

CLÁUDIA DIAS DA COSTA

QUALIDADE FISIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO
MORFOHISTOLÓGICA DE SEMENTES DE *Polygala sellowiana* A.
St. - Hil. & Moq.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
de Santa Catarina como requisito
parcial para a conclusão do Curso de
Graduação de Ciências Biológicas –
Licenciatura.

Orientadora: Prof.^a Neusa Steiner

Florianópolis
2015

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

Costa, Cláudia Dias da
Qualidade fisiológica e caracterização morfohistológica de
sementes de *Polygala sellowiana* a. St. - Hil. & Moq. /
Cláudia Dias da Costa ; orientadora, Neusa Steiner -
Florianópolis, SC, 2015.
49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Germinação. 3. Polygalaceae.
4. Fisiologia Vegetal. 5. Dormência. I. Steiner, Neusa .
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

CLÁUDIA DIAS DA COSTA

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO
MORFOHISTOLÓGICA DE SEMENTES DE *Polygala sellowiana*
A. St. -Hil. & Moq.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a conclusão do Curso de Graduação de Ciências Biológicas – Licenciatura à Universidade Federal de Santa Catarina, realizado no segundo semestre de 2015.

Banca Examinadora:

Prof.^a Neusa Steiner, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Áurea Maria Randi, Dr.^a (Titular)
Universidade Federal de Santa Catarina

Eder Carlos Schmidt, Dr. (Titular)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. João de Deus Medeiros, Dr. (Suplente)
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2015.

Maria da Graça Dias da Costa e
Cláudio João da Costa, pai e mãe,
lhes dedico todas as conquistas da
minha vida, sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Neusa Steiner por todos os ensinamentos, pelas explicações, pela imensa paciência e principalmente pelas conversas descontraídas dentro e fora do laboratório. Obrigada por todo ATP disponibilizado, pela iniciação científica, pela *Polygala* e por proporcionar todo conhecimento que hoje eu tenho. Serei sempre grata professora.

Agradeço a todas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Ana Paula, Priscila, Rosa, Gabriela, meninas a presença de vocês, as discussões, os cafés, o companheirismo e toda ajuda foi primordial para a geração deste trabalho. Obrigada por tudo.

À professora Áurea Maria Randi, por todos os ensinamentos, por toda preocupação e dedicação ao ensino e a pesquisa. Obrigada por todas as considerações nos seminários no laboratório e no meu trabalho.

A todos do Laboratório de Biologia Celular Vegetal em especial ao Dr. Éder Carlos Schmidt, muito obrigada por todos os ensinamentos, pelas considerações no projeto de TCC e agora na banca, pelas indispensáveis ajudas com os cortes histológicos, pelo teu bom humor de sempre e pelos cafés no bêquer.

Ao pessoal do Laboratório de Anatomia Vegetal, em especial à Roberta pela sempre pronta disponibilidade em dar uma ajudinha, pelos reagentes e pelas conversas.

Agradeço a todos os professores do curso de Ciências Biológicas com os quais eu tive a oportunidade de conviver e aprender. Ao professor João de Deus Medeiros que aceitou fazer parte da banca, meu muito obrigada.

Aos amigos do Laboratório Biológico que fizeram parte desta jornada Marco, Helcio, Rúbia, Liani valeu por toda força!

A todos da biologia que eu tive o prazer de conhecer, em especial à Isabela, Laura Melody e Priscila Luiza, pela parceria de sempre. Meu eterno obrigada por tonarem esses anos na universidade mais simples e felizes.

À minha família, Costa e Dias, pelo apoio incondicional, pela ajuda emocional e por estarem sempre disponíveis. Mãe, Grasiela, Glauca e Fernando, muito obrigada. Catarina, Alice e Vicente sem vocês esses anos não seriam tão coloridos. Amo vocês.

A todos os meus amigos que pacientemente me esperaram, me entenderam e sempre me apoiaram nessa jornada: Denise, Juliana Silveira, Paola, Janaina, Jéssica, Bianca, Samantha, Viviana. Obrigada por tudo sempre!

Ao CNPq, pela bolsa PIBIC.

A todos de que direta ou indiretamente me ajudaram e passaram por mim nesse caminho: Muito Obrigada!

Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,
Sê um arbusto no vale mas sê
O melhor arbusto à margem do regato.
Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.
Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva
E dá alegria a algum caminho.
Se não puderes ser uma estrada,
Sê apenas uma senda,
Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas.

Pablo Neruda

Resumo

Polygala sellowiana é uma espécie nativa da zona de campos do Planalto Meridional Sul que apresenta potencial medicinal. O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos da qualidade fisiológica e morfohistológicos de sementes de *P. sellowiana* visando gerar subsídios para a propagação e conservação desta espécie. As sementes foram coletadas em Rancho Queimado/SC. Foi determinado o conteúdo de água na semente através do método de secagem por estufa. No teste do tetrazólio, as sementes foram separadas em dois tratamentos, intactas e escarificadas e, após embebição em água foram imersas em solução de tetrazólio 0,1% a 25°C por 1 hora. As sementes foram submetidas ao teste de germinação no qual foram avaliados os efeitos do ácido giberélico 500 µM (GA3), do estado do tegumento (escarificado e intacto) e diferentes fotoperíodos (24H, 10H e 0H). Foi calculada a porcentagem final de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG). Para a análise histológica das sementes, foram confeccionadas lâminas permanentes com historesina e após coradas com azul de toluidina (ATO), azul de Comassie (CCB) e ácido periódico de Schiff (PAS). As sementes de *P. sellowiana* apresentaram conteúdo de água de 12,5%. O teste do tetrazólio indicou a viabilidade de sementes de *P. sellowiana*. Foi observado que o rompimento do tegumento (escarificadas) induziu porcentagem maior de sementes viáveis comparativamente as sementes intactas. O período ótimo de embebição para aplicação do teste de tetrazólio é de 8 horas e 24 minutos. Na presença de GA3 as sementes iniciaram a germinação seis dias após o início do experimento estabilizando em 25 dias. O GA3 afetou significativamente a germinação das sementes de *P. sellowiana*, com 89,33% de sementes germinadas, comparativamente ao tratamento controle, com 0,67% de sementes germinadas, independente do fotoperíodo ou do estado do tegumento da semente. Os valores médios de IVG na presença de GA3 também foram significativamente superiores (1,55) quando comparados à ausência deste fator (0,05) independente do fotoperíodo ou estado do tegumento. Externamente as sementes apresentam tegumento piloso, apêndice bilobado e elaiossomo. A análise histológica das sementes evidenciou a presença de duas principais estruturas: uma externa denominada endosperma e, internamente a ela, o embrião. O embrião com dois cotilédones apresentou região meristemática apical e radicular e a presença de procâmbio. A reação de metacromasia, por meio da coloração com ATO, nas paredes celulares (cor púrpura) indica a presença de polissacarídeos e/ou pectinas, que também foram observadas na região que reveste o endosperma. As células

do tecido cotiledonar apresentaram compostos de reserva de natureza proteica, assim como as células do endosperma, evidenciadas pela coloração CBB. Estes são os primeiros dados gerados sobre sementes de *P. sellowiana* e a continuidade destes estudos pode contribuir para o uso e propagação de uma espécie nativa com potencial medicinal.

Palavras-chave: Polygalaceae. *P. sabulosa*. Germinação. Ácido giberélico. Dormência.

Lista de Figuras

Figura 1. Planta de *Polygala sellowiana*, novembro de 2014. Serra da Boa Vista/SC.

Figura 2. Localização geográfica do local de coleta da espécie: Serra da Boa Vista, município de Rancho Queimado/SC.

Figura 3. Gráfico de massas fresca, seca e saturada de sementes de *P. sellowiana*. (Eixo y massa de 100 sementes). Barras: desvio padrão. n=100.

Figura 4. Teste de tetrazólio (0,1%) aplicado às sementes de *P. sellowiana*. Sementes intactas: embebidas e submetidas ao teste. Sementes escarificadas (com pinça): embebidas, escarificadas e após, submetidas ao teste. n=3

Figura 5. Aspecto morfológico de sementes de *P. sellowiana* após teste de tetrazólio. **A.** Sementes intactas: embebidas e submetidas ao teste. **B.** Sementes escarificadas: embebidas, escarificadas e após, submetidas ao teste.

Figura 6. Porcentagem de germinação de sementes de *P. sellowiana* em câmara de germinação, 25°C, por um período de 45 dias submetidas aos tratamentos de escarificação, ácido giberélico e diferentes fotoperíodos. **A:** Fotoperíodo 24 horas; **B:** Fotoperíodo 10 horas e **C:** Fotoperíodo 0 horas.

Figura 7. Plântulas de *P. sellowiana*, germinadas em câmara de germinação a 25°C. **A.** Vista geral das plântulas mantidas sob fotoperíodo de 24 e/ou 10 horas. **B.** detalhes das primeiras folhas. **C.** Vista geral das plântulas mantidas sob fotoperíodo zero horas de luz (escuro), **D.** detalhe dos cotilédones não expandidos e amarelados.

Figura 8. Planta e sementes de *P. sellowiana*. **A.** Planta de *P. sellowiana* com detalhes das inflorescências coletadas em Rancho Queimado, Santa Catarina. **B.** Aspecto geral das sementes evidenciando o tegumento piloso e o apêndice bilobado (*). **C.** Detalhe do elaiossomo (seta). **D.** Semente sem o tegumento.

Figura 9. Cortes longitudinais de sementes de *P. sellowiana* corados com ATO e analisados em microscopia óptica. **A.** Vista geral da semente, endosperma embrião com cotilédones e duas regiões meristemáticas. **B.** Detalhe do endosperma, células com grande quantidade de reserva. **C.** Detalhe do eixo radicular. **D.** Detalhe do endosperma e embrião. (co: cotilédone; en: endosperma; ma: meristema apical; mr: meristema radicular; seta: compostos de reserva).

Figura 10. Cortes transversais (A, B e C) e longitudinal (D) de sementes de *P. sellowiana*, corados com PAS e CBB e analisados em microscopia óptica. **A.** Reação PAS positiva para a parede celular (polissacarídeos neutros), embrião com pró cambio e parênquima de reserva envoltos por endosperma. **B.** Coloração com CBB evidenciando que o parênquima é de reserva de proteínas totais. **C.** Dupla coloração com CBB e PAS, procâmbio ao centro do embrião, envoltos por endosperma. **D.** Dupla coloração com CBB e PAS, procâmbio ao centro. (pr: parênquima de reserva; pc: procâmbio; en: endosperma; em: embrião; *: coloração mais intensa ao redor do endosperma; seta: grânulos proteicos)

Lista de Tabelas

Tabela 1. Combinação de diferentes tratamentos (vinte tratamentos) empregados no Teste do Tetrazólio de sementes de *P. sellowiana*. Horas de embebição em água (0 a 24h). Sementes escarificadas: estruturas externas submetidas a escarificação (com pinça). Sementes intactas: sem nenhum tipo de interferência física.

Tabela 2. Tratamentos aplicados ao teste de germinação de sementes de *P. sellowiana*. Os números 1 a 12 se referem aos tratamentos resultantes da combinação dos diferentes fatores.

Tabela 3: Resumo da análise de variância referente à germinação (G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de *P. sellowiana*.

Tabela 4: Valores médios das porcentagens de germinação de *P. sellowiana* em cada porcentagem de Hormônio e cada um dos Fotoperíodos.

Tabela 5: Valores médios do IVG de sementes de *P. sellowiana* com ou sem escarificação em cada um dos fotoperíodos.

Tabela 6: Valores médios do IVG de *P. sellowiana* com ou sem GA3 em cada um dos Fotoperíodos.

Lista de Abreviaturas

% de Umidade (U)
Ácido Giberélico (GA3)
Ácido Periódico de Schiff (PAS)
Azul de Toluidina (ATO)
Azul Brilhante de Coomassie (CBB)
Centro de Ciências Biológicas (CCB)
Cloreto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio (TTC)
Cotilédone (co)
Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD)
Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética (BEG)
Embrião (em)
Endosperma (en)
Estado do Tegumento (E)
Fotoperíodo (F)
Índice de Velocidade de Germinação (IVG)
Meristema Apical (ma)
Meristema Radicular (mr)
Parênquima de Reserva (pr)
Peso de mil sementes (PMS)
Procâmbio (pc)
Santa Catarina (SC)
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Sumário

1. Introdução	21
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. Material e métodos.....	25
3.1. Coleta de Sementes	25
3.2. Amostragem.....	25
3.3. Qualidade Fisiológica e Germinação	26
3.3.1. Conteúdo de água na semente.....	26
3.3.2. Teste do Tetrazólio	26
3.3.3. Teste de Germinação	27
3.3.4. Índice de velocidade de germinação – IVG.....	27
3.4. Análises Morfohistológicas.....	28
3.4.1. Microscopia Óptica.....	28
3.5. Análise Estatística.....	29
4. Resultados e Discussão	29
4.1. Conteúdo de Água da Semente	29
4.2. Teste do Tetrazólio	30
4.3. Teste de Germinação.....	32
4.4. Caracterização Morfohistológica	39
4.5. Microscopia Óptica.....	40
5. Conclusões e considerações finais	43
6. Referências Bibliográficas	44

1. Introdução

A família *Polygalaceae* compreende 19 gêneros e cerca de 1300 espécies e apresenta distribuição cosmopolita ocorrendo predominantemente em regiões tropicais e temperadas (Lüdtke, 2008). No Brasil foram relatados oito gêneros tais como, *Acanthocladus* Klotzschex Hassk., *Barnhartia* Gleason, *Bredemeyera* Willd., *Diclidanthera* Mart., *Monnina* Ruiz & Pav., *Moutabea* Aublet, *Polygala* e *Securidaca* L. (Lüdtke et al., 2013), gêneros estes que ocorrem em praticamente todas as formações vegetais do país o que faz desta família um objeto de pesquisa adequado para estudos comparados entre as distintas formações vegetais brasileiras (Aguiar, 2008). Existe também um grande interesse nesta família devido à sua importância medicinal, que ainda é economicamente pouco explorada. Dentre essas espécies pode-se destacar *Polygala sellowiana* A. St. - Hil. & Moq., conhecida popularmente como “timuto-pinheirinho”. É uma erva perene, higrófito e heliófito, endêmica da zona de campos do Planalto Meridional, onde apresenta vasta e expressiva dispersão (Wurdack & Smith, 1971). Atualmente *P. sellowiana* ocorre nos estados de Minas gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Lüdtke et al., 2013).

Todos os trabalhos realizados na área de fitorremediação utilizam o nome desta espécie como *Polygala sabulosa* dado por Bennett em 1874. Recentemente, em uma revisão da nomenclatura das espécies da família *Polygalaceae* (Pastore, 2014) a espécie foi renomeada utilizando a nomenclatura de Saint-Hilaire & Moquin-Tandon (1828), ou seja, *Polygala sellowiana* pelo qual será referida no presente trabalho.

A planta é encontrada preferencialmente em locais úmidos, brejos, turfeiras, campos gramíneos e menos frequentemente ocorre em solos rasos, secos e rochosos (Wurdack & Smith, 1971; Lüdtke et al., 2013). A espécie (Figura 1), possui inflorescências do tipo ráculo, frutos do tipo cápsula e sementes púberulas. As sementes variam o seu tamanho de 1,2 a 1,4mm, possuem endosperma, embrião contínuo e presença de elaiossomos (Marques & Aguiar, 2007; Lüdtke, 2008). Segundo Lisci et al. (1996), a presença do elaiossomo está associada com a dispersão das sementes, uma vez que esta estrutura composta por lipídeos e proteínas, estabelece um importante papel ecológico como uma recompensa para formigas na natureza, colaborando na dispersão. Este mesmo autor sugere que essa estrutura pode também estar associada com as relações hídricas, armazenamento, hidratação e dormência das sementes.



Figura 1. Planta de *Polygala sellowiana*, novembro de 2014. Serra da Boa Vista/SC.

As plantas do gênero *Polygala* são bastante utilizadas na medicina alternativa, para fins de anestésico de uso tópico, no tratamento de desordens do fígado e dos rins (Soldi et al., 2012 e Borges et al., 2014). Uma grande parte dos estudos com *P. sellowiana* se refere à obtenção de compostos químicos e posterior análise da atividade desses isolados em modelos animais (Aguiar-Dias et al., 2012). A quimiosistemática do gênero *Polygala* é atribuída à presença de xantonas. Entretanto, especialmente em *P. sellowiana* foi verificado um desvio na síntese deste metabolito secundário, sendo efetivamente biossintetizadas estirilpironas (Pizzolatti et al., 2000; Mendes, 2008). Outros metabólitos secundários de interesse farmacológico já foram estudados para o gênero *Polygala* e dentre eles destacam-se as saponinas, cumarinas, lignanas, flavonóides e esteróides (Cristiano et al., 2003) podendo apresentar efeitos do tipo ansiolítico, hipnosedativo e anticonvulsivante (Duarte, 2007). O odor característico da raiz das plantas de *Polygala* é oriundo das altas concentrações de salicilato de metila. Este constituinte é largamente

utilizado no tratamento de dores, principalmente dores musculares (este composto e seus derivados são conhecidos pela sua ação anti-inflamatória, sendo encontrados em muitas formulações farmacêuticas (Rocha et al., 2012)).

Mesmo sendo uma espécie nativa com potencial medicinal já comprovado, *P. sellowiana* ainda é pouco utilizada e valorada economicamente. Ainda não há estudos sobre a propagação e protocolos de cultivos estabelecidos, bem como para a obtenção de matéria-prima vegetal padronizada a partir da germinação de sementes.

O ponto de maturação da semente é caracterizado pelo acúmulo de matéria seca e baixo teor de umidade que ocorrem como resultado de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas desde a fertilização até o processo de separação da planta-mãe (Marcos Filho, 2005). A composição química das sementes é definida geneticamente podendo ser em alguns casos influenciada por fatores abióticos. Basicamente podem ser divididas em dois grupos, os componentes que são comuns as outras partes das plantas e os compostos denominados substâncias de reserva que irão nutrir o embrião (Carvalho & Nakagawa, 2012).

A dormência das sementes não se restringe apenas aos aspectos estruturais, podendo também estar relacionada aos processos fisiológicos. A extensão da radícula depende da pressão de turgor de suas células para romper as paredes celulares dos tecidos circundantes da semente e a falha neste mecanismo é um tipo de dormência fisiológica (Bewley, 1997).

Outro aspecto relevante para a germinação refere-se à distribuição espacial e temporal das sementes, considerada como uma estratégia de sobrevivência das espécies. Essa variabilidade das sementes relativas à dispersão em uma mesma planta contribui para a formação e manutenção do banco de sementes, sendo necessário avaliar a dinâmica da germinação em cada espécie (Marcos Filho, 2005). Este mesmo autor considera fundamental para conhecer a biologia reprodutiva a identificação destes estágios iniciais do desenvolvimento das sementes.

Os estudos que abordam os aspectos morfofisiológicos de sementes contribuem para a ampliação do conhecimento dos estágios iniciais do desenvolvimento vegetal. Além disso, permitem estimar as influências dos fatores bióticos e abióticos envolvidos no processo da germinação, assim como, avaliar métodos de superação de dormência e verificar o efeito do processamento e armazenamento sobre a qualidade de sementes (Baskin & Baskin, 1998). A análise da qualidade fisiológica de sementes tem sido um dos aspectos mais estudados ultimamente, devido a mudanças degenerativas de origem bioquímicas, fisiológicas e

estruturais as quais podem interferir no desenvolvimento da planta (Binotti et al., 2008).

Apesar de *P. sellowiana* ser uma espécie nativa e de grande potencial fitoterápico a falta de subsídios sobre a biologia do desenvolvimento da semente, restringe as alternativas não somente de uso, mas também para a conservação desta espécie. A utilização e a valoração de espécies nativas requerem conhecimentos básicos sobre a propagação e manejo dessas espécies (Miranda et al., 2012). Aliadas a estas demandas, necessárias para a conservação, o conhecimento sobre a biologia do desenvolvimento das sementes e germinação é imprescindível para o armazenamento de espécies em bancos de germoplasma (Bespalhok et al., 2007; Rogge-Renner et al., 2013). O conhecimento desse processo é também importante para garantir material genético de alta qualidade fisiológica (Shibata et al., 2013). Este material pode servir de base para programas de melhoramento genético, para a conservação de germoplasma e recuperação de áreas degradadas bem como pode ser utilizado para estudos bioquímicos e fisiológicos (Figliolia & Kageyama, 1994). Neste sentido, este trabalho propõe-se estudar aspectos da qualidade fisiológica e histoquímicos de sementes de *P. sellowiana* visando gerar informações que permitam a propagação e promovam o desenvolvimento de estratégias de conservação da espécie.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estudar aspectos da qualidade fisiológica e morfohistológicos de sementes de *P. sellowiana* visando gerar subsídios para a propagação e a possível conservação desta espécie.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a qualidade fisiológica e a dinâmica de germinação das sementes de *P. sellowiana* por meio de testes de vigor e viabilidade.
- Caracterizar a morfohistologia das sementes e o início da germinação de *P. sellowiana*.

3. Material e métodos

3.1. Coleta de Sementes

As coletas das sementes foram realizadas no alto da Serra da Boa Vista, no município de Rancho Queimado (27°40'10.9" de latitude sul e 49°09'26.6" de longitude oeste), Santa Catarina, Brasil (Figura 2) no mês de novembro de 2014.



Figura 2. Localização geográfica do local de coleta da espécie: Serra da Boa Vista, município de Rancho Queimado/SC.

3.2. Amostragem

Após coletadas, as inflorescências permaneceram expostas em bandejas plásticas a temperatura ambiente até a deiscência das sementes. Após a deiscência, as sementes foram isoladas manualmente das folhas e ramos e submetidas às avaliações histológicas e fisiológicas. A amostra de trabalho foi obtida a partir da mistura das sementes coletadas em um lote e a partir deste foram separadas as amostras utilizadas. O peso de mil sementes foi obtido a partir da contagem ao acaso de dez repetições com 100 sementes cada e em seguida medidas em balança de precisão (Brasil, 2009). As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica, CCB – Universidade Federal de Santa Catarina.

3.3. Qualidade Fisiológica e Germinação

3.3.1. Conteúdo de água na semente

Para a avaliação do conteúdo inicial de água das sementes foram tomadas, aleatoriamente, 5 repetições de 100 sementes, obtendo-se a sua massa inicial e a final após secagem em estufa a 80°C, durante 24 horas e 48 horas (Brasil, 2009). Após esse procedimento a massa foi avaliada em balança de precisão. O conteúdo de água foi expresso em base úmida, segundo a fórmula: % de Umidade (U) = $100 \times (P-p) / P$

Onde: P= massa inicial da amostra e p = massa da amostra após secagem em estufa.

Cinco repetições de 100 sementes foram embebidas entre papel filtro encharcado, a 5°C por 24h para a obtenção da massa saturada.

3.3.2. Teste do Tetrazólio

Para o teste do tetrazólio três amostras de sementes intactas (25 sementes cada) e três amostras de sementes escarificadas, com auxílio de pinça, (25 sementes cada) foram embebidas em água durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 e 24 horas resultando em vinte tratamentos (Tabela 1). Em seguida as amostras foram imersas em solução de Cloreto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio 0,1% (TTC) a 25°C por 1 hora (Oliveira et al., 2009). As sementes foram classificadas em viáveis ou inviáveis de acordo com a coloração e aspecto dos tecidos, extensão dos danos, e pela localização destas colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento.

Tabela 1. Tratamentos (vinte) anteriores ao Teste do Tetrazólio de sementes de *P. sellowiana*. Horas de embebição em água (0 a 24h). Sementes escarificadas: estruturas externas submetidas a escarificação (com pinça). Sementes intactas: sem nenhum tipo de interferência física. n=3

Horas de embebição	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	12h	18h	24h
Sementes Escarificadas	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Sementes Intactas	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20

3.3.3. Teste de Germinação

Para o teste de germinação foram avaliadas as sementes intactas e escarificadas (com o auxílio de uma lixa nº500) na presença e ausência de ácido giberélico (GA3) 500 µM. Para isso foram utilizadas 5 repetições de 25 sementes para cada um dos tratamentos.

As amostras submetidas ao teste de germinação passaram por prévia desinfestação com álcool 70% por 20 segundos, e em seguida com solução de hipoclorito de sódio (1%, v/v), por 1 minuto. Após, as sementes foram inoculadas em caixas tipo gerbox com papel filtro umedecido. As caixas contendo as sementes foram acondicionadas em câmaras de germinação, do tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) em temperatura de 25°C com diferentes fotoperíodos: 24 horas, 10 horas e 0 horas de luz (Brasil, 2009; Mattana et al., 2010). A contagem da germinação das sementes foi realizada diariamente. Considerou-se como germinadas as sementes com a protrusão da radícula (Borghetti & Ferreira, 2004; Bewley et al., 2013). A combinação dos fatores avaliados resultou em doze diferentes tratamentos representados na Tabela 2.

Tabela 2. Tratamentos aplicados ao teste de germinação de sementes de *P. sellowiana*. Os números 1 a 12 se referem aos tratamentos resultantes da combinação dos diferentes fatores.

Fotoperíodo (Horas de luz)	Tratamentos			
	Escarificadas (com lixa)		Intactas	
	Água	GA ₃	Água	GA ₃
24 horas	T1	T4	T7	T10
10 horas	T2	T5	T8	T11
0 horas	T3	T6	T9	T12

3.3.4. Índice de velocidade de germinação – IVG

As contagens foram realizadas diariamente, a partir do início da germinação, e os dados foram utilizados para cálculo de IVG segundo a equação proposta por Maguire (1962):

$$IVG = (G1/N1) + (G2/N2) + \dots + (Gn/Nn)$$

Onde:

G1, G2 e Gn: número de sementes germinadas do primeiro ao último dia do experimento;

N1, N2 e Nn: número de dias após instalação do teste.

3.4. Análises Morfohistológicas

3.4.1. Microscopia Óptica

A confecção de lâminas permanentes ocorreu no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (BEG/CCB/UFSC), para isto, as amostras de sementes sem a presença de tegumento foram fixadas com paraformaldeído (2,5%), em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,2) durante 24 horas no vácuo (Bouzon, 1993). Após, foram realizadas 3 lavagens com tampão fosfato de sódio (0,1M, pH7,2) por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica gradual (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, 3 lavagens de 15 minutos em cada solução). A pré-infiltração das amostras foi realizada, inicialmente, com uma mistura 1:1 de etanol 100% e historesina Leica® durante 12h; posteriormente o material foi infiltrado em historesina pura por 24h. A inclusão foi realizada com historesina e adição de polimerizador (Leica Historesina, Heidelberg, Germany), à temperatura ambiente, por 24h (Gerrits & Smid, 1983).

As secções transversais e longitudinais (5µm) foram obtidas em micrótomo rotativo Leica modelo RM 2135 (Leica, Nussloch, Alemanha) com lâminas de tungstênio, e distendidas sobre lâminas contendo água em chapa aquecedora (40°C).

Para a análise histoquímica as lâminas foram coradas com azul de toluidina a 0,5% (O' Brien et al., 1964) a fim de identificar os fenóis e polissacarídeos ácidos. Para coloração de proteínas totais utilizou se o reagente Azul Brilhante de Comassie a 0,4% em solução etanólica acidificada de Clark (Gahan, 1984). O ácido periódico de Schiff foi utilizado para identificação de polissacarídeos neutros (Gahan, 1984). A dupla coloração PAS e CBB também foi realizada para melhor visualização das estruturas.

Azul de toluidina 0,5% (ATO): Gotas de corante foram adicionadas sobre o material. O corante agiu por 30 segundos. Em seguida as lâminas foram lavadas em um fio de água, e colocadas para secar ao ar.

Azul Brilhante de Comassie (CBB): foi adicionado CBB 0,4% sobre as lâminas, a reação ocorreu por 30 minutos. Após, as amostras foram lavadas com solução de Clark (75% álcool p.a. e 25% ácido acético), até retirar o excesso do ácido, e em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada, para reidratar e posteriormente colocadas para secar ao ar.

Ácido Periódico de Schiff (PAS): as lâminas foram colocadas em recipiente fechado (cuba), foi adicionado ácido periódico que reagiu por

20 min. Após esse período, a solução foi retirada, e as lâminas foram lavadas por 10 minutos em água corrente. Posteriormente foi adicionado o reagente de Schiff o recipiente foi fechado com papel alumínio (reação ocorre no escuro) por 20 minutos. Após, as lâminas foram lavadas com água destilada, para retirada do reagente e secaram.

As lâminas permanentes foram confeccionadas com bálsamo do Canadá. As imagens foram capturadas com auxílio do Microscópio Leica DM 500 acoplado ao sistema de fotomicrografia OPTHD 14mp.

3.5. 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 escarificadas e determinado o ponto máximo desta equação. Para o teste de germinação os dados foram analisados em esquema fatorial.

As análises foram realizadas utilizando-se o programa Statistica versão Ultimate Academic.

4. Resultados e Discussão

4.1. Conteúdo de Água da Semente

As sementes de *Polygala sellowiana* logo após a coleta, apresentaram conteúdo de água de 12,5%, com uma massa seca de 35 mg e uma massa fresca de 40 mg. Estes resultados foram muito próximos aos encontrados para *Hymenaea martiana* e *Hymenaea courbaril*, onde se obteve, respectivamente, 14,09% e 14,19% de conteúdo de água (Souza et al., 2015) e ao contrário de sementes recalcitrantes de *Eugenia dysenterica* que apresentam valores elevados de conteúdo de água (47-53%) (Andrade et al., 2003).

A análise da massa saturada demonstrou que após 24 horas de embebição houve um aumento de 24% no peso fresco das sementes (Figura 3).

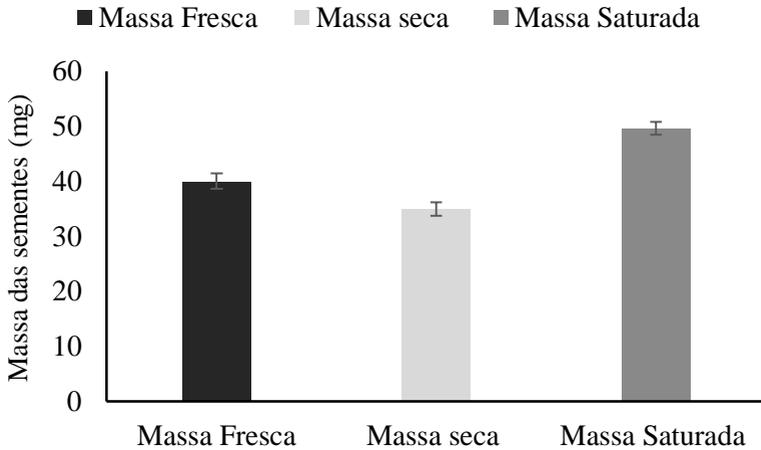


Figura 3. Gráfico de massas fresca, seca e saturada de sementes de *P. sellowiana*. (Eixo y massa de 100 sementes). Barras: desvio padrão. n=100.

4.2. Teste do Tetrazólio

O teste do tetrazólio (TTC) indicou a viabilidade de sementes de *P. sellowiana*. No entanto, a reação positiva ocorreu com maior porcentagem nas sementes escarificadas (Figura 4).

Constatou-se um aumento da reação de acordo com as horas de embebição sendo a resposta polinomial descrita pela $y = -0,798x^2 + 13,424x + 43,156$ ($R^2=0,9482$), o qual o seu ponto de máximo indicou que: a melhor quantidade de horas para embebição das sementes de *P. sellowiana*, antes da realização do teste do tetrazólio, é de 8 horas e 24 minutos.

O teste de tetrazólio é um teste bioquímico, que se baseia na atividade de enzimas desidrogenases que promovem a liberação de íons H^+ , durante a respiração celular, estes íons precipitam o tetrazólio em um composto chamado formazam (de coloração vermelha) (Piña-Rodrigues et al., 2004). Os tecidos corados em vermelho indicam que as células estão respirando, já os tecidos mortos não reagem com o sal de tetrazólio (Peske et al., 2003).

Estes resultados indicam que para a aplicação do teste de tetrazólio nas sementes de *P. sellowiana* é necessário o rompimento do tegumento, expondo os tecidos internos permitindo a embebição e a reação com a solução de tetrazólio. Isto permite a posterior avaliação das estruturas viáveis, como observado no tratamento de sementes escarificadas (Figura 5). Sugere-se que o tegumento dificulta a absorção da solução de tetrazólio o que inviabiliza a aplicação deste teste em sementes intactas. O mesmo resultado foi encontrado para sementes de *Jatrophas curcas* L. (Brenha et al., 2012) onde não houve coloração das sementes (pré embebidas e com tegumento) imersas na solução de tetrazólio, indicando que a presença do tegumento impede a penetração da solução. Apesar de servir como uma via de troca entre os meios interno e externo da semente, ao longo do seu desenvolvimento o tegumento pode lignificar-se, suberizar-se ou cutinizar-se dificultando as trocas de gases, de água e de solutos entre a semente e o meio (Cardoso, 2008).

4.3. Teste de Germinação

Observou-se que a germinação de *P. sellowiana* ocorreu entre o sexto e o sétimo dia após a implantação do experimento, para as sementes tratadas com GA3 e estabilizou em torno do 25° ao 30° dia de avaliação, variando de acordo com o tratamento (Figura 6 A, B, C). Para o fotoperíodo de 24 horas (Figura 6A) e fotoperíodo de 10 horas (Figura 6B) foi observada uma porcentagem de germinação de 90,4% e 91,6% respectivamente para as sementes tratadas com GA3, independente do tratamento de escarificação. Já para o fotoperíodo de 0 horas (Figura 6C) foi observado 86% de germinação para as sementes intactas e 84% para sementes escarificadas quando tratadas com GA3. No entanto, independente da escarificação e do fotoperíodo aplicado todos os tratamentos em que as sementes foram tratadas com GA3 apresentaram uma porcentagem de germinação superior as sementes do tratamento sem a adição do GA3 (Figura 6 A, B, C).

Análise de variância indicou efeitos significativos dos tratamentos utilizados bem como a interação entre os diferentes fatores avaliados para a germinação e para o índice de velocidade de germinação (Tabela 3). Foi observado que para germinação a análise foi significativa para a presença de GA3 e para interação entre GA3 e fotoperíodo. Já para o IVG foi observado efeito significativo na grande maioria dos fatores e interações testadas exceto para a interação entre o estado do tegumento (E) e fotoperíodo (F) bem como na interação deste dois com o GA3.

Tabela 3: Resumo da análise de variância referente à germinação (G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *P. sellowiana*.

FV	GL	QM	
		G	IVG
Estado tegumento (E)	1	0,3NS	0,26533*
Hormônio (GA3)	1	117926,7*	36,03507*
Fotoperíodo (F)	2	31,2NS	0,11939*
E x GA3	1	0,3NS	0,25034*
E x F	2	13,1NS	0,01185NS
GA3 x F	2	57,9*	0,12674*
E x GA3 x F	2	3,5NS	0,00862NS

FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade; QM: Quadrado Médio; ns: não significativo; * significativo a 5% de probabilidade; Estado do tegumento (escarificado ou intacto); Hormônio: Com ou sem GA3; Fotoperíodo: 24, 10 e 0 horas de luz.

Os desdobramentos das porcentagens de germinação as quais foram significativas na análise de variância estão apresentados na Tabela 4. Foram observados os maiores valores de porcentagem de germinação em sementes tratadas com GA3 associadas ao fotoperíodo de 24H (90,4 %) e 10H (91,6 %). Já para o fotoperíodo de 0H foi observado 86% de germinação, diferindo significativamente dos fotoperíodos anteriormente mencionados. Adicionalmente foi observado que independente do fotoperíodo a presença de GA3 influenciou significativamente os valores médios de germinação (89,33 %) das sementes de *P. sellowiana* comparativamente ao tratamento controle (0,67%) (Tabela 4).

O maior valor do índice de velocidade de germinação (1,69) foi observado para sementes intactas na presença de GA3 (Tabela 5). A escarificação reduziu significativamente o IVG (1,42) mesmo na presença de GA3. Os valores médios de germinação (1,55) independente do estado tegumento indicam que a presença de GA3 influencia significativamente o IVG comparativamente a ausência deste fator (0,005) (Tabela 5). Estes resultados são similares aqueles observados em fruta-do-conde e variedades de atemóia onde os valores de IVG foram significativamente superiores para as sementes tratadas com GA3 (50 e 100 ppm) (Stenzel et al., 2003).

O valor de IVG (1,74) foi significativamente influenciado pela interação entre fotoperíodo de 10H e a presença de GA3 (Tabela 6). Adicionalmente por meio da análise desta interação foi observado que os valores médios de IVG (1,55) na presença de GA3 foram significativamente superiores quando comparados a ausência deste fator (0,05) independente do fotoperíodo utilizado (Tabela 6). Estes resultados indicam que o fotoperíodo interage com GA3 e influencia o IVG em sementes de *P. sellowiana*.

Segundo Guerra & Rodrigues (2013) o GA3 age no enfraquecimento dos tecidos ao redor da radícula, ajudando na superação da barreira mecânica conferida pelo tegumento da semente, muitas vezes responsável por alguns tipos de dormência das sementes. Outra função sugerida por estes mesmos autores para este hormônio é que ele estaria

ligado ao aumento do potencial de crescimento do embrião, incluindo o controle do crescimento do eixo embrionário e de tecidos em desenvolvimento. Sua ação está relacionada à diminuição da expressão de genes responsivos ao ácido abscísico (que reprime a síntese de enzimas hidrolíticas que são essenciais para a quebra das reservas da semente durante a germinação), bem como pela indução de outros relacionados ao etileno e a auxina e, portanto, relacionados ao crescimento da plântula. Ainda se considera que a germinação de algumas sementes de espécies não domesticadas é dependente de luz ou de baixas temperaturas cujos efeitos podem ser substituídos pelo ácido giberélico exógeno. Neste trabalho o GA3 mostrou-se diretamente envolvido com a germinação de sementes de *P. sellowiana*. Adicionalmente os resultados indicam a presença de um dos tipos de dormência observados em sementes. Para sementes de *Annona crassiflora* Mart. a quebra de dormência (relacionada a fatores endógenos) foi promovida pela presença de GA3 em testes de germinação (Pereira et al., 2004) semelhante ao observado no presente trabalho. Contudo para confirmar o tipo de dormência e a relação com o GA3 novos trabalhos precisam ser realizados incluindo fatores adicionais como a alternância de temperaturas.

Foram observados dois tipos de características morfológicas externas para as plântulas provenientes das sementes germinadas (Figura 7 A, B).

As sementes que germinaram com o GA3 e fotoperíodo de 24H ou 10H apresentam plântulas normais, de acordo com Brasil (2009) com sistema radicular bem desenvolvido (raiz primária longa e com pelos absorventes), parte aérea bem desenvolvida com dois cotilédones verdes, folhas primárias e gema apical (Figura 7A). As sementes germinadas sob fotoperíodo de 0H, que apresentaram plântulas estioladas, com hipocótilo muito alongado, cotilédones não expandidos e amarelados (escotomorfogênese) (Figura 7B).

A escotomorfogênese é caracterizada por uma aparência estiolada nas mudas com um rápido crescimento do hipocótilo ou epicótilo, presença de um gancho apical, e cotilédones pequenos ou folhas primárias fechadas. Além disso, estas plântulas apresentam etioplastos em vez de cloroplastos (Alabadí et al., 2004). A presença de luz tem efeitos sobre o desenvolvimento, por exemplo algumas sementes germinam apenas à luz, e as giberelina, exógenas, podem estimular a germinação no escuro (Taiz & Zeiger, 2009). Diante disto e com base nos resultados apresentados o fator luz isoladamente não promoveu a germinação das sementes. Isto só foi possível quando o GA3 foi adicionado sugerindo um tipo de dormência endógena relacionada a este

hormônio. No entanto, fatores como a alternância de temperatura ainda devem ser testados para que o processo de germinação de *P. sellowiana* seja melhor compreendido.

4.4. Caracterização Morfohistológica

Macroscopicamente foi observado que após a coleta das inflorescências (Figura 8A) as sementes demoram aproximadamente 7 dias para serem liberadas. Sementes deiscentes apresentaram formato elipsoide e coloração externa marrom escura (Figura 8B). Notou-se a presença de tegumento piloso com dois apêndices membranáceos na base da semente (Figura 8B). Estas características confirmam aquelas já descritas por Lüdtke (2008) para *P. sellowiana* assim como sementes pubescentes, elipsoides, 1,2-2,2 mm de comprimento, com apêndice membranáceo profundamente bilobado e presença de elaiossomo. O peso de mil sementes (PMS) de *Polygala sellowiana* é de 0,405g. De acordo com Brasil (2009) as sementes que apresentam PMS menor que 200 gramas são consideradas sementes pequenas.

Ainda neste trabalho foi observada a presença do elaiossomo que é caracterizado por uma estrutura membranácea carnosa localizada na base do apêndice (Figura 8C).

O elaiossomo ocorre também em sementes de Amaryllidaceae, Liliaceae e pode ser um apêndice do exóstoma (micrópila), da rafe ou da calaza (Paoli, 2006).

Segundo Castro et al. (2010) plantas do gênero *Polygala* L. desenvolveram síndromes de dispersão distintas relacionadas com mecanismos de dispersão específicos como a mirmecocoria que está diretamente relacionada com a presença do elaiossomo, que atrai formigas devido à sua riqueza em lipídios e semelhança química para hemolinfa do inseto. Segundo a mesma autora a dispersão pode não ocorrer em longas distâncias devido ao tamanho do inseto, mas ainda assim é caracterizada como uma relação mutualística já que a formiga se beneficia dos recursos nutritivos do elaiossomo e a planta lucra com a dispersão das sementes.

4.5. Microscopia Óptica

A análise histológica das sementes sem a presença do tegumento evidenciou a presença de duas principais estruturas: uma mais externa o endosperma (en) e internamente, o embrião (Figura 9A). Foi observado que as células do endosperma apresentavam formato irregular, variando de formas cúbicas a arredondadas (Figura 9B). A reação de metacromasia, por meio da coloração com Azul de Toluidina (ATO), nas paredes celulares (cor púrpura) indica a presença de polissacarídeos e/ou pectinas, que também foram vistas na região que reveste o endosperma (Harris et al., 1994).

A semente apresenta embrião reto, formado por dois cotilédones (co) e duas regiões meristemáticas (Figura 9A). Os núcleos das células do meristema radicular apresentaram forte reação ao ATO comparativamente as outras células do eixo embrionário (Figura 9A). Não foi possível a identificação das características das células do meristema apical (ma). No entanto sugere-se que ele esteja posicionado na região entre os dois cotilédones (Figura 9A). Nas células do cotilédone embrionário (co) também são visíveis compostos de reserva.

O resultado observado para o embrião de *P. sellowiana* está de acordo com o descrito por Evert & Esau (2006) para embriões maduros de dicotiledôneas, onde, há um número limitado de partes: porção caulinar com cotilédones, a plúmula (meristema apical) e na sua

extremidade apical inferior há o eixo radicular (representada pelo seu meristema radicular).

Os cortes submetidos a reação com PAS apresentaram somente reação positiva evidente na parede celular (polissacarídeos neutros), ocorrendo tanto nas células do embrião quanto nas células do endosperma, com um pouco mais de intensidade nas células periféricas desta última estrutura (Figura 10A). A coloração da parede celular, mais evidente ao redor do endosperma, ocorreu pela presença de celulose, proveniente de um vestígio do tegumento (Figura 10A).

A coloração pelo CBB (Figura 10B) demonstrou a grande quantidade de proteínas em ambas as estruturas da semente. A reação positiva dos grânulos ao CBB sugere uma natureza proteica a esses grânulos, muito provavelmente ácida, já que também há regiões dos

grânulos coradas pelo azul de toluidina sendo que a quantidade de proteína na semente mostra-se uniforme tanto nas células do endosperma quanto nas células do embrião. Proteínas totais são o principal mecanismo de reserva da semente as quais possivelmente serão utilizadas para a nutrição do embrião e posterior mobilização para o desenvolvimento da plântula (Carvalho & Nakagawa, 2012).

5. Conclusões e considerações finais

A partir do estudo da fisiologia das sementes, no presente trabalho, foi possível identificar características morfohistológicas e fisiológicas das sementes de *P. sellowiana* indicando padrões estruturais da semente bem como de qualidade fisiológica e do processo de germinação para esta espécie. Foi observado que:

1) Para a realização do teste do tetrazólio em sementes de *P. sellowiana* é necessária uma embebição prévia de 8 horas e 24 minutos em água destilada. As sementes devem ser pré-embebidas com o tegumento e posterior rompimento do mesmo para a imersão na solução de tetrazólio.

2) É necessária a aplicação de ácido giberélico nas sementes de *P. sellowiana* para induzir a germinação, indicando um possível tipo de dormência endógena. Foi observado que a aplicação do ácido giberélico influencia a porcentagem de germinação e o IVG com valores significativamente superiores aos tratamentos controle.

3) É desnecessária a escarificação do tegumento de sementes de *P. sellowiana*, pois a mesma não interfere na germinação de sementes desta espécie.

4) A caracterização morfohistológica permitiu identificar que a semente sem tegumento é composta de endosperma e embrião reto formado por dois cotilédones e eixo hipocótilo radicular. Adicionalmente foi observado que as substâncias de reserva predominantes nas sementes de *P. Sellowiana* são proteínas.

Os resultados preliminares obtidos por este trabalho para as sementes de *P. sellowiana* servirão como base para futuros trabalhos desta espécie em nosso laboratório. Serão realizadas análises histológicas adicionais bem como novas avaliações sobre a fisiologia da semente e germinação desta semente. Fatores como a alternância de temperatura ainda devem ser testados para que o processo de germinação de *P. sellowiana* seja melhor compreendido.

Apesar deste trabalho não ter sido ainda submetido a publicação na forma de artigo este já foi divulgado na forma de resumo no 66º Congresso Nacional de Botânica. A continuidade dos estudos com esta espécie contribuirá para o estabelecimento de estratégias de cultivo e ou conservação desta espécie. Ainda neste sentido o estabelecimento destas estratégias pode contribuir para a cadeia produtiva e uso desta espécie como planta medicinal.

6. Referências Bibliográficas

AGUIAR, A.C.A. 2008. **Estudos morfológicos em cinco espécies de *Polygala L. (Polygalaceae)* com ênfase nas estruturas secretoras.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 220p.

AGUIAR-DIAS, A.C.A.; YAMAMOTO, K., CASTRO, M.M. 2012. Anatomia foliar de cinco espécies de *Polygala* de restinga e cerrado. **Rodriguésia** 63(2) 395-404.

ALABADÍ, D.; GIL, J.; BLÁZQUEZ, M.A; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. 2004. Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. **Plant Physiol.** 134, 1050–1057.

ANDRADE, A.C.S.; CUNHA, R.; SOUZA, A.F.; REIS, R.B.; ALMEIDA, K.J. 2003. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.31, n.1, p.125-137.

ANDRADE, D. F.; OGLIARI, P. J. 2010. **Estatística para as ciências agrárias e biológicas: com noções de experimentação.** 3. ed. rev. e ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC. 475 p.

BASKIN, J.M.; BASKIN, C. 1998. **Seeds, ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination.** New York. Academic Press. 666p.

BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. **Uso e conservação de Germoplasma.** In: BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Melhoramento de Plantas. UFPR. Disponível em<www.bespa.agrarias.ufpr.br>, p.21-28. Acessado em 01 se setembro de 2015.

BEWLEY, J.D. 1997. Breaking down the walls – a role for endo-B-mannanase in release from seed dormancy? **Trends in plant science.** 2(12), 464-469.

BEWLEY, J.D., BRADFORD, K.J., HILHORST, H.W.M., NONOGAKI, H. 2013. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**, 3rd Ed. New York: Springer

BINOTTI, F.F.S.; HAGA, K.I.; CARDOSO, E.D.; ALVES, C.Z.; SÁ, M.E.; A.R.F, O. 2008. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Acta Sci Agron.** 30 (2), 247-254.

BORGES, F. R. M.; SILVA, M.D.; CÓRDOVA, M.M.; SCHAMBACH, T.R.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S. 2014. Anti-inflammatory action of hydro alcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. **Journal of Ethno pharmacology** 151, 144-150.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. 2004. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F (org.). **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre, p. 209-222.

BOUZON, Z.L. 1993. **Aspectos histoquímicos e ultraestruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales- Rhodophyta).** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 66 pp.

BRASIL. 2009. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Brasília: Mapa/ACS, 399 p

BRENHA, J., OLIVEIRA, N., CÂNDIDO, A., GODOY, A., & ALVES, C. 2012. Tetrazolium Test In Seeds Of *Jatrophas curcas* L.. **Visão Acadêmica**, 13(4).

CARDOSO V. J. M. Germinação. In: KERBAUY, G. B. 2008. **Fisiologia vegetal.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

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

CASTRO S.; FERRERO V.; LOUREIRO J.; ESPADALER X.; SILVEIRA P.; NAVARRO L. 2010. **Dispersal mechanisms of the narrow endemic *Polygala vayredae*: dispersal syndromes and spatio-temporal variations in ant dispersal assemblages.** *Plant Ecology.* 207, 359-372.

CRISTIANO, R.; PIZZOLATTI, M.G.; DELLEMONACHE, F.; REZENDE, C.M.; BRANCO, A. 2003. Two xanthenes from *Polygala paniculata* and confirmation of the 1-hydroxy 2,3,5-trimethoxy-xanthone at trace level by HRGC-MS. **Z. Naturforsch.** 58, 490–494.

DUARTE, F. S. 2007. **Participação das dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas nas ações centrais do tipo-benzodiazepínicas da planta *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae) em roedores.** Florianópolis. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

EVERT, R. F; ESAU, K. 2006. **Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body : their structure, function, and development.** New Jersey: John Wiley & Sons. 601 pp.

FIGLIOLIA, M. B.; KAGEYAMA P.Y. 1994. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook.et Arn. em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, município de Moji-Guaçu SP. **Revista Instituto Florestal.** 6, 13-52.

GAHAN, P.B. 1984. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction.** Academic Press. London 301 pp.

GERRITS, P.O.; SMID, L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy** 132:81-85.

GUERRA, M.P.; RODRIGUES M.A. Giberelinas In: KERBAUY, G. B. 2008. **Fisiologia vegetal.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

HARRIS N.; SPENCE J.; OPARKA K.J. 1994. General and enzyme histochemistry. In **Plant Cell Biology: A Practical Approach.** Harris N.; Oparka K.J.; Oxford, UK: IRL Press, pp. 51–68.

LISCI, M.; BIANCHINI, M.; PACINI, E. 1996. Structure and function of the elaiosome in some angiosperm species. **Flora** 191, 131-141.

LÜDTKE, R. 2008. **A família Polygalaceae na Região Sul do Brasil.** Tese. Departamento de Botânica UFRGS.

LÜDTKE, R.; SOUZA-CHIES, T. T.; MIOTTO, S. T. S. 2013. O gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) na região Sul do Brasil. **Hoehnea** 40(1), 1-50.

MAGUIRE, J.D. 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, 2 (1),176-177.

MARCOS FILHO, J. 2005. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 495p.

MARCOS FILHO J.; BRANCALION P.H.S. 2008. **Distribuição da germinação no tempo: causas e importância para a sobrevivência das plantas em ambientes naturais**. ABRATES, 1,2,3 (18), 11-17.

MARQUES, M.C.M.; AGUIAR, A. C. A. 2007. *Polygala fontenella* Marques e Aguiar (Polygalaceae), uma nova espécie para o Brasil. **Rodriguésia** 58 (1) 013-016.

MATTANA, E.; DAWS, M. I.; FENU, G.; BACCHETTA, G. 2010. Ecological and morphological seed traits of *Polygala sardoa* and *P. sinisica*: A comparative study on two endemic species of Sardinia. **Flora** 205, 825-831.

MENDES, B.G. 2008. ***Polygala sabulosa* A. W. Bennett: obtenção de estirílpironas e cumarinas, preparo de análogos e ensaios de atividades biológicas**. Tese. Departamento de Química UFSC.

MIRANDA, C. C.; SOUZA, D.M.S; MANHONE, P.R.; OLIVEIRA, P.C.; BREIER, T. B. 2012. Germinação de sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. Com diferentes substratos em condições laboratoriais. **Floresta e Ambiente** 19(1), 26-31.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma** 59(2), 368-373.

OLIVEIRA, C.M.G.; MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J. 2009. Concentração da solução de tetrazólio e período de coloração do teste para sementes de mamoneira. **Revista Brasileira de Sementes**, 31 (3), 38-47.

PAOLI, A. A. S. Semente In: SOUZA, L. A. 2006. **Anatomia do fruto e da semente**. Ponta Grossa: Ed. UEPG, 196p.

PASTORE, J.F.B. 2014. Saint-Hilaire's Polygalaceae. **Phytotaxa** 158(3): 201–223.

PEREIRA, E. B. C. PEREIRA, A. V. MELO, J. T. SOUSA-SILVA, J. C. FALEIRO, F. G. 2004. **Quebra da dormência de Sementes de Araticum**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 15p

PESKE, S. T.; ROSENTHAL, M. D'AVILA; ROTA, G. R. M. 2003. **Sementes: Fundamentos Científicos e Tecnológicos**. Pelotas: Rua. 415p.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FILGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). 2004. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. p.283-297.

PIZZOLATTI, M. G.; LUCIANO, C.; MONACHE, F.D. 2000. Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrones derivatives from *Polygala sabulosa*. **Phytochemistry** 55, 819-822.

ROCHA, J.L.C.; PASTORE, J.F.B.; BRANDÃO, H.N.; AZEREDO, A.; DAVID, J.P.; SANTOS, E.O.; DAVID, J.M. 2012. Quantificação de salicilato de metila em quatro gêneros de Polygalaceae, por CLAE-DAD. **Química Nova** 35 (11) 2263-2266.

ROGGE-RENNER, G.D., STEINER, N., SCHIMIDT, E.C., BOUZON, Z.L., FARIAS, F.L., GUERRA, M.P. 2013. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze zygotic embryo. **Protoplasma** 250, 731-739.

SHIBATA, M.; COELHO, C.M.M.; STEINER, N. 2013. Physiological quality of *Araucaria angustifolia* seeds at different stages of development. **Seed Science and Technology** 41, 214-224.

SOLDI, C.; MORO, A.V.; PIZZOLATTI, M.G.; CORREIA, C.R.D. 2012. Heck–Matsuda Arylation as a Strategy to Access Kavalactones

Isolated from *Polygala sabulosa*, *Piper methysticum*, and Analogues. **European Journal Organic Chemistry**, 3607–3616.

SOUZA, P. F.; SANTANA, R. C.; FERNANDES, J. S. C.; OLIVEIRA, L. F. R.; MACHADO, E. L. M.; NERY, M. C.; OLIVEIRA, M. L. R. 2015. Germinação e crescimento inicial entre matrizes de duas espécies do gênero *Hymenaea*. **FLORAM - Revista Floresta e Ambiente**.

STENZEL, N. M. C.; MURATA, I. M.; NEVES, C. S. V. J. 2003. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 305-308.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2009. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed. 819p

WURDACK, J. J. & SMITH, L. B. 1971. **Parte I Flora ilustrada de Santa Catarina (Polygalaceae)**. Itajaí. 28-31.