiredo R, Duarte P, Pereira S, Pissarra J (2006) The embryo sac of *Cynara cardunculus*: ultrastructure of the development and localisation of the aspartic proteinase cardosin B. *Sex Plant Reprod* 19:93–101

Frangiote-Pallone S, de Souza LA (2014). Pappus and cypsela ontogeny in Asteraceae: structural considerations of the tribal category. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(1): 62-77

Franca RDO, De-Paula OC, Carmo-Oliveira R, Marzinek J (2015). Embryology of *Ageratum conyzoides* L. and *A. fastigiatum* RM King & H. Rob.(Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica*, 29(1): 08-15

Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of Arabidopsis. *Nature* 426: 147–153

Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Robinson H (2009) Classification of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy T, Bayer R (eds) *Systematics, evolution and biogeography of the Compositae*. IAPT, Vienna 171–189

Gahan PB (1984) *Plant histochemistry and cytochemistry: An introduction*. Academic, London

Galastri NA, Oliveira DMT (2010). Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Vernonia platensis* (Spreng.) Less. (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica* 24:73-83

Goldberg RB, Depaiva G & Yadegari R (1994) Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266: 605–614

Gotelli M, Galati B, Medan D (2008). Embryology of *Helianthus annuus* (Asteraceae). *Annales Botanici Fennici* 45: 81-96

Gordon EM, Mccandless EL (1973) Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stack. *Proc NS Inst Sci* 27:111–133

Gutterman Y (2002) Survival strategies of annual desert plants. Springer, Berlin Heidelberg New York

Herman EM, Larkins BA (1999). Protein storage bodies and vacuoles. *The Plant Cell* 11(4): 601-613.

Haywood V, Kragler F, Lucas WJ (2002). Plasmodesmata Pathways for Protein and Ribonucleo protein Signaling. *The Plant Cell* 14 (1): S303-S325.

Hoh B, Hinz G, Jeong BK, Robinson DG (1995). Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *Journal of Cell Science* 108(1):299-310

Huang ZY, Gutterman Y, Hu ZH (2000) Structure and function of mucilaginous achenes of *Artemisia monosperma* inhabiting the Negev Desert of Israel. *Isr J Plant Sci* 48:255–266

Janas A, Musiał K, Kościńska-Pająk M, Marciniuk P (2016). Insights into developmental processes in anthers, ovaries, and ovules of *Taraxacum belorussicum* (Asteraceae-Cichorioideae) using DIC optics. *Plant Systematics and Evolution*, 302(6): 617-628.

Jana BK, Mukherjee SK (2014). Diversity of cypselar features and their taxonomic significance in three species of the genus *Centaurea*, tribe Cardueae of Asteraceae. *Diversity and conservation of plants and traditional knowledge*, 233-240

Jimenez-Lopez JC, Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Alché JD, Rodríguez-García MI (2015). Biogenesis of protein bodies during legumin accumulation in developing olive (*Olea europaea* L.) seed. *Protoplasma*, 253(2): 517-530. DOI 10.1007/s00709-015-0830-5

Jenik PD, Gillmor CS, Lukowitz W (2007). Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23:207–36

Julio PGS, Oliveira DMT (2009). Morfoanatomia comparada e ontogênese do pericarpo de *Bidens gardneri* Baker e *B. pilosa* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Botânica* 32:109-116

Jürgens, G. (2001). Apical–basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis. *The EMBO journal* 20(14): 3609–3616

Katavic V, Agrawal GK, Hajdich M, Harris SL, Thelen JJ (2006). Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two *Brassica napus* cultivars. *Proteomics* 6(16):4586–4598.

Katinas L., Pruski JF, Sancho G, Telleria MC (2008). The subfamily Mutisioideae (Asteraceae). *Botanical Review* 74: 469–716

Kermode AR (2011). *Plant Storage Products* (carbohydrates, oils and proteins).

Koltunov AM, Johnson SD, Bicknell RA (1998) Sexual and apomictic development in *Hieracium*. *Sex Plant Reprod* 11:213–230

Kolczyk J, Stolarczyk P, Płachno BJ, (2016). Ovule structure of Scotch thistle *Onopordum acanthium* L. (Cynareae, Asteraceae). *Acta Biologica Cracoviensia, ser. Botanica* 58(1): 19–28.

Kolczyk J, Stolarczyk P, Płachno BJ (2014) Comparative anatomy of ovules in *Galinsoga*, *Solidago* and *Ratibida* (Asteraceae). *Acta Biol Cracov Ser Bot* 56(2):115–125

Kościńska-Pajak M (2006) Biologia rozmnażania apomiktycznych gatunków *Chondrilla juncea* L., *Chondrilla brevirostris* L. i *Taraxacum alatum* Lindb. z uwzględnieniem badań ultrastrukturalnych i immunocytochemicznych. *KonTekst, Kraków* 1–104

Kozieradzka-Kiszkurno M, Świerczyńska J, Bohdanowicz J (2011). Embryogenesis in *Sedum acre* L.: structural and immunocytochemical aspects of suspensor development. *Protoplasma* 248(4): 775–784.

Livramento G. Zoldan SR. (2006). Plantas nativas do planalto catarinense com potencial ornamental- resultados preliminares. Documento n°227. Epagri Florianópolis. 23p

Lott JN (1981). Protein bodies in seeds. *Nordic Journal of Botany* 1(3): 421–432.

Maheshwari P, Srinivasan R. (1944). A contribution to the embryology of *Rudbeckia bicolor* Nutt. *New Phytologist* 43: 135–142.

Mamut J, Tan DY, Baskin CC, Baskin JM (2014). Role of trichomes and pericarp in the seed biology of the desert annual

Lachnoloma lehmannii (Brassicaceae). Ecological research, 29(1): 33-44

Manning JC, Simka B, Boatwright JS, Magee AR (2016). A revised taxonomy of *Gerbera* sect. *Gerbera* (Asteraceae: Mutisieae). South African Journal of Botany, 104: 142-157

Maroder H, Prego I, Maldonado S (2003). Histochemical and ultrastructural studies on *Salix alba* and *S. matsudana* seeds. Trees 17(3), 193-199.

Martins MAG, Oliveira DMT (2007). Morfoanatomia comparada dos frutos em desenvolvimento de *Vernonia brevifolia* Less. e *V. herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae). Revista Brasileira de Botânica 30:99-110

Martini MH, Lenci CG, Figueira A, Tavares DDQ (2008). Localization of the cotyledon reserves of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T. cacao* L. Brazilian Journal of Botany 31(1): 147-154

Marzinek J, De-Paula OC, Oliveira DMT (2008). Cypsela or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. Brazilian Journal of Botany 31(3): 549-553

Marzinek, J. and D. M. T. Oliveira. (2010). Structure and ontogeny of the pericarp of six Eupatorieae (Asteraceae) with ecological and taxonomic considerations. Anais da Academia Brasileira de Ciências 82:279-291

Miquel M, Trigui G, d'Andréa S, Kelemen Z, Baud S, Berger A, Dubreucq B (2014). Specialization of oleosins in oil body dynamics during seed development in *Arabidopsis* seeds. Plant physiology 164(4): 1866-1878.

Moïse JA, Han S, Gudynaitė-Savitch L, Johnson DA, Miki BL (2005). Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41(5): 620-644.

Monge M, Pasini E (2015). Trichocline in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5516>> access in: 20 Jan. 2017

Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY (2010). Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). Scientia Agricola, 67(4): 399-407

Musiał K, Kościńska-Pająk M, Sliwiska E, Joachimiak AJ (2012). Developmental events in ovules of the ornamental plant *Rudbeckia bicolor* Nutt. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207(1):3-9

Musiał K, Płachno BJ, Świątek P, Marciniuk J (2013) Anatomy of ovary and ovule in dandelions (*Taraxacum*, Asteraceae). *Protoplasma* 250: 715–722

Musiał K, Kościńska-Pająk M. (2013). Ovules anatomy of selected apomictic taxa from Asteraceae family. *Modern Phytomorphology* 3: 35–38

Müntz K (1998). Deposition of storage proteins. In *Protein Trafficking in Plant Cells* Springer Netherlands. pp. 77-99

Müntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A, Tiedemann J (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany* 52(362): 1741-1752

Murphy DJ, Vance J (1999) Mechanisms of lipid body formation. *Trends in Biochem Sci* 24: 109–115

Nakajima JN, Loeuille B, Heiden G, Dematteis, M, Hattori EKO, Magenta MAG, Ritter MR, Mondin CA, Roque N, Ferreira SC, Borges RA, Soares PN, Almeida G, Schneider A, Sancho G, Saavedra MM, Liro, RM, Pereira ACM, Moraes MD, Silva GAR, Medeiros JD, Lorencini TS, Teles AM, Monge M, Siniscalchi CM, Souza-Buturi FO, Bringel JR JBA, Carneiro CR, Pasini E, Oliveira CT. Asteraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB55>>. Access in 20 Jan. 2016

Nakajima K, Benfey PN (2002). Signaling in and out: Control of cell division and differentiation in the shoot and root. *Plant Cell* 14 (suppl.): S265–S276

Nimchuk ZL, Zhou Y, Tarr PT, Peterson BA, Meyerowitz EM (2015). Plant stem cell maintenance by transcriptional cross-regulation of related receptor kinases. *Development* 142(6): 1043-1049.

Pasini E, Ritter MR (2012). *Trichocline cisplatina* (Asteraceae, Mutisieae), a new species from southern Brazil and Uruguay. *Phytotaxa*, 42 (1): 19-25

Pavithra HR, Sagar BC, Prasanna KT, Shivanna MB, Gowda B (2013). Localisation of Storage Reserves in Developing

Seeds of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre, a Potential Agroforestry Tree. Journal of the American Oil Chemists' Society 90(12): 1927-1935

Prego I, Maldonado S, Otegui M (1998). Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. Annals of Botany 82(4): 481-488

Płachno BJ, Musiał K, Świątek P, Tuleja M, Marciniuk J, Grabowska-Joachimczyk A (2013). Synergids and filiform apparatus in the sexual and apomictic dandelions from section Palustria (*Taraxacum*, Asteraceae). Protoplasma 251(1): 211-217.

Płachno BJ, Świątek P, Kozierdzka-Kiszkurno M, Majeský L, Marciniuk J, Stolarczyk P (2015a) Are obligatory apomicts invested in the pollen tube transmitting tissue? Comparison of the micropyle ultrastructure between sexual and apomictic dandelions (Asteraceae, Lactuceae). Protoplasma. doi:10.1007/s00709-015-0765-x

Płachno, BJ, Kurczyńska E, Świątek P (2015b). Integument cell differentiation in dandelions (*Taraxacum*, Asteraceae, Lactuceae) with special attention paid to plasmodesmata. Protoplasma, 253(5): 1365-1372

Pullaiah T (1981). Studies in the embryology of Heliantheae (Compositae). Plant Systematics and Evolution 137: 203-214

Radchuk V, Borisjuk L (2014). Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. Front. Plant Sci. 5:510. doi: 10.3389/fpls.2014.00510

Radoeva T, Weijers D (2014). A roadmap to embryo identity in plants. Trends in plant science, 19(11): 709-716.

Rio Grande do sul. (2014). Decreto n. ° 52.109, de 02 de dezembro de 2014. Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul

Robenek MJ, Severs NJ, Schlattmann K, Plenz G, Zimmer KP, Troyer D, Robenek, H. (2004) Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. FASEB J 18: 866-868

Rogge-Renner GD, Steiner N, Schmidt EC, Bouzon ZL, Farias FL, Guerra MP (2013). Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. Protoplasma 250(3): 731-739

Rudall PJ (1997). The nucellus and chalaza in monocotyledons: structure and systematics. Botanical Review 63: 140-184.

Schmidt EC, Scariot LA, Rover T, Bouzon ZL (2009) Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron* 40:860–869

Schmidt EC, dos Santos R, Horta PA (2010) Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron* 41:919–930

Schmidt EC, Pereira B, Santos R, Gouveia C, Costa GB, Faria GSM, Scherner F, Horta PA, Paula MR, Latini A, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL (2012) Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. *Aquat Bot* 100:8–17

Seiwa K, Tozawa M, Ueno N, Kimura M, Yamasaki M, Maruyama K (2008) Roles of cottony hairs in directed seed dispersal in *riparian willows*. *Plant Ecol* 198:27–35

Seymour GB, Østergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C (2013). Fruit development and ripening. *Annual review of plant biology* 64: 219-241

Sorensen AE (1986) Seed dispersal by adhesion. *Annu Rev Ecol Syst* 17:443–463

Souza FHD, Marcos-Filho J. (2001). The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Brazilian Journal of Botany* 24(4): 365-375.

Spurr AR (1969) A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26:31–43

Tan-Wilson AL, Wilson KA (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum* 145(1): 140-153.

Ungar IA, Khan MA (2001) Effect of bracteoles on seed germination and dispersal of two species of *Atriplex*. *Ann Bot* 87:233–239

Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *PCTOC* 69:233–249

Wang XD, Song Y, Sheahan MB, Garg M L, Rose RJ (2012). From embryo sac to oil and protein bodies: embryo development in the model legume *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 193(2): 327-338

Weigel D, Jürgens G (2002) Stem cells that make stems. *Nature* 415:751–754

Werker E (1997). Seed anatomy. Encyclopedia of plant anatomy. Berlin, Gebrüder Borntraeger.

West M, Harada JJ (1993). Embryogenesis in higher plants: an overview. *The Plant Cell* 5(10): 1361

Western TL (2012). The sticky tale of seed coat mucilages: production, genetics, and role in seed germination and dispersal. *Seed Science Research*, 22 (01): 1-25. doi: 10.1017/S0960258511000249

Yeung EC, Meinke DW (1993). Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. *The Plant Cell* 5(10): 1371

Yeung EC (1995) Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic, Netherlands, pp 205–247

Yurukova-Grancharova P, Robeva-Davidova P, Vladimirov V (2006). On the embryology and mode of reproduction of selected diploid species of *Hieracium* s.l. (Asteraceae) from Bulgaria. *Flora* 201: 668-675.

Verdeil JL, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci* 12(6):245–252

Zhang Z, Laux T (2011). The asymmetric division of the *Arabidopsis* zygote: from cell polarity to an embryo axis. *Sexual plant reproduction*, 24(2):161-169. DOI 10.1007/s00497-010-0160-x

Zanin A, Longhi-Wagner HM, Rieper M. (2009). Fitofisionomia das formações campestres do Campo dos Padres, Santa Catarina, Brasil. *INSULA Revista de Botânica* 38-42 doi: 10.5007/2178-4574.2009

Zouhar J, Muñoz A, Rojo E (2010) Functional specialization within the vacuolar sorting receptor family: VSR1, VSR3 and VSR4 sort vacuolar storage cargo in seeds and vegetative tissues. *Plant J* 64: 577–588

CAPÍTULO 2

ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE SEMENTES DE *Trichocline* *catharinensis* CABRERA.

RESUMO

O sucesso na conservação de sementes de espécies nativas está associado a estudos da fisiologia do desenvolvimento que incluem aspectos de coleta, viabilidade e armazenamento associados as modificações bioquímicas e celulares. O objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos fisiológicos durante a maturação, coleta e o armazenamento das cipselas (sementes) de *T. catharinensis* mediante testes de vigor e viabilidade, assim como análise morfohistoquímica e bioquímica. Foram utilizadas neste trabalho sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014 e 2015. Após beneficiamento foram realizados teste fisiológicos de vigor e viabilidade, como o grau de umidade, teste de tetrazólio, condutividade elétrica, assim como a curva de embebição para a determinação do padrão trifásico da germinação, teste de germinação e IVG. Para a caracterização das alterações histoquímica e estruturais das células embrionárias foram realizadas análises em microscopia de luz dos embriões. Para a caracterização bioquímica durante a maturação, coleta e armazenamentos se realizaram análises de proteínas totais e ensaios de SDS-PAGE e Western blot, assim como análises de poliaminas. Os resultados obtidos mostraram que as sementes nos eventos reprodutivos analisados apresentaram elevados valores de vigor e viabilidade. Foi observado que o teste de tetrazólio pode ser utilizado como indicador de viabilidade nas sementes de *T. catharinensis* o que foi corroborado com os dados do teste de germinação. As sementes aderidas-2015 já atingiram a maturidade fisiológica, podendo ser coletadas antes da dispersão no campo. Foi observado que as sementes toleram o armazenamento a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ por um período de um ano sem perda do vigor e viabilidade. Os maiores valores de vigor e viabilidade foram observados nas sementes dispersas-2015 quando alcançaram a maturidade fisiológica. Em relação aos análises bioquímicos foi observado a tolerância a dessecação a qual é adquirida em conjunto com o acúmulo de reservas proteicas. As sementes aderidas-2015 já apresentam proteínas de tolerância a dessecação as quais não apresentaram diferença significativa em relação as sementes dispersas 2014 e 2015. Foi imunolocalizada uma banda de desidrina de aproximadamente 25 KDa nas sementes maduras a qual esta relacionada a tolerância a dessecação. Nos análises das poliaminas foi observado que a Put apresento os maiores valores

em nas sementes dispersas-2014 a qual pode estar associada no processo de tolerância a armazenamento em sementes de *T. catharinensis*.

Palavras chaves: Asteraceae, semente, vigor, viabilidade, proteínas, poliaminas.

ABREVIACÕES.

ATO	Azul de Toluidina
BOD	Demanda Bioquimica de oxignio
CBB	Azul Brillhante de Coomasie
DAS	Dias Após Semeadura
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IVG	Indice de Velocidade de Germinao
LEA	Late Embryogenesis Abundant
MF	Massa seca
NaClO	Hipoclorito de sódio
PAs	Poliaminas
PAS	cido Periódico de Schiff
PST	Proteínas Solúveis Totais
Put	Putrescina
Spd	Espermidina
Spm	Espermina

4.1. INTRODUÇÃO

Trichocline catharinensis é um membro da família Asteraceae a qual é uma das maiores famílias dentro das angiospermas com cerca de 24, 000 espécies, representando aproximadamente entre 8% a 12% do total das angiospermas conhecidas no mundo (Funk et al. 2009; Fagundes et al. 2015). No Brasil, é considerada uma das famílias mais diversificadas e endêmicas (Nakajima et al. 2016) com 287 gêneros e 2,083 espécies atualmente reconhecidas, destas 1,313 são consideradas endêmicas (Nakajima et al. 2015). A alta diversidade da família no Brasil é observada principalmente dentro dos domínios fitogeográficos do Cerrado e Mata Atlântica (Nakajima et al. 2016). A Mata Atlântica atualmente é considerada uns dos hotspot mais importantes do mundo, assim como uns dos mais ameaçados de extinção por ações antrópicas e mudanças climáticas (Mittermeier et al. 2004; Forza et al. 2010).

T. catharinensis se caracteriza por possuir inflorescência em forma de capítulo, com corolas vistosas que variam de amarelo a amarelo-laranja (Katinas et al. 2008; Pasini & Ritter 2012). Considerada uma espécie nativa e endêmica dos campos de altitude do sul do Brasil onde se encontra classificada na categoria de vulnerável (VU) (Rio Grande do Sul 2014). As características morfológicas apresentadas por *T. catharinensis* são semelhantes a espécies do gênero *Gerbera* as quais são amplamente cultivadas comercialmente como planta ornamental devido a seu capítulo que apresenta uma grande variedade de cores (Chung et al. 2005). *Gerbera* e *Trichocline* são gêneros próximos, ambos membros da tribo Mustiseiae (Cardoso et al. 2007). *T. catharinensis* é uma espécie com potencial ornamental o qual deve-se as características dos capítulos que são vistosos e atraentes assim como o formato das folhas e a arquitetura da planta. Semelhante ao descrito para *T. plicata* na Argentina (Livramento 2011), estas características possibilitam o uso de *T. catharinensis* no paisagismo incluindo jardins rochosos, bordaduras e forrações, pois apresenta uma boa cobertura de solo. Adicionalmente esta espécie tem sido considerada de grande importância nos processos de recuperação de áreas degradadas, pois contribui na reestabilização da flora local, por meio de sucessão ecológica (Heiden et al. 2007; Fagundes et al. 2015).

O estudo da biologia reprodutiva e a conservação de sementes de espécies nativas ainda é um desafio, principalmente para a determinação da melhor época de coleta nas quais as sementes apresentam a qualidade máxima de vigor e viabilidade (Hay & Probert 2013). Para estas espécies os estudos de fisiologia de sementes são escassos já que em grande maioria são focados em espécies exóticas cultivadas e suas características após-coleta. No entanto, o estudo da fisiologia do desenvolvimento das sementes é importante por que inclui aspectos que refletem diretamente na etapa de coleta, viabilidade e armazenamento das sementes. Durante a maturação, ao final do desenvolvimento as sementes acumulam reservas que serão utilizadas durante a germinação (Müntz et al. 2001). As principais reservas encontradas nas sementes são proteínas, carboidratos e lipídios (Gallardo et al. 2003, 2007; Bewley et al 2013). As sementes ortodoxas nesta fase além das reservas acumulam proteínas específicas altamente relacionada à tolerância a dessecação, permitindo manter organizadas os componentes das membranas celulares em baixos teores de água (Vertucci & Farrant 1995; Hoeskstra et al. 2001; Kermode et al. 2002; Kalemba et al. 2009). Em sementes sensíveis à dessecação (recalcitrantes), estas proteínas não são acumuladas ou são acumuladas em baixas proporções, porém observa-se desorganização das membranas celulares após secagem (Kalemba et al. 2009), com a perda de elevadas quantias de eletrólitos quando reidratadas (Sun & Leopold 1993; Kalemba et al. 2009). Além das proteínas as poliaminas (PAs), desempenham um papel importante na fase de maturação aumentando a resposta a tolerância a estresse bióticos e abióticos em sementes maduras (Urano et al. 2005). Contudo a função exata das PAs na resposta ao stress especialmente em sementes ainda precisa ser melhor elucidada (Podwyszynska et al. 2015).

Após a maturação fisiológica, durante a germinação a semente precisa absorver água para iniciar uma série de processos metabólicos complexos (Bewley et al. 2013). A etapa de absorção de água é trifásica, incluindo um rápido período inicial (fase I), seguido por uma fase de latência com uma pequena captação de água (fase II) e um aumento adicional no teor de água (fase III) coincidente com protrusão da radícula e crescimento de plântulas (Bewley et al. 2013). Os processos metabólicos envolvidos na germinação são intrinsicamente influenciados pela qualidade fisiológica das sementes bem como por fatores ambientais, entre

eles a luz, temperatura, umidade e gases atmosféricos (Mayer et al. 1982; Bewley et al. 2013). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi determinar o ponto de coleta se a tolerância a armazenamento das cipselas (sementes) de *T. catharinensis* com base em análises fisiológicas de vigor e viabilidade e da caracterização anatomica e bioquímica.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal

As inflorescências e infrutescência de *T. catharinensis* foram coletadas em duas populações naturais localizadas no município de Curitibanos (altitude de 960 m; 27 19.975 latitudes sul e 50 34.033 longitudes oeste), Santa Catarina, Brasil. A coleta foi realizada nos meses de novembro e dezembro do ano 2014 e 2015. As sementes foram coletadas aleatoriamente em plantas matrizes em cada uma das populações. As plantas foram identificadas por um Taxonomista (Dr. Pedro Fiaschi) e incluídas no herbário Flor da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número 19873. *T. catharinensis* apresenta frutos indeiscentes, secos e uniloculares denominados cipselas (Marzinek et al. 2008) e neste trabalho utilizaram-se o termo sementes como sinônimo de cipselas. Foram coletadas infrutescências de aproximadamente 10 DAP (dias após antese) que apresentavam capítulos fechados e aderidos a planta matriz bem como frutos em fase de dispersão. Para estes dois estádios, as amostras foram denominadas sementes aderidas e dispersas, respectivamente. As sementes dispersas coletadas em 2014 foram armazenadas a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ durante um ano.

Após coleta, para a etapa de beneficiamento as sementes dispersas das duas populações permaneceram por aproximadamente 7 dias a temperatura ambiente e foram individualizadas manualmente. Foram excluídas as sementes que eram macroscopicamente murchas ou predadas por outro organismo. As sementes entumescidas e aparentemente não danificadas tiveram o papus removido com auxílio de tesoura (Ferreira et al. 2001; Ortiz 2013) e posteriormente foram submetidas aos testes de vigor e viabilidade. Para as análises proteínas e poliaminas foi removido o tegumento externo das

sementes e os embriões foram individualizados e armazenados em freezer - 80 °C para posterior análise.

4.2.2. Grau de umidade

O grau de umidade foi determinado utilizando-se o método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, durante 24 horas, com seis repetições de 25 sementes para cada coleção (Brasil 2009). As amostras foram pesadas inicialmente e após o período de 24 hrs.

4.2.3. Teste de tetrazólio

Para o teste do tetrazólio, quatro repetições de 25 sementes foram embebidas em água destilada por diferentes períodos (0, 2, 4, 6, 8, 10 horas). Em seguida, para cada um dos tempos de embebição, o embrião foi separado do tegumento da semente com um estilete, e imerso em solução de Cloreto 2,3,5-Trifenil tetrazólio 1% a 30°C por uma hora (Brasil 2009). Os embriões foram classificados como viáveis ou não viáveis de acordo com a cor dos tecidos, extensão dos danos e localização da coloração.

4.2.4. Condutividade elétrica

O teste de condutividade elétrica de massa foi realizado com seis repetições de 25 sementes. Estas foram pesadas e colocadas para embeber em copos plásticos, contendo 25 mL de água deionizada e mantidas em BOD, a 20°C , por diferentes períodos de embebição (2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72 horas). Após cada período de embebição foi avaliada a condutividade elétrica com o auxílio do condutivímetro SensorData™ SD201. Os valores de condutividade foram expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

4.2.5. Curva de embebição

A curva foi realizada utilizando-se oito repetições de 25 sementes as quais foram pesadas e colocadas em caixas gerbox que continham papel de germinação saturados com água destilada esterilizada. As caixas foram colocadas em câmaras de germinação do tipo BOD com lâmpadas fluorescentes com $25,5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradiância. A temperatura utilizada foi de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e o fotoperíodo

de 10 horas (Ferreira et al. 2001). Para a determinação do incremento de massa se realizou a metodologia proposta por (Justo et al. 2007; Davide et al 2011) com modificações para a espécie. As amostras foram pesadas de uma hora durante 12 horas e após esse período foram pesadas a cada 6 horas até as 24 horas. Na continuidade foram pesadas a cada 12 horas durante 10 dias e a cada 24 horas até a germinação de 51% das sementes.

4.2.6. Germinação e índice de velocidade de germinação (IVG)

O teste de germinação foi realizado com 10 repetições de 25 sementes. As sementes foram imersas durante dez segundos em etanol 70%, para diminuir a tensão superficial, seguindo-se de 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) ao 1%. Logo a seguir as sementes foram lavadas por 3 vezes de 30 segundos em água destilada esterilizada. Após a desinfestação as sementes foram distribuídas uniformemente em caixas gerbox com papel de germinação umedecidos com água destilada esterilizada até 2,5 vezes o peso de papel seco (Brasil 2009). As caixas foram alocadas em câmaras de germinação com iluminação de lâmpadas fluorescentes com $25,5 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ de irradiância. Foi mantida a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 10 horas (Ferreira et al. 2001). As sementes foram monitorizadas e avaliadas até que os valores de germinação apresentaram estabilização. Diariamente, foi realizada a contagem das sementes germinadas, considerando-se como germinadas as sementes com protrusão radicular. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes germinadas e calculou-se o IVG segundo Maguire (1962):

$$\text{IVG} = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$$

Onde: G1, G2, Gn são o número de sementes germinadas e N1, N2, Nn o número de dias no teste.

Ao final do período de avaliação da germinação foram mensurados o comprimento dos cotilédones, hipocótilo e radícula de 10 plântulas aleatoriamente individualizadas por repetição.

4.2.7. Microscopia de luz

Foram realizadas análises histológicas dos embriões provenientes das amostras dispersas e aderidas das coletas realizadas seguindo a metodologia (O'Brien et al. 1964) com

modificações de Schmidt et al. (2009). Os embriões foram fixados em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) contendo paraformaldeído a 2,5% durante a noite a 4°C. Posteriormente, as amostras foram desidratadas numa série crescente de soluções aquosas de etanol e em seguida foram infiltradas com historesina (LeicaHistoresin, Heidelberg, Germany). As amostras foram seccionadas em secções semi-finas (3 µm de espessura). Para a identificação das estruturas dos tecidos e células as amostras foram coradas com ATO 0.5%, pH 3.0 (O'Brien et al. 1964). Para a identificação de polissacáridos neutros e proteínas foi utilizado o protocolo de dupla coloração proposto por Schmidt et al (2012). Para isso, as secções foram coradas com Azul Brillhante de Coomasie (CBB) 0,4% em solução de Clarke (Serva, Heidelberg, Germany) + ácido-Schiff periódico (PAS) (Gahan 1984). Os controles consistiram em secções tratadas com as soluções sem o componente corante (por exemplo, omissão de ácido periódico na reação PAS). As secções foram analisadas no microscópio Olympus BX 41 equipado com o software Image Q Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, EUA).

4.2.8. Análise de proteínas totais.

Para o processo de extração de proteínas três repetições de 0,300 mg de massa fresca dos embriões de cada evento reprodutivo de *T. catharinensis* foram liofilizadas e moídas manualmente com nitrogênio líquido em almofariz. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas de acordo ao protocolo proposto por Burrieza et al. (2012). As amostras foram centrifugadas a 10 000 g (duas vezes), o sedimento foi descartado e o sobrenadante dividido em duas fracções. A fracção 1 foi preparada seguindo uma versão modificada do protocolo para determinação de proteínas termoestáveis descrito por Close e Lammers (1993): os extratos foram imersos num banho maria a 96°C durante 10 min para mais tarde serem resfriados até à temperatura ambiente e centrifugados a 10 000 g (duas vezes), o pellet foi descartado e o sobrenadante mantido. A fracção 2 não foi aquecida de modo a conservar proteínas termosensíveis. Os conteúdos de proteínas de ambas as fracções foram quantificados utilizando o método proposto por Bradford (1976) a 595nm em espectrofotômetro. Halo DB-20 UV-VIS double beam.

4.2.9. SDS page e ensaio de Western Blot

Após a quantificação as amostras de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE a 17,5% (Laemmli 1970) a uma voltagem de 100V durante 120 min (Farias-Soares et al. 2013) em cuba Miniprotean eletroforese II cell (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA) foi utilizado 40 µg de proteína por poço e como referência foi utilizado padrão de peso molecular conhecidos (Invitrogen). Após eletroforeses, as proteínas fracionadas das sementes dispersas-2015 foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Osmonics, Minnetonka, Minn., USA) utilizando a cuba de transferência (Bio-Rad Miniprotean II system) a 100V durante 60 min (Farias-Soares et al. 2013). A integridade da transferência foi conferida pela coloração da membrana com Ponceau S. Os ensaios de transferência de Western blot foram realizados de acordo com Burrieza et al. (2012). A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas foi submetida por 12 horas a solução bloqueadora contendo leite em pó desnatado 5% em um buffer salino Tris (TBS) a 4°C. Após isto, a membrana foi incubada por uma hora com uma solução de TBS contendo o anticorpo primário anti-dehidrina, com afinidade para o segmento K (Close et al. 1989), com uma diluição de 1:1000. Após três consecutivas lavagens de 10 minutos em TBS-Tween 20 (0,5% v/v) a membrana foi incubada numa nova solução contendo o anticorpo secundário anti-rabbit imunoglobulina G (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), diluído em 1:10000 em TBS com leite em pó desnatado 5 % por 90 minutos. O complexo anticorpo-proteína foi visualizado pela imersão da membrana em um buffer AP (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ contendo nitrobluetetrazolium 5-bromo-4-cloro-3-indolylfosfato (Promega). A membrana foi digitalizada pelo Sistema de Fotodocumentação Chemidoc MP da BioRad.

4.2.10. Extração de poliaminas

A determinação das poliaminas (PAs), se realizou segundo Steiner et al. (2007). Três repetições com 200 mg de MF de cada evento reprodutivo foram trituradas em 1,6 ml de ácido perclórico (PCA) 5% (v/v) e, após 1 h, as amostras foram centrifugadas durante 20 min a 20 000 g a 4 ° C. As PA livres foram derivadas

por cloreto de dansil e identificados por HPLC, utilizando uma coluna de fase inversa de 5- μ m (ShimadzuShin-pack CLC ODS). O gradiente foi desenvolvido misturando proporções crescentes de acetonitrilo absoluto a 10% de acetonitrilo em água (pH 3,5). O gradiente de acetonitrilo absoluto foi programado para 65% durante os primeiros 10 min, de 65 a 100% por entre 10 min e 13 min e 100% entre 13 min e 21 min, a 1 ml min⁻¹ de fluxo a 40°C. A concentração de PAs foi determinada usando um detector de fluorescência a 340 nm (excitação) e 510 nm (emissão). As áreas dos picos e os tempos de retenção de cada poliamina foram identificados comparando-se com as poliaminas padrões com concentrações conhecidas: putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm).

4.2.11. Análise estatística

O delineamento utilizado no experimento foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e ao teste de Tukey a 5% de significância (Andrade & Ogliari 2010). Para o Teste de Tetrazólio foi ajustada uma equação polinomial de segundo grau. Para as sementes aderidas-2015 determinou-se o ponto ótimo de embebição por meio do cálculo do ponto máximo. Para as sementes dispersas -2015 e dispersas -2014 foram ajustadas equações de primeiro grau. Para condutividade elétrica foram ajustadas equações polinomiais de segundo grau e realizado o teste de Tukey a 5% de significância as 72 horas de embebição. Para a curva de embebição foram ajustadas equações de terceiro grau. As análises foram realizadas utilizando-se o programa Statistica versão Ultimate Academic e seguindo a referência (Sokal & Rohlf 1995).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Descrição morfológica

As sementes coletadas em cada evento reprodutivo (2014 e 2015) foram classificadas em aderidas e dispersas. As sementes aderidas-2015 (sementes aderidos na infrutescência) apresentavam capítulos fechados com corola marrom escurecida (Figura 1a-c). Externamente as cipselas apresentavam pericarpo de coloração verde com papus fechados (Figura 1c). As sementes dispersas-

2015 estavam em fase de dispersão e com papus abertos de coloração branca (Figura 1d-f). Após o beneficiamento com a retirada do papus as sementes apresentavam formato ovóide com coloração entre amarela e marrom escuro (Figura 1g,h).



Figura 1. Características gerais das Infrutescência de *T. catharinensis*. (a-c) infrutescência com frutos aderidos coletadas no ano-2015. (a) características externas das infrutescências. (b) corte longitudinal da infrutescência. (c) Característica da cipsela aderida na infrutescência. (d-f) infrutescência maduras prontas para dispersão coletadas no ano 2015. (d) características gerais da infrutescência. (e) características das cipselas ainda na infrutescência. (f) cipselas com a características morfológicas quando madura. (g-h) cipselas mostrando características após beneficiamento (Barras=1cm)

4.3.2. Grau de umidade

As sementes de *Tricholine catharinensis* apresentaram valores no grau de umidade significativamente diferentes para as amostras analisadas (Figura 2). As sementes aderidas-2015 apresentaram um grau de umidade alto (40.17%), decrescendo a 16.12% para as sementes dispersas-2015. As sementes armazenadas por um período de um ano (dispersas-2014) apresentaram umidade de 9,8 %. A variação dos valores do grau de umidade das sementes aderidas-2015 a as sementes dispersas-2014 foi de 29,9%.

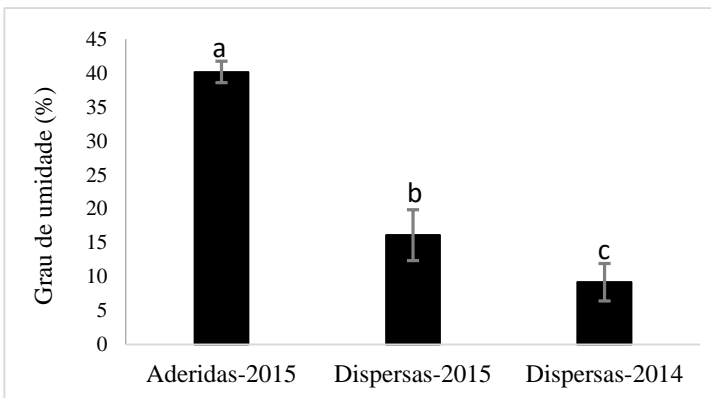


Figura 2. Porcentagem do grau de umidade de sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. Medias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($P < 0,05$). Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias.

4.3.3. Teste do Tetrazólio

O teste de tetrazólio foi eficiente para as amostras de sementes analisadas de *T. catharinensis* (Figura 3a). A media da viabilidade para todos os tempos de embebição para as sementes aderidas-2015 foi de 99% e das dispersas-2015 de 94%. Já nas sementes dispersas-2014 esta porcentagem reduziu para 87% (Figura 3). O melhor tempo de embebição para a realização do teste nas sementes aderidas-2015 foi de 6 horas de embebição com uma porcentagem de 100% de sementes viáveis, para as sementes dispersas 2015, 2014 o melhor tempo de embebição foi às 10 horas

com 99% e 94% respectivamente de sementes viáveis (Figura 3). Assim, o protocolo para o teste de tetrazólio pode ser empregado com maior eficiência após um período de embebição de 6 horas.

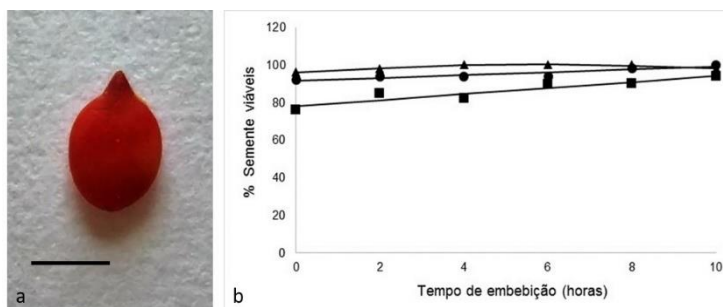


Figura 3. a. embrião de *T. catharinensis* com reação positiva ao teste de tetrazólio. b. Porcentagem de reação positiva das sementes de *T. catharinensis* ao Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio ao 5% (teste de tetrazólio) em diferentes tempos de embebição indicando a viabilidade das sementes coletadas no período 2014-2015. (▲ Aderidas-2015: $Y = -0,125X^2 + 1,478571X + 95,85714$; $R^2 = 0,97$. ● Dispersas-2015: $Y = 0,742857X + 91,61905$; $R^2 = 0,85$. ■ Dispersas-2014: $Y = 1,617650104X + 77,97273982$; $R^2 = 0,87$). (Barras=5mm)

4.3.4. Condutividade elétrica

Os valores de condutividade elétrica para os dois eventos reprodutivos apresentaram um incremento inicial com o início da estabilização as 24 horas de embebição (Figura 4). Após as 72 horas de embebição os valores de condutividade elétrica foram significativamente diferentes (Figura 5). Sendo que as sementes aderidas-2015 apresentam maior lixiviação de eletrólitos ($243,79 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) quando comparadas com as sementes dispersas-2015, as quais mostraram menor lixiviação de eletrólitos ($151,01 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). As sementes aderidas e dispersas 2015 apresentam menor perda de eletrólitos em comparação com as sementes dispersas-2014, as quais apresentaram uma intensa lixiviação de eletrólitos ($458,84 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$).

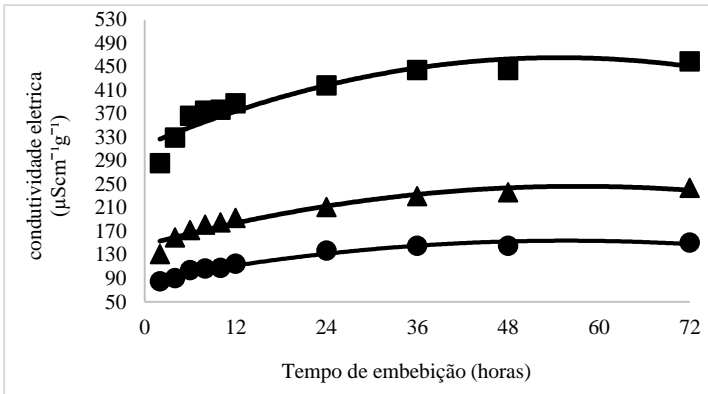


Figura 5. Variação da condutividade elétrica ($\mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$) nas sementes de *T. catharinensis* coletadas nos períodos 2014-2015 em função aos diferentes tempos de embebição. (\blacktriangle Aderidas-2015: $Y = -0,0222x^2 + 2,4713x + 85,454$; $R^2 = 0,9653$. \bullet Dispersas-2015: $Y = -0,0306x^2 + 3,5026x + 146,4$; $R^2 = 0,9299$. \blacksquare Dispersas-2014: $Y = -0,0498x^2 + 5,4562x + 316,15$; $R^2 = 0,8812$)

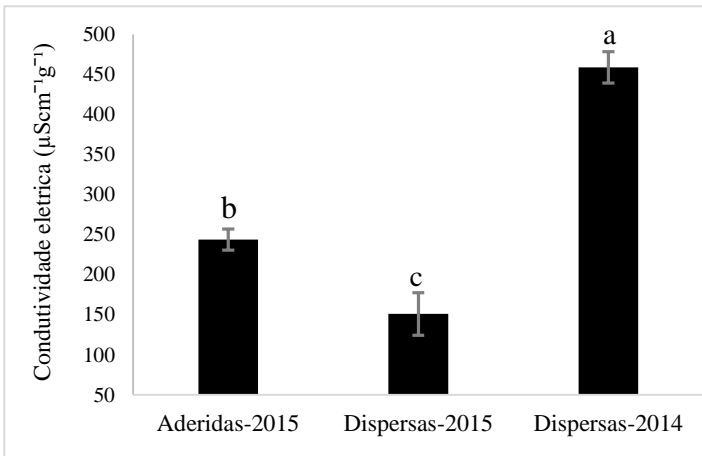


Figura 4. Condutividade elétrica ($\mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$) após 72 horas de embebição em sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barras verticais representam \pm desvio padrão das médias.

4.3.5. Curva de embebição

As sementes de *T. catharinensis* seguiram o padrão trifásico da curva de embebição para as amostras analisadas (Figura 6). Os resultados observados evidenciaram uma rápida embebição na fase I (até as 12 horas), com um incremento de massa fresca de 91,70% para as sementes aderidas-2015, 179.04% para dispersas-2015 e 307.30 % para as dispersas-2014. A fase II da embebição se estendeu até aproximadamente 228 horas de embebição, onde iniciou a fase III com a protrusão da radícula. Os resultados mostraram um padrão similar de embebição entre as sementes dispersas-2015 e 2014 até a fase II da embebição. No início da III fase nas sementes dispersas-2014 apresentaram um incremento na embebição comparativamente com as sementes dispersas-2015. As sementes aderidas-2015 foram as que mostraram menor porcentagem de embebição.

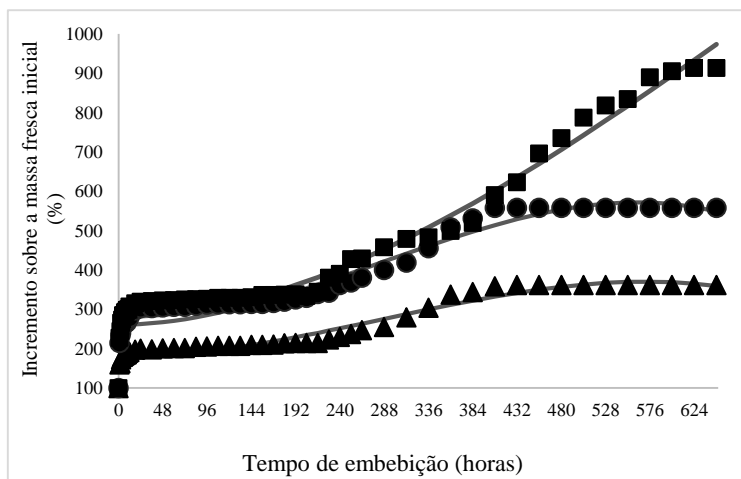


Figura 6. Curva da dinâmica durante a embebição das sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015 em função ao incremento de massa ao longo do tempo. (▲ Aderidas-2015: $Y = -2,1 \times 10^{-6} X^3 + 0,001762X^2 + 178,5459$, $R^2 = 0,94$. ● Dispersas- 2015: $Y = 3,3 \times 10^{-12} X^3 + 1,41 \times 10^{-17} X^2 + 1,61 \times 10^{-38}$, $R^2 = 0,94$. ■ Dispersas-2014: $Y = 0,010115X^3 + 2,1X^2 + 3,5 \times 10^{-37}$, $R^2 = 0,96$).

4.3.6. Germinação e IVG

O início da germinação das sementes de *T. catharinensis* foi diferente para cada evento reprodutivo. Para as sementes dispersas-2015 o início da germinação foi observado aos 5 DAS (dias após sementeira). 8 DAS para as sementes aderidas-2015 e 15 DAS para as sementes dispersas-2014. Os valores máximos de germinação foram observados aos 26 DAS para as sementes aderidas e dispersas coletadas no 2015 e aos 34 DAS para as sementes dispersas-2014 (Figura 7). Os dados médios na porcentagem de germinação foram observados nas sementes aderidas-2015 (80%). Sendo que os maiores valores foram observados nas sementes dispersas-2015 (88%) e os menores nas sementes dispersas-2014 (75%) (Figura 8).

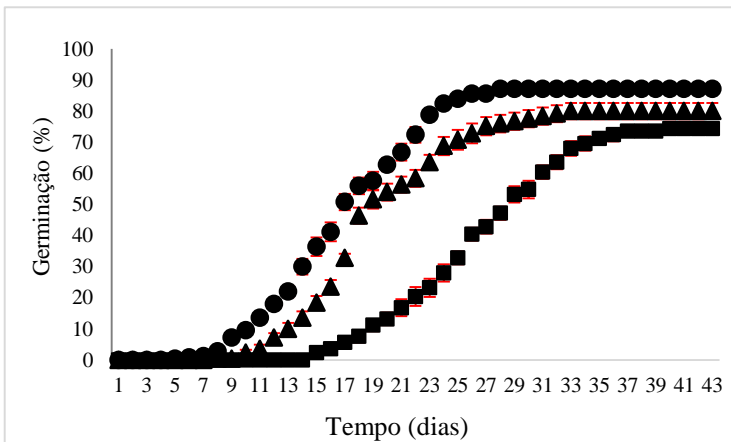


Figura 7. Curva da dinâmica de germinação das sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. ▲ Aderidas-2015, ● Dispersas-2015, ■ Dispersas-2014. Barras verticais representam \pm desvio padrão das médias.

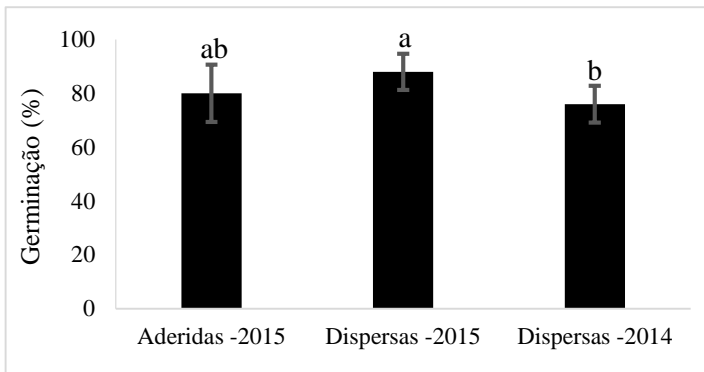


Figura 8. Porcentagem de germinação de sementes de *T. catharinensis* coletadas no período de 2014-2015 aos 43 dias após semeadura a uma temperatura de 20°C. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($P < 0,05$). Barras verticais representam \pm desvio padrão das médias.

Os resultados do IVG para os dois eventos reprodutivos apresentaram valores diferentes (Figura 9). Os maiores valores de IVG foram observadas nas sementes dispersas-2015 (1,43), seguido das sementes aderidas-2015 (1,12). Os menores valores de IVG foram observados nas sementes dispersas-2014 (0,75).

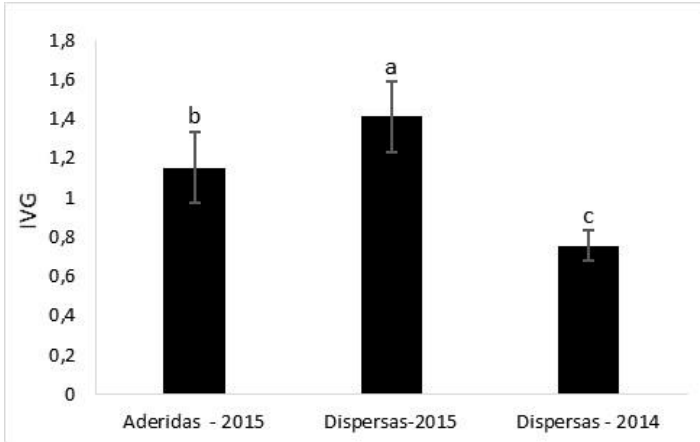


Figura 9. Índice de velocidade de germinação de sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. Medias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($P < 0,05$). Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias.

4.3.7. Morfometria das plântulas

Os comprimentos totais das plântulas das sementes aderidas-2015 ($\pm 2,49$ cm) foram menores em relação das sementes dispersas-2015 ($\pm 2,9$ cm) e 2014 ($\pm 3,00$ cm). Sendo que as raízes foram os que apresentaram os maiores valores do comprimento para as sementes dispersas 2015 ($\pm 1,65$ cm) e 2014 ($\pm 1,75$ cm) em relação as sementes aderidas-2015 ($\pm 1,11$ cm). No entanto os valores observados para o comprimento nos cotilédones para as sementes aderidas-2015 foram maiores ($\pm 1,13$ cm) em comparação com as sementes dispersas 2015 e 2014. Os cotilédones, hipocótilo, radícula das plântulas das sementes dispersas-2015 e dispersas-2014 não mostraram diferencia quando comparadas entre si (Figura 10).

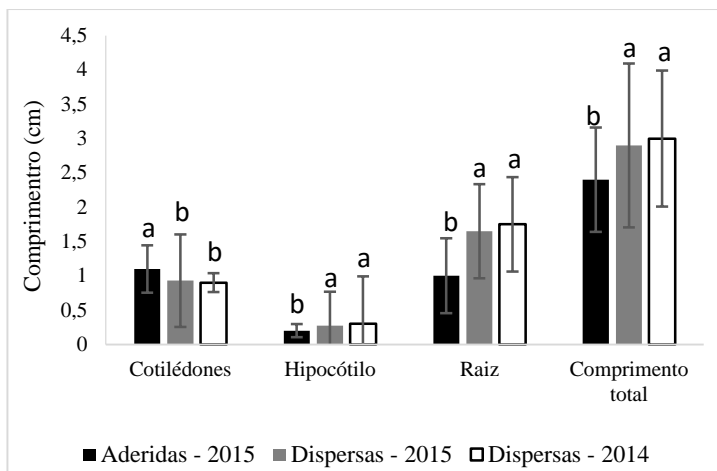


Figura 10. Morfometria (cm) das plântulas de *T. catharinensis* coletadas no período de 2014-2015. Após 43 dias de germinação. Medias seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($P < 0,05$). Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias.

4.3.8. Microscopia de luz

A análise em microscopia de luz evidenciou que os embriões de *T. catharinensis* (Figura 1a) para os dois eventos reprodutivos apresentam cotilédones com células de formato ovoide e paredes celulares delgadas indicados pela reação positiva do PAS (Figura 11b-d). A principal diferença nas células das sementes dos dois eventos reprodutivos é o conteúdo citoplasmático. Nos embriões provenientes de sementes aderidas-2015 foi observado um núcleo proeminente e abundantes vacúolos com quantidade reduzida de grânulos proteicos corados de azul (CBB positivos) acumulados principalmente na periferia dos vacúolos (Figura 11b). No teste histoquímico para os embriões de sementes dispersas-2015 foi observado vacúolos com abundante acúmulo de proteínas (CBB positivo) ocupando totalmente o citoplasma celular (Figura 11c). Nas sementes dispersas-2014 as células dos cotilédones apresentaram-se plasmolisadas com espaços entre a parede celular e o conteúdo citoplasmático (Figura 11d-e). Em coloração com ATO observa-se o núcleo no centro das

células com reação de metacromasia e os vacúolos apresentaram ortocromasia com ATO (Figura 11e).

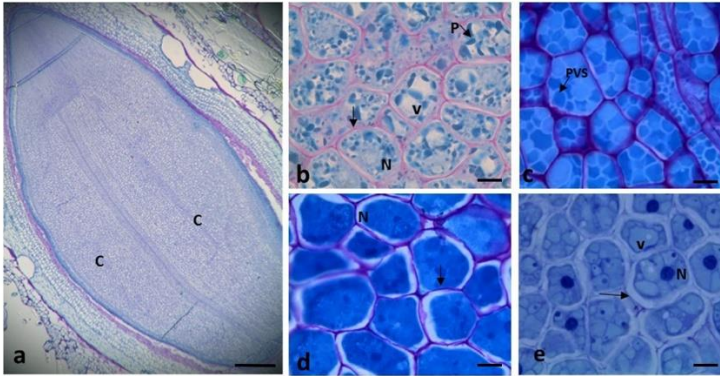


Figura 11. Microscopia de luz dos cotilédones de embriões de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. (a,e) submetidos a coloração com ATO e (c-d) submetidos a histoquímicas com (CBB+PAS). (a) sementes de *T. catharinensis*. (b) células dos cotilédones do embrião das sementes aderidas-2015. (c) células dos cotilédones do embrião das sementes dispersas-2015. (d,e) Células dos cotilédones das sementes dispersas-2014 após armazenadas a $\pm 4^{\circ}\text{C}$. (C: cotilédones; Seta: parede celular, V: vacúolos, N: núcleo; PVS: vacuolos com conteúdo proteico) (Barras: (a) = 200um. (b-d)= 8um).

4.3.9. Quantificação de Proteínas solúveis Totais

As maiores concentrações de proteínas solúveis totais (PST) foram observadas nas sementes aderidas ($14,73 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{MF}$). As concentrações de PST das sementes dispersas-2015 ($7,34 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{MF}$) e dispersas-2014 ($7,35 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{MF}$) foram significativamente diferentes as concentrações apresentadas nas sementes aderidas-2015. As concentrações de proteínas termoestáveis apresentadas por as sementes dos dois eventos reprodutivos não diferem estatisticamente entre si (Figura 12).

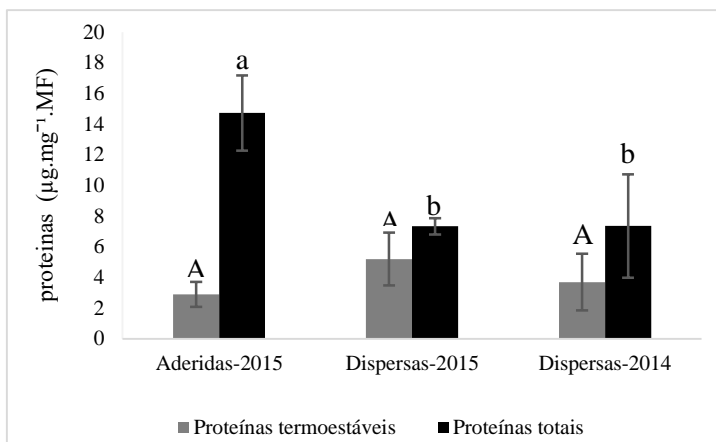


Figura 12. Concentração de proteínas totais e proteínas termoestáveis de *T. catharinensis*. Medias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($P < 0,05$). Barras verticais representam \pm desvio padrão das medias.

4.3.10. SDS Page e Western Blot

O perfil de proteínas nas sementes de *T. catharinensis* apresentou diferenças entre os dois eventos reprodutivos, principalmente na faixa entre as bandas de 37KDa e 25 KDa (Figura 13a). Foi observada duas bandas de aproximadamente 37KDa e duas bandas de aproximadamente de 35 KDa; as quais apresentam maior intensidade nas sementes aderidas-2015 e com menor intensidade nas sementes dispersas-2014. Assim mesmo as sementes dos três eventos reprodutivos apresentam bandas de aproximadamente 25 KDa e 15 KDa. Na imunolocalização de proteínas tipo deidrinás das sementes dispersa-2015 foi detectada uma banda de aproximadamente 25KDa (Figura 13b)

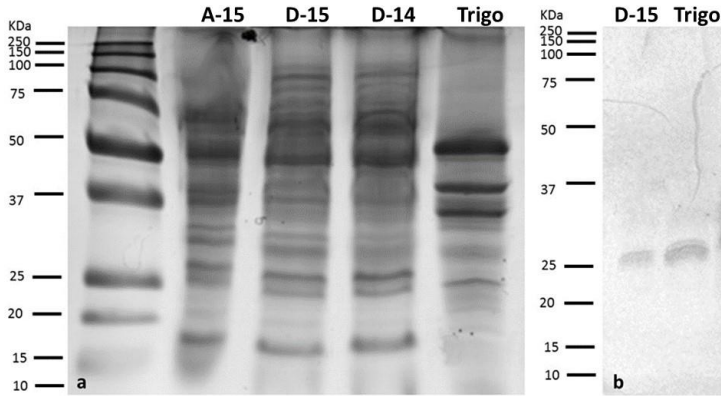


Figura 13a. Perfil de proteínas dos embriões das sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015. Corridos em Gel de SDS-page ao 17.5 % **b.** Detecção de proteínas desidratinas de aproximadamente 25 KDa nas sementes dispersas-2015 utilizando um anticorpo específico para segmento K. Abrv. A-15: aderidas-2015, D-15: dispersas-2015, D-2014: dispersas-2014.

4.3.11. Poliaminas

No presente estudo foi observada diferenças no conteúdo de poliaminas livres nos três eventos reprodutivos. As sementes dispersas-2015 apresentaram os maiores valores de PAs livres totais ($59.88 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{MF}$). Nas sementes aderidas-2015 a Put apresentou os menores valores ($2,98 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{MF}$) e a Spm os maiores valores ($19,12 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{MF}$), sendo que para as sementes dispersas-2014 a Put apresentou os maiores valores ($7,95 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{MF}$) e a Spm os menores valores ($15,27 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{MF}$) (Figura 13). Os valores mais altos da relação PA $[\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}]$ foram observadas nas sementes dispersas-2014 ($0,17 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{MF}$) e os menores nas sementes aderidas-2015 ($0,07 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{MF}$), (Figura 14).

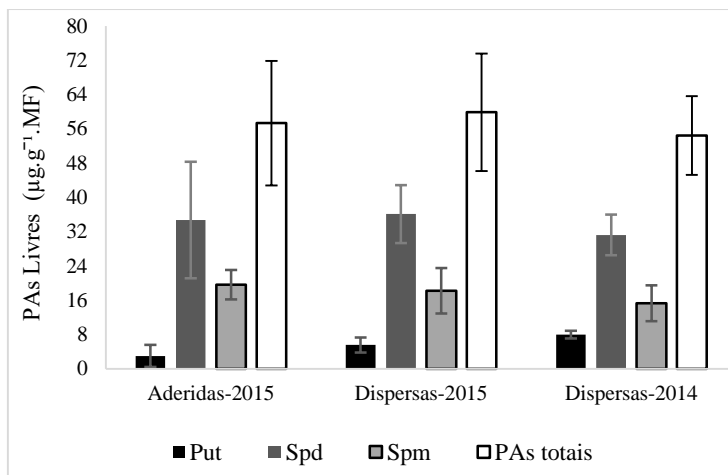


Figura 14. Conteúdo de poliaminas (PAs) livres nas sementes de *T. catharinensis* coletadas no período de 2014-2015. Put: putrescina, Spd: espermidina, Spm: spermina. Barras verticais representam \pm desvio padrão das médias

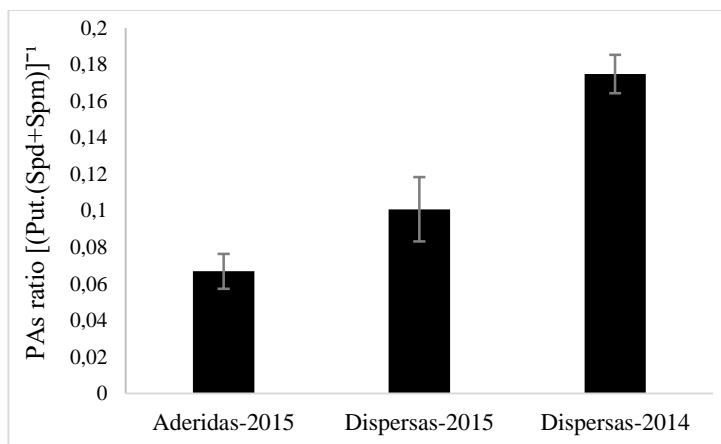


Figura 15. Conteúdo da razão da poliaminas (PAs) totais de *T. catharinensis* coletadas nos períodos de 2014-2015. Abrev. Put: putrescina, Spd: espermidina, Spm: spermina. Barras verticais representam \pm desvio padrão das médias

4.4. DISCUSSÃO

O êxito da germinação e conservação das sementes após o armazenamento depende, entre outros fatores, da qualidade das sementes no momento em que são coletadas (Hay & Probert 2013). As sementes coletadas antes da maturação fisiológica ou depois da mesma apresentam menor vigor e viabilidade, assim como menor capacidade de armazenamento, sendo uns dos muitos fatores para a determinação do tempo ideal de coleta o conteúdo de massa seca nas sementes (Ellis & Pieta Filho 1992; Hay & Probert 2013).

As sementes de *T. catharinensis* aderidas na infrutescência (aderidas-2015) apresentaram teor de umidade de 40%. O alto conteúdo de umidade observado nesta fase pode estar relacionado com o estágio de desenvolvimento da semente. As sementes encontravam-se no final da fase de maturação já tendo passado pela histodiferenciação e ainda estavam ligadas a planta matriz. Conforme estas sementes dispersam no ambiente havendo alcançado a maturidade fisiológica foram observadas a redução do teor de água para 16%. Este valor é alto quando comparados a outros membros da família Asteraceae como *Emerantus incanus* (Nery et al. 2014) que apresenta um conteúdo de umidade inicial de 11% e *Calendula officinalis* com $\pm 8,6\%$ (Silveira et al. 2002). Após atingir a maturação fisiológica as sementes entram em um estado metabolicamente quiescente onde a atividade metabólica é mínima e com baixos teores de umidade, o qual apresenta valores diversos entre as espécies (Egli & Tekrony 1996; Bewley et al. 2013). As sementes quiescentes podem permanecer neste estado seco desde vários dias a muitos anos sem perder sua viabilidade (Bewley et al. 2013). Isso foi observado nas sementes dispersas-2014 de *T. catharinensis* as quais após um ano de armazenamento a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ atingiu grau de umidade de 9% sem perder a viabilidade. Este resultado foi confirmado com o teste de tetrazólio. O princípio do teste baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases (Smith 1952; Copeland et al, 1959; Bulat 1961; Moore, 1973) as quais catalizam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Estas enzimas, particularmente a desidrogenase do ácido málico, reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio) nos tecidos vivos, isto resulta na formação de um composto vermelho, não difusível, conhecido como trifenilformazan, o qual indica atividade respiratória nas mitocôndrias demonstrando assim a viabilidade dos tecidos

(Lazarotto et al. 2011). Neste teste, as sementes de *T. catharinensis* armazenadas por um período de um ano (dispersas-2014) apresentaram entre 87% e 94% de sementes viáveis, indicando que após a etapa de maturação fisiológica estas sementes podem ser armazenadas.

Durante o processo de maturação das sementes, o sistema de membranas encontra-se em contínua transformação em função do desenvolvimento e da modificação do conteúdo de água. Quando as sementes secas entram em contato com a água no processo de embebição a perda de eletrólitos é intensa e proporcional ao estado de desorganização das membranas (Simon & Rajan Liharum 1972). Isto explica a diferença significativa observada nos valores de condutividade elétrica entre as sementes de *T. catharinensis* com diferentes graus de umidade. As sementes de *T. catharinensis* que atingiram a maturação fisiológica e não desidrataram (aderidas-2015) e aquelas que passaram pelo processo de dessecação para alcançar a maturidade fisiológica (dispersas-2015) apresentaram baixo extravasamento de solutos refletindo nos menores valores de condutividade elétrica. Isto sugere que as membranas celulares destas sementes se apresentavam estabilizadas e organizadas. Contudo, a elevada perda de eletrólitos observados nas sementes dispersas-2014 pode estar relacionado com os baixos teores iniciais de água e a desorganização de membranas celulares, o que possivelmente acarretou no vazamento de soluto. Apesar deste extravasamento de solutos as sementes de *T. catharinensis* ainda mantiveram a qualidade fisiológica e a capacidade de germinação. No entanto novos estudos que avaliem a qualidade fisiológica destas sementes com redução ainda maior dos valores de umidade podem indicar qual o limite de desidratação desta semente.

A capacidade das sementes de germinar desenvolve-se cedo, antes de a mesma atingir o peso seco máximo (Hong & Ellis 1990, Lamarca et al. 2013). No entanto, estes autores mencionam que os valores de máxima germinação podem variar segundo a fase em que as sementes foram coletadas. Sendo que para muitas sementes as maiores porcentagens de germinação foram observadas quando atingiram a maturidade fisiológica (secas), porém a secagem por maturação é um pré-requisito para a germinação (Bewley et al. 2013). Isto explica os dados observados no presente trabalho, em que as sementes dispersas-2015 apresentaram valores elevados de IVG e de porcentagem de germinação. A germinação inicia-se com

a absorção de água pela semente. Durante a embebição uma cadeia de eventos é iniciada a qual finaliza com a protrusão da radícula e isto indica êxito na germinação (Bewley et al. 2013). No presente trabalho, as sementes de *T. catharinensis* apresentaram três fases para a curva de embebição, sendo a fase I caracterizada pela rápida absorção de água, conforme corroborado por Bewley et al. (2013). Ao final da fase I, as amostras das sementes aderidas-2015 absorveram a menor quantidade de água (91.7%) e as sementes dispersas-2014 a maior quantidade (307.30%).

O final da fase II ocorreu com o início da protrusão da radícula que variou entre as amostras coletadas no período 2014-2015. O conteúdo de água e a rápida embebição observada nas amostras sugerem que estas sementes possuem armazenamento de reservas cotiledonar (Copeland & McDonald 1999, Davide et al. 2011). De acordo com Bewley et al. (2013) a hidratação de sementes endospermica é muito mais lenta já que atuam como barreira física. Devido a suas propriedades de permeabilidade, e a água tem que penetrar no pericarpo circundante que não é estruturalmente modificado para permitir a sua rápida absorção (Ramakrishna & Amritphale 2005; Bewley et al. 2013). No presente trabalho, o tempo decorrido de entre as duas primeiras fases, aproximadamente 10 dias, corroboram com o que foi descrito por Bewley (1997). Este autor menciona que em sementes não dormentes, a fase II tem um tempo de duração de até 10 vezes maior que a fase I. A fase III é marcada pela retomada da atividade do metabolismo e se caracteriza por o crescimento da radícula onde o principal processo observado é o alongamento e divisão celular (Bewley. 1997). Em *T. catharinensis* a protrusão da radícula iniciou no quinto dia de embebição, nas sementes dispersas-2015 e nas aderidas-2015 isto ocorreu no oitavo dia de embebição. Esta característica é típica de espécies que, em condições favoráveis, se estabelecem no ambiente o mais rapidamente possível, (Velten & Garcia, 2007; Bombo et al. 2015). A IVG é um bom indicador da velocidade de ocupação de um território por uma espécie em determinado ambiente, isto é, sua capacidade de se propagar em seu habitat (Ferreira et al. 2001). Isto é um fator importante para espécies utilizadas na recuperação de áreas degradadas ou na ocupação de um ambiente. No entanto, a germinação imediata das sementes inviabiliza a formação de um banco de sementes (Godinho 2011). Com base no tempo médio da germinação Ferreira et al. (2001) classificou as sementes de 13 espécies da

família Asteraceae: de rápida germinação (menor de 5 dias), germinação intermediária (entre 5 e 10 dias) e lenta (mais de 10 dias). De acordo com esta classificação *T. catharinensis* apresenta uma germinação intermediária tanto para as dispersas-2015 (1,43) e as aderidas-2015 (1,12). Bombo et al. (2015) em um estudo de com cinco espécies do gênero *Aldama* observou que três delas apresentaram uma germinação intermediária e duas germinações lenta. Ainda, outras espécies da família Asteraceae como *Emeranthus erythropappus* foram descritas como de germinação rápida (Cury et al. 2010), *Lessingianthus bardanoides* e *Chrestas phaeocephala* como espécies com germinação lenta (Cury et al. 2010). A presença de luz, temperatura e a combinação de ambas São consideradas fatores que influenciam a rápida ou lenta germinação de sementes (Taylorson & Hendricks, 1972). No presente trabalho foram observadas elevadas taxas de germinação das sementes de *T. catharinensis* a 20°C com fotoperíodo de 10 horas, sendo para aderidas-2015 (80%), dispersas-2015 (88%) e dispersas-2014 (75%). Dentro da família Asteraceae o requerimento de luz varia com as espécies, podendo obter os melhores dados de germinação tanto a temperaturas constantes ou em alternância destas (Ferreira et al. 2001; Gomes & Fernandez 2002; Velten & Garcia 2005; Garcia et al. 2006; Cury et al. 2010, Bombo et al. 2015). Diferentes estudos com espécies da família Asteraceae (Choi et al. 1989; Baskin et al.1993; Bai et al. 1995, Ferreira et al. 2001) mostraram que os requerimentos de Luz e temperatura pode ser diferente após o armazenamento. Isto poderia explicar, por que os dados de IVG e a menor germinação apresentada para as sementes dispersas-2014 foi menor comparativamente as aderidas-2015 e dispersas-2015. Ainda outro fator associado a este resultado pode indicar que as condições de armazenamento destas sementes não foram adequadas o que pode ter ocasionada danos a biomoléculas essenciais para a manutenção da qualidade de sementes. Neste sentido, este resultado indica que estudos adicionais com ênfase no armazenamento de sementes de *T. catharinensis* devem ser realizados. Ao final da germinação a determinação do comprimento médio das plântulas normais é realizada, tendo em vista que as amostras que expressam os maiores valores podem ser consideradas mais vigorosas (Nakagawa 1999). De acordo com Dan et al. (1987), isso ocorre devido ao fato das sementes mais vigorosas originarem plântulas com maior taxa de crescimento. Em *T. catharinensis* os maiores

dados de comprimento total das plântulas foi observada nas sementes dispersas-2015 e dispersas-2014 em relação às sementes aderidas-2015. Segundo (Nakagawa 1999; Bewley et al. 2013) isto pode estar relacionada a baixa quantidade de reservas acumuladas a qual é utilizada na promoção da germinação e desenvolvimento das plântulas.

As características fisiológicas de vigor e viabilidade pre e pos germinativas das sementes são adquiridas juntamente com a disposição de reservas. Na análise histológica das sementes de *T. catharinensis* foi observada reserva de proteínas evidenciada pela reação positiva ao CBB. As proteínas podem ser classificadas em relação a sua solubilidade em albuminas, prolaminas, glutelinas e globulinas (Osborne 1924), as quais tem como uma das funções, o fornecimento, tanto de aminoácidos quanto de nitrogênio durante a formação de plântulas (Mayer & Poljakoff-Mayber 1989; Goldberg 1994; Müntz 1998; Zouhar et al. 2010; Kermodé 2011; Tan-Wilson and Wilson 2012; Borisjuk et al. 2013; Miquel et al. 2014). Após a dispersão das sementes, quando ocorre o rompimento de conexão com a planta matriz, inicia-se o consumo do material de reserva e as proteínas acumuladas podem estar relacionadas com a manutenção do vigor das sementes, proporcionando condições fisiológicas favoráveis para a germinação (Kalembra & Pukacka 2009). Os menores dados de vigor observados nas sementes aderidas-2015 e dispersas-2014 em relação as sementes dispersas-2015 pode estar relacionado ao baixo conteúdo de proteínas de reserva, o qual foi confirmado nos testes histoquímicos.

As sementes ortodoxas preparam-se para a desidratação antes da secagem sintetizando uma matriz de pequenas moléculas e proteínas que lhes permitem preservar a integridade estrutural das organelas e membranas (Hoekstra et al. 2001; Buitink et al. 2003; Bewley et al. 2013). Estas proteínas são encarregadas de manter a estabilidade das estruturas celulares para que possam persistir durante o estado seco e retomar as funções biológicas após reidratação (Bewley et al. 2013). Junto com as proteínas de reservas, também são desenvolvidos alguns mecanismos de proteção contra dessecação entre eles estão as proteínas LEAs, proteínas de choque térmico e proteínas relacionadas ao estresse (Bewley et al. 2013; Bartels & Salamini 2001; Hoekstra et al. 2001). As LEAs têm como função a manutenção da estabilidade celular durante a separação da semente da planta matriz, assim

como no processo de dessecação (Bewley et al. 2013; Moura et al. 2010). Sementes de *T. catharinensis* apresentaram características celulares semelhantes aquelas descritas para sementes ortodoxas. As sementes dispersas-2015 e dispersas-2014 apresentam células com citoplasma abundantes corpos proteicos, membranas estabilizadas e presença do núcleo intacto. Veloso (2014) observou que as sementes de *Maurita flexuosa*, inviáveis por dessecação, apresentavam degradação do núcleo, assim como colapso de membrana e da parede celular. No presente trabalho, as características histoquímicas e a quantificação de proteínas termo resistentes observadas nas sementes aderidas-2015 sugerem que estas proteínas são sintetizadas nesta fase e são conservadas durante o processo de armazenamento. Isto porque foi observado que nas sementes dispersas-2014 a quantificação de proteínas termo resistentes foi estatisticamente similar ao observado nas sementes aderidas-2015 e dispersas-2015. Isto sugere que estas proteínas podem estar associadas ao processo de resistência a dessecação das sementes de *T. catharinensis*. Proteínas termo estáveis foram detectadas em sementes de *Glycine max* (Blackman et al. 1991), *Arachis hypogaea* (Fu et al. 1997), *Triticum aestivum* (Black et al. 1999), *Fagus sylvatica* (Kalemba et al. 2009), *Araucaria Angustifolia* (Farias-Soares et al 2013) e durante o processo de armazenamento de sementes recalcitrantes e ortodoxas do gênero *Acer* (Kalemba & Pupacka 2012). As principais proteínas termoestáveis relacionadas a tolerância a dessecação em sementes são as proteínas LEA, as quais são amplamente estudadas durante a fase de dessecação e perda da água nas sementes. As proteínas LEAs são proteínas hidrofílicas, estáveis ao calor (Roberts et al. 1993, Hoeskstra et al. 2001). Estas proteínas cumprem diferentes funções relacionadas a aquisição da tolerância a dessecação (Hoeskstra et al. 2001). Estas proteínas podem atuar removendo radicais livres (Hara et al. 2004) e atuam como estabilizadores de membrana substituindo as moléculas de água durante o estresse hídrico, por interação direta, atuando como escudos moleculares (Hoeskstra et al. 2001, Tunnacliffe & Wise 2007). Entre as proteínas LEA, encontram-se as deidrininas, as quais são moléculas hidrofílicas amplamente descritas por serem acumuladas durante o desenvolvimento especialmente no processo de maturação e dessecação das sementes (Kalemba et al 2009; Hara 2010; Battaglia & Covarrubias 2013; Kalemba et al. 2015). Deidrininas com peso moleculares de entre os 23 kDa e 46 kDa

foram relacionadas a tolerância a dessecação no processo de maturação e armazenamento de sementes de espécies de *Fagus sylvatica* e espécies do Acer com comportamento ortodoxo e recalcitrante. O que relaciona as deidrinas com a proteção das estruturas celulares durante o desenvolvimento, assim como podem estar envolvidas na prevenção de danos durante a dessecação em sementes ortodoxas e auxiliar no mecanismo de reparo nas sementes recalcitrantes (Kalemba et al. 2015, 2009, Kalemba & Pukacka). Em *T. catharinensis* foram observadas bandas entre os 37 KDa e 25 KDa e imunolocalizada uma banda de aproximadamente 25 KDa na semente maturadas quais podem estar envolvidas nos processos anteriormente descritos.

Durante o processo de maturação e armazenamento as sementes além do acúmulo de proteínas relacionadas com a proteção contra a dessecação, adquirem outros mecanismos bioquímicos que estão relacionados a proteção dos tecidos, entre estes mecanismos encontram-se as poliaminas que influenciam muitos processos fisiológicos durante o desenvolvimento e na maturação, assim como em resposta a tolerância ao estresse abiótico e biótico em plantas (Podwyszynska et al. 2015). No entanto estudos recentes indicam que as poliaminas podem atuar como sinais celulares junto com vias hormonais, as quais incluem a regulação do ácido abscísico (ABA) na resposta do stress abiótico (Alcázar et al. 2010). ABA é um hormônio importante no processo de desenvolvimento e maturação das sementes, a qual está associada à aquisição da tolerância a dessecação nas sementes e atua como regulador de síntese e da resposta das proteínas de tolerância à dessecação (Baker et al. 1988; Mundy & Chuan 1988; Williamson & Quatrano 1988; Bostock & Quatrano 1992, Kalemba et al. 2009). Por outro lado, Urano et al. (2003), relaciona as PAs com a resposta de tolerância à seca e alta salinidade de Sementes de Arabidopsis. Assim, sugere-se que as PAs livres encontradas nas sementes de *T. catharinensis* coletadas no período 2014-2015 desempenham um papel importante durante a maturação e possivelmente no processo de tolerância a dessecação. Estes dados corroboram com aqueles descritos por Urano et al. (2003; 2005) para sementes de Arabidopsis, nas quais as poliaminas atuavam em conjunto com as proteínas de resistência a dessecação. Foi observado ainda que os valores da razão de poliaminas (Put.(Spd+Spm)⁻¹) foram maiores nas sementes dispersas-2014 (0,17 µg.g⁻¹.MF). Em relação as sementes

aderidas-2015 ($0,07 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{MF}$) estes valores foram aumentando proporcionalmente a redução dos valores de umidade das sementes de *T. catharinensis* sugerindo um papel das poliaminas no processo de tolerância a dessecação. Ainda os dados deste trabalho sugerem que para *T. catharinensis* este papel está relacionado principalmente a Put, uma vez que os maiores valores ($7,95 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{MF}$) foram observadas nas sementes dispersas-2014, as quais apresentavam o menor grau de umidade (9.8%). Isto permite associar a presença de proteínas deidrinadas e de poliaminas, especialmente Put, ao processo de tolerância a dessecação e de manutenção da viabilidade em sementes de *T. catharinensis*.

Considerando os dados observados com relação aos aspectos fisiológicos, histológicos e bioquímicos e a relação destas com a manutenção de vigor e viabilidade das sementes de *T. catharinensis* podemos concluir que as sementes aderidas na infrutescência (aderidas-2015) já atingiram a maturação fisiológica e apresentam elevado vigor e viabilidade. Estes dados subsidiam estratégias de manejo da espécie, uma vez que, com base nestes dados as sementes podem ser coletadas antes da dispersão a campo, o que facilita a coleta e beneficiamento de sementes desta espécie. Isto torna-se essencial para o desenvolvimento de estratégias de conservação *ex situ* bem como de cultivo da espécie como planta ornamental. Ainda, as sementes de *T. catharinensis* toleram dessecação e após coleta podem ser armazenadas por um período de um ano a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ com uma umidade de 9.8% sem perda do vigor e viabilidade. O teste de tetrazólio pode ser utilizado como indicador de viabilidade corroborando com os dados do teste de germinação e deve ser aplicado após 6 horas de embebição das sementes. Os maiores valores de viabilidade e vigor foram observados nas sementes dispersas-2015, mas não diferem estatisticamente dos demais. Com relação a análise bioquímica o presente trabalho indicou que as sementes de *T. catharinensis* adquirem a tolerância a dessecação associadas ao acúmulo de reservas protéicas (deidrinadas) e de poliaminas, especialmente Put, as quais possivelmente estão associadas a manutenção da estabilidade das membranas celulares e manutenção de viabilidade. Finalmente, este trabalho sugere que estudos adicionais relacionados ao processo de tolerância a dessecação e armazenamento de sementes sejam realizados visando a conservação de sementes desta espécie. Os resultados aqui apresentados são os primeiros dados relacionados a fisiologia de

sementes de *T. catharinensis*. Estes estabeleceram os aspectos da maturidade fisiológica destas sementes bem como as condições básicas de germinação para uma espécie endêmica do campus sulinos e com potencial ornamental.



Figura 16. Resumo gráfico do capítulo 2. Mostrando os principais resultados observados nos testes fisiológicos, anatômicos e bioquímicos nas cipselas de *T. catharinensis*.

4.5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231(6): 1237-1249

Andrade DF, Ogliari PJ (2010). *Estatística Para As Ciências Agrárias e Biológicas Com Noções De Experimentação 2ª Edição*, Editora da UFSC

Bai Y, Romo JT (1995). Seedling emergence of *Artemisia frigida* in relation to hydration-dehydration cycles and seedbed characteristics. *Journal of Arid environments* 30(1): 57-65

Baker J, Van dennSteele C, Dure L (1988). Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* 11(3):277-291.

Bartels D, Salamini F. (2001) Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiol* 127(4):1346-53

Baskin CC, Baskin JM, Leck MA (1993). Afterripening pattern during cold stratification of achenes of ten perennial Asteraceae from eastern North America, and evolutionary implication. *Plant Species Biology* 8(1): 61-65

Battaglia M, Covarrubias AA (2013) Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in legumes. *Front Plant Sci* 4:190

Bewley JD. (1997). Seed germination and dormancy. *The plant cell* 9(7): 1055

Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H. (2013). *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. 392 pp. Springer, New York–Heidelberg–Dordrecht–London. *Seed Science Research* 23(04): 289-289

Blackman SA, Wettlaufer SH, Obendorf RL, Leopold AC (1991). Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant physiology* 96(3): 868-874

Black M, Corbineau F, Gee H, Côme D (1999). Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology* 120(2): 463-472

Bombo AB, Oliveira TSD, Appezzato-da-Glória B, Novembre ADDLC (2015). Seed germination of Brazilian *Aldama* species (Asteraceae). *Journal of Seed Science* 37(3): 185-191

Borisjuk L, Neuberger T, Schwender J, Heinzl N, Sunderhaus S, Fuchs J, Hay JO, Tschiersch H, Braun HP, Denolf P, Lambert B, Jakob PM, Rolletschka H (2013). Seed architecture shapes embryo metabolism in oilseed rape. *The Plant Cell* 25(5): 1625-1640

Bostock RM, Quatrano RS (1992). Regulation of Em gene expression in rice interaction between osmotic stress and abscisic acid. *Plant Physiology* 98(4): 1356-1363

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254

Brasil (2009). Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Regras para a análise de sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 365

Bulat H (1961). Reduction processes in living tissue, formazan, tetrazolium salts and their importance as reduction-oxidation indicators in resting seed. *Proceedings of the International Seed Testing Association, Copenhagen* 26: 686-696

Buitink J, Vu BL, Satour P, Leprince O (2003) The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaernt. seeds. *Seed Sci Res* 13:273–286. doi:10.1079/SSR2003145

Burrieza HP, Koyro H-W, Martínez Tosar L, Kobayashi K, Maldonado S (2012) High salinity induces dehydrin accumulation in *Chenopodium quinoa* cv. Hualhuas embryos. *Plant Soil* 354:69–79. doi:10.1007/s11104-011-1045-y

Cardoso RDL, Scheffer-Basso SM, Grando MF (2007). Divergência genética em um conjunto de acessos de Gérbera e cravo-do-campo-catarinense. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre-RS 5(1):465-467

Close TJ, Lammers PJ (1993) An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiol* 101:773–779

Choi KS, Watanabe M, Furuya M (1989). Effects of long-term storage on phytochrome-mediated germination in lettuce seeds. *The botanical magazine= Shokubutsu-gaku-zasshi* 102(2): 181-191

Chung YM, Yi YB, Cho YC, Kim JB, Kwon OC. (2005). A New High-Yielding, Red Cut Flower Gerbera Cultivar with Strong Peduncle "Misty Red". *한국육종학회지* 37(4): 273-274

Copeland TG, Bruce CF, Midyette Jr. JW (1959). The unofficial application of tetrazolium tests as an aid in checking germination claims. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts, East Lansing 49:134-141

Copeland LO, McDonald MB (1999). Seed germination. In Principles of Seed Science and Technology p 49

Cury G, Novembre ADDLC, Glória BAD (2010). Seed germination of *Chresta sphaerocephala* DC. and *Lessingianthus bardanoides* (Less.) H. Rob.(Asteraceae) from Cerrado. Brazilian Archives of Biology and Technology 53(6): 1299-1308

Dan EL, Mello VDC, Wetzel, CT, Popinigis F, Zonta EP (1987). Transferência de matéria seca como método de avaliação do vigor de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes* 9(3): 45-55

Davide AC, Tonetti OAO, Silva EAAD (2011). Improvement to the physical quality and imbibition pattern in seeds of candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less.). *Cerne* 17(3): 321-326

Egli DB, TeKrony DM (1996). Seedbed conditions and prediction of field emergence of soybean seed. *Journal of Production Agriculture* 9(3): 365-370

Ellis RH, Pieta Filho C (1992). Seed development and cereal seed longevity. *Seed Science Research* 2(1): 9-15

Fagundes JF, Horbach RK, Essi L, Garlet TMB. (2015). Levantamento florístico de Asteraceae em Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 13(3)

Farias-Soares FL, Burrieza HP, Steiner N, Maldonado S, Guerra MP (2013). Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos. *Protoplasma* 250(4): 911-918

Ferreira AG, Cassol B, Rosa SGTD, Silveira TSD, Stiva, AL, Silva A. (2001). Germination of seeds of Asteraceae natives of Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 15(2): 231-242.

Forzza RC, Leitman PM, Costa A, Carvalho Jr. AAD, Peixoto AL, Walter BMT, Martinelli G (2010). Catálogo de plantas e fungos do Brasil-Vol. 1. JBRJ.

Fu JR, Yang XQ, Jiang XC, He JX, Song SQ (1997) Heat stable proteins and desiccation tolerance in recalcitrant and orthodox seeds. In: Ellis RH, Black M, Murdoch AJ, Hong TD (eds) Basic and applied aspects of seeds biology, Kluwer, Dordrecht, pp 705–713

Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Robinson H (2009) Classification of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy T, Bayer R (eds) Systematics, evolution and biogeography of the Compositae. IAPT, Vienna, pp 171–189

Gahan PB (1984) Plant histochemistry and cytochemistry: An introduction. Academic, London

Gallardo K, Le Signor C, Vandekerckhove J, Thompson RD, Burstin J (2003). Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. Plant Physiology 133(2): 664-682

Gallardo K, Firnhaber C, Zuber H, Hélicher D, Belghazi M, Henry C, Thompson, R (2007). A combined proteome and transcriptome analysis of developing *Medicago truncatula* seeds evidence for metabolic specialization of maternal and filial tissues. Molecular & Cellular Proteomics 6(12): 2165-2179

Garcia LC, Barros FDV, Lemos Filho JP (2006). Comportamento germinativo de duas espécies de canga ferrífera: *Baccharis retusa* DC.(Asteraceae) e *Tibouchina multiflora* Cogn.(Melastomataceae). Acta Botanica Brasilica, 20(2): 443-448

Godinho MAS, Mantovani-Alvarenga E, Vieira MF (2011). Germination and quality of *Adenostemma brasilianum* (pers.) cass. seeds, a native understore Asteraceae of the Atlantic Forest. Revista Árvore 35(6): 1197-1205

Goldberg RB, De Paiva G, Yadegari R (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. Science-New York Then Washington- 605-605.

Gomes V, Fernandes GW (2002). Germination of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) achene. Acta Botanica Brasilica, 16(4): 421-427

Hay FR, Probert RJ (2013). Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. Conservation Physiology 1(1): cot030

Hara M, Fujinaga M, Kuboi T (2004) Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. Plant Physiol Biochem 42:657–662

Heiden G, Iganci JRV, Bobrowski VL, Macias L (2007). Biogeografia de *Baccharis* sect. *caulopterae* (asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, 787-796

Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in plant science* 6(9): 431-438

Hong TD, Ellis RH (1990). A comparison of maturation drying, germination, and desiccation tolerance between developing seeds of *Acer pseudoplatanus* L. and *Acer platanoides* L. *New Phytologist*, 116(4): 589-596

Justo CF, Alvarenga AD, Nery FC, Delu Filho N. (2007). Composição química, curva de embebição e efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de *Eugenia pyryformis* Camb.(Myrtaceae). *Revista Brasileira de Biociências* 5(2): 510-512

Kalembe EM, Janowiak F, Pukacka S (2009). Desiccation tolerance acquisition in developing beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds: the contribution of dehydrin-like protein. *Trees* 23(2): 305

Kalembe E M., Pukacka S (2012). Association of protective proteins with dehydration and desiccation of orthodox and recalcitrant category seeds of three *Acer* genus species. *Journal of plant growth regulation* 31(3): 351-362

Kalembe EM, Bagniewska-Zadworna A, Ratajczak E (2015). Multiple subcellular localizations of dehydrin-like proteins in the embryonic axes of common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds during maturation and dry storage. *Journal of Plant Growth Regulation* 34(1): 137-149

Katinas L., Pruski JF, Sancho G, Telleria MC (2008). The subfamily Mutisioideae (Asteraceae). *Botanical Review* 74: 469–716

Kermode AR, Finch-Savage BE (2002). Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *Desiccation and survival in plants: Drying without dying* 149-184

Kermode AR 2011. Plant Storage Products (Carbohydrates, Oils and Proteins). In: eLS. John Wiley and Sons, Ltd: Chichester. DOI:10.1002/9780470015902.a0001325.pub2

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *nature*, 227: 680-685

Lamarca EV, Silva CV, Barbedo CJ (2013). Limites térmicos para a germinação em função da origem de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) nativas do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 25(2):293-300

Lazarotto M, Piveta G, Muniz MFB, Rejane L, Reiniger S (2011). Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Ceiba speciosa* Adaptation of the tetrazolium test for evaluation of *Ceiba speciosa* seeds. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina 32(4):1243-1250

Livramento G. Zoldan SR. (2006). Plantas nativas do planalto catarinense com potencial ornamental- resultados preliminares. Documento nº227. Epagri Florianópolis. 23p

Maguire JD (1962). Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop science* 2(2): 176-177

Mayer AM, Poljakoff-Mayber A (1982). *The Germination of Seeds: Pergamon International Library of Science, Technology, Engineering and Social Studies*. Elsevier

Mayer AM; Poljakoff-Mayber A (1989) *The germination of seeds*. Oxford: Pergamon Press, 270

Mittermeier RA, Gil PR, Hoffmann M, Pilgrim JBT, Mittermeier CG, Lamoreux J, da Fonseca GAB (eds.). 2004.

Miquel M, Trigui G, d'Andréa S, Kelemen Z, Baud S, Berger A, Deruyffelaere C, Trubuil A, Lepiniec L, Dubre B. (2014). Specialization of oleosins in oil body dynamics during seed development in *Arabidopsis* seeds. *Plant physiology* 164(4): 1866-1878.

Moore RP (1973). Tetrazolium staining for assessing seed quality. *Seed ecology*, 11-23

Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY (2010). Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola* 67(4): 399-407

Mundy J, Chua NH (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *The EMBO Journal* 7(8): 2279

Müntz K (1998). Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology* 38:77-99

Müntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A, Tiedemann J (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and

seedling growth. *Journal of Experimental Botany* 52(362): 1741-1752

Nakagawa J 1999. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: Krzyzanowski FC; Vieira RD; França Neto JB (eds). *Vigor de Sementes: conceitos e testes*. Londrina: Abrates. 2.1-2.24

Nakajima JN, Loeuille B, Heiden G, Dematteis, M, Hattori EKO, Magenta MAG, Ritter MR, Mondin CA, Roque N, Ferreira SC, Borges RA, Soares PN, Almeida G, Schneider A, Sancho G, Saavedra MM, Liro, RM, Pereira ACM, Moraes MD, Silva GAR, Medeiros JD, Lorencini TS, Teles AM, Monge M, Siniscalchi CM, Souza-Buturi FO, Bringel JR JBA, Carneiro CR, Pasini E, Oliveira CT. Asteraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB55>>. Access in 20 Jan. 2016

Nery MC, Davide AC, Silva EAAD, Soares GCM, Nery FC (2014). Seed storage behavior of forest tree species seeds. *Cerne* 20(3): 477-483

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59(2): 368-373

Ortiz J (2015). Germinação e caracterização morfohistológica do desenvolvimento de sementes e embriões de *Trichocline catharinensis* Cabrera

Osborne TB (1924). *The vegetable proteins*. Longmans, Green And Co; London.

Pasini E, Ritter MR (2012). *Trichocline cisplatina* (Asteraceae, Mutisieae), a new species from southern Brazil and Uruguay. *Phytotaxa*, 42 (1): 19-25

Podwyszyńska M, Kosson R, Treder J (2015). Polyamines and methyl jasmonate in bulb formation of in vitro propagated tulips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 123(3): 591-605

Ramakrishna P, Amritphale D (2005). The perisperm-endosperm envelope in Cucumis: structure, proton diffusion and cell wall hydrolysing activity. *Annals of botany*, 96(5): 769-778

Rio Grande do sul. (2014). Decreto n. ° 52.109, de 02 de dezembro de 2014. *Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul*

Roberts JK, DeSimone NA, Lingle WL, Dure LIII (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation

of two LEA proteins in cotton embryos. *The Plant Cell* 5(7): 769-780

Vertucci CW, Farrant JM (1995). Acquisition and loss of desiccation tolerance. *Seed development and germination* 237-271

Schmidt EC, Scariot LA, Rover T, Bouzon ZL (2009) Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron* 40:860–869

Schmidt EC, Pereira B, Santos R, Gouveia C, Costa GB, Faria GSM, Scherner F, Horta PA, Paula MR, Latini A, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL (2012) Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. *Aquat Bot* 100:8–17

Silveira MAM, Villela FA, Tillmann MAA (2002). Comparação de métodos para avaliação da qualidade fisiológica em sementes de calêndula. *Revista Brasileira de Sementes* 24(2): 24-30

Simon, E, Harun RR. (1972). Leakage during seed imbibition. *Journal of Experimental Botany* 23(4): 1076-1085

Smith FG (1952). The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. *Plant physiology* 27(3): 445

Sokal RR, Rohlf FJ (1995). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research* –WH Freeman and Co. New York, XIX

Steiner N, Santa-Catarina C, Silveira V, Floh EI, Guerra MP (2007). Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 89(1): 55-62

Sun WQ, Leopold AC (1993) Acquisition of desiccation tolerance in soybeans. *Physiol Plant* 87(3):403–409. doi:10.1111/j.1399- 3054.1993.tb01748.x

Tan-Wilson AL, Wilson KA (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum* 145(1): 140-153

Taylorson RB, Hendricks SB (1972). Interactions of light and a temperature shift on seed germination. *Plant Physiology* 49(2): 127-130

Tunnacliffe A, Wise MJ (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* 94:791–812

Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Igarashi Y, Seki M, Sekiguchi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003)

Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ* 26: 917–1926.

Urano K, Hobo T, Shinozaki K (2005). *Arabidopsis* ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS letters* 579(6):1557-1564

Velten SB, Garcia QS (2005). Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. *Acta botânica brasílica* 19(4): 753-761

Velten SB, Garcia QS (2007). Variation between three *Eremanthus* (Asteraceae) species in their ability to form a seed bank. *Brazilian Journal of Botany* 30(4): 713-719

Veloso VHS, Ribeiro LM, Mercadante-Simões MO, Nunes YRF (2016). Cytological aspects of recalcitrance in dormant seeds of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). *Acta Physiologiae Plantarum* 38(7): 1-11. DOI 10.1007/s11738-016-2194-7

Williamson JD, Quatrano RS (1988). ABA-regulation of two classes of embryo-specific sequences in mature wheat embryos. *Plant Physiology* 86(1):208-215

Zouhar J, Muñoz A, Rojo E (2010) Functional specialization within the vacuolar sorting receptor family: VSR1, VSR3 and VSR4 sort vacuolar storage cargo in seeds and vegetative tissues. *Plant J* 64:577-588

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A realização deste trabalho possibilitou a obtenção de resultados importantes relacionados aos aspectos do desenvolvimento para a formação da semente (cipsela) bem como aspectos fisiológicos e bioquímicos na semente (cipsela) madura de *Trichoclina catharinensis*. Os resultados obtidos possibilitaram a compreensão de vários pontos-chaves durante o desenvolvimento das sementes, em especial aqueles relacionados com as estruturas do ovulo maduro, embriogenese, formação do tegumento, pericarpo, estruturas de proteção e dispersão nas sementes, assim como a organização celular dos meristemas e cotilédones do embrião. Também os resultados permitiram a determinação do melhor ponto de coleta das sementes, de acordo com suas características fisiológicas de vigor e viabilidade, anatômicas e bioquímicas, como seu armazenamento durante um período de um ano sem perder viabilidade.

No capítulo 1, estudando o desenvolvimento das sementes de *T. catharinensis* através de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão foi descrito o endothelium, zona periendotelial e podium, considerados tecidos de importância nutricional dentro da família Asteraceae. A formação do tegumento com a exotestas como principal estrutura de proteção do embrião e o pericarpo com células colapsadas devido ao incremento do embrião, características descritas para espécies de dispersão anemocórica a qual é de importância evolutiva na família. Nas análises de microscopia eletrônica foi descrito a pluripotência das células meristemáticas, assim como a caracterização das células dos cotilédones. No entanto são necessários estudos de gametogenese para a determinação da origem das estruturas do ovulo e ovário, assim como de microscopia eletrônica de transmissão e imunohistoquímica dos tecidos da zona periendotelial, endothelium e podium de ovulo maduro e durante o desenvolvimento embriológico que irão permitir a compreensão das características nutricionais destes tecidos.

No capítulo 2, os resultados obtidos permitem determinar que as sementes de *T. catharinensis* aderidas nas inflorescências já atingiram a maturidade fisiológica apresentando um elevado vigor e viabilidade. Foi também observada a tolerância das mesmas ao armazenamento durante um período de um ano a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ sem perder o vigor e a viabilidade. Foi observado também que as sementes de

T. catharinensis apresentam proteínas como produto de reserva, as quais formam acumuladas em paralelo com as proteínas de tolerância a dessecação, como as deidrininas. As poliaminas, especialmente a Put observada com maior quantidade nas sementes dispersas-2014 podem atuar conjuntamente com as proteínas de tolerância a dessecação para a manutenção do sistema de membrana durante o processo de armazenamento. De acordo como os resultados obtidos sugere-se que futuros trabalhos com estudos específicos sobre fisiologia da tolerância a dessecação e armazenamento em conjunto com análises do comportamento das proteínas e poliaminas nestes processos.

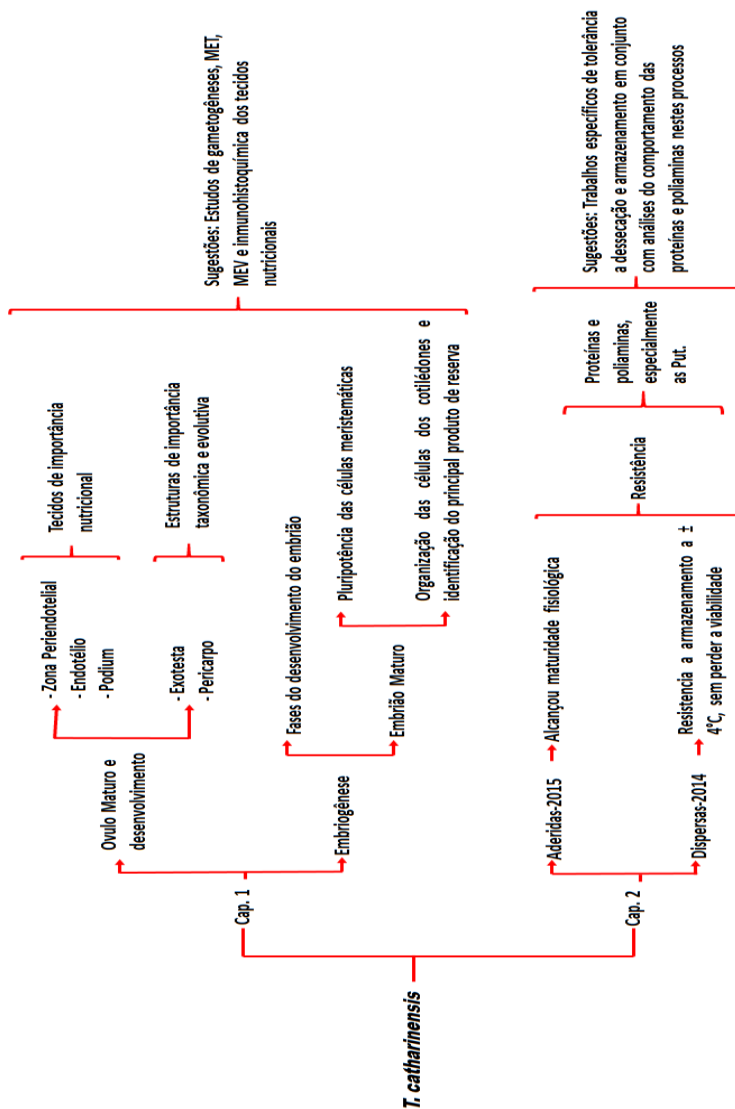


Figura 1. Resumo gráfico das conclusões e perspectivas do capítulo 1 e capítulo 2.