

MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DE CARBONO EM *ERYTHRINA* *VELUTINA* DURANTE E APÓS A GERMINAÇÃO

Diego Augusto Azevedo da Silva¹
Herley Carlos Bezerra de Oliveira²
Ana Paula Brito de Araújo³
Thadeu Martins Feitosa⁴
Eduardo Luiz Voigt⁵

INTRODUÇÃO

A Caatinga é um bioma unicamente brasileiro, distribuído principalmente no semiárido nordestino. Este bioma é dominado por espécies arbóreas e arbustivas de pequeno porte com características xerofíticas, apresentando patrimônio biológico diversificado com ocorrência de espécies endêmicas (Pinheiro e Nair, 2018). Estima-se que a Caatinga está reduzida em 50% da sua área original devido à pressão antrópica, especialmente envolvendo atividades extrativistas (Dantas et al., 2014). De fato, o desflorestamento visando o uso de áreas para práticas agrícolas tem resultado na fragmentação da vegetação sob a forma de mosaico, em diferentes estágios de regeneração natural (Rodrigues et al., 2018).

Tendo em vista o processo de degradação do bioma, espécies da família Fabaceae vêm recebendo atenção por causa do seu papel ecológico como pioneiras (Rodrigues et al., 2018). A *Erythrina velutina* Willd, popularmente conhecida como mulungu, é uma espécie nativa da Caatinga, heliófila, decídua, comumente encontrada em formações secundárias e recomendada para plantios mistos com fins de repovoamento (Carvalho, 2008).

A compreensão do processo germinativo desta espécie é fundamental, pois este período é decisivo para a sobrevivência da plântula, já que ela está suscetível a estresses ambientais, como escassez de água e a herbivoria (Soriano et al., 2013). Este processo tem seu início com a absorção de água pela semente, propiciando a reativação do metabolismo e culminando com a emissão da radícula (Rosental et al. 2014). A partir deste ponto, inicia-se o estabelecimento da plântula, evento marcado pela mobilização das reservas que fornecem precursores biossintéticos e energia metabólica para a plântula em desenvolvimento até que ela possa realizar a fotossíntese e se torne autotrófica (Gommers e Monte, 2017).

Neste sentido, o presente trabalho almeja caracterizar a mobilização das reservas de carbono nos diferentes órgãos da plântula ao longo da germinação da semente e do estabelecimento da plântula em *E. velutina*.

Para tanto, sementes obtidas de árvores matrizes foram escarificadas, desinfetadas, embebidas em água destilada, germinadas entre folhas de papel toalha sob condições controladas por até nove dias. As plântulas foram transferidas para água destilada em sistema hidropônico e foram cultivadas em casa de vegetação por até oito dias, coletando-se os cotilédones em estágios fisiológicos discretos, incluindo semente embebida, protrusão da radícula, emissão do hipocótilo, abertura do gancho plumular, emissão das folhas cordiformes e brotamento da primeira e da segunda folha trifoliolada.

As sementes de *E. velutina* apresentaram cerca de 20% de amido e 11,6% de lipídeos em base de MS. Estas reservas majoritárias foram mobilizadas de forma sincrônica e mais

¹ Mestrando do Curso de Ciências Florestais da UFRN - RN, diego_augusto16@hotmail.com;

² Graduando do Curso de Ciências Biológicas da UFRN - RN, herleycarl@gmail.com;

³ Graduando do Curso de Ciências Biológicas da UFRN - RN, brito_paula@outlook.com;

⁴ Graduando do Curso de Ciências Biológicas da UFRN - RN, tha_deu@hotmail.com;

⁵ Professor orientador: Doutor, Depto. de Biologia Celular e Genética da UFRN - RN, elvvoigt@cb.ufrn.br.

intensa a partir da abertura do gancho plumular, ao passo que os açúcares solúveis totais e não redutores foram utilizados a partir do estágio anterior, durante a emissão do hipocótilo. O esclarecimento destes processos pode auxiliar na compreensão das estratégias utilizadas por *E. velutina* para a colonização do ambiente como espécie pioneira da Caatinga.

METODOLOGIA

Sementes de *E. velutina* foram coletadas de cinco árvores matrizes localizadas na região de Acari (RN), beneficiadas manualmente, acondicionadas em sacos de papel pardo e mantidas em refrigerador. Estas sementes foram escarificadas mecanicamente com lixas, lavadas com detergente diluído 1:500 por 30 s e enxaguadas em água corrente. Em seguida, as sementes foram desinfetadas com etanol 70% (v/v) por 30 s e NaClO 0,25% (m/v) por 3 min, lavadas três vezes e embebidas por 2 h em água destilada estéril. A semeadura foi realizada entre folhas de papel toalha, do tipo Germitest®, dispostas na forma de rolos e as sementes foram incubadas sob condições controladas (radiação fotossinteticamente ativa de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 h e $28 \pm 2^\circ\text{C}$) por até nove dias.

Em um experimento do tipo curva de tempo, as plântulas foram transferidas para água destilada contida em vasos plásticos com capacidade para 1 L e estes sistemas hidropônicos foram cultivados em casa de vegetação por até oito dias, realizando-se coletas periódicas de acordo com estágios fisiológicos discretos. A germinação foi caracterizada no estágio de semente embebida (estágio I) e no de protrusão da radícula (estágio II). Durante o estabelecimento da plântula, foi possível caracterizar a emissão do hipocótilo (estágio III), a abertura do gancho plumular (estágio IV), a emissão do par de folhas cordiformes (estágio V) e o brotamento da primeira folha trifoliolada (estágio VI) e o da segunda (estágio VII). Nas coletas, os cotilédones foram pesados, acondicionados em envelopes de papel alumínio e congelados a -80°C até a realização das determinações bioquímicas.

A quantificação dos lipídios neutros (LN) foi realizada pelo método gravimétrico (Soxhlet, 1879). Amostras de cotilédones com aproximadamente 200 mg de massa seca (MS) foram maceradas em gral e pistilo e os LN foram extraídos com 8 mL de n-hexano a 60°C , durante 5 h, com agitação em vórtex a cada hora. O sobrenadante foi transferido para tubos do tipo Falcon previamente pesados. Após a evaporação do n-hexano em estufa a 80°C , a massa de LN foi calculada a partir da diferença entre a massa inicial e a final dos tubos e foi expressa em $\text{mg cotilédone}^{-1}$.

As lipases foram extraídas a partir de amostras de cotilédones congelados com 300 a 500 mg, as quais foram maceradas com 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,5 contendo 2-mercaptoetanol 0,01% (v/v). Depois da centrifugação a 10.000 xg por 20 min, os sobrenadantes foram coletados e utilizados como fontes de enzimas. Todos os procedimentos foram feitos a 4°C . A atividade de lipases foi determinada por meio da hidrólise de 4-nitrofenil-palmitato, gerando 4-nitrofenol no meio de reação (Marriott e Northcote, 1975). A atividade será calculada utilizando 4-nitrofenol como padrão e será expressa em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$.

Para extrair os metabólitos solúveis, amostras com 300 a 500 mg de cotilédones congelados foram fragmentadas com bisturi e extraídas com 4 mL de etanol 80% (v/v) a 60°C por 30 min. Depois da coleta dos sobrenadantes, os resíduos foram re-extraídos com 4 mL de etanol 80% (v/v) e uma última vez com mais 6 mL de etanol 80% (v/v) nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram coletados e reunidos, rendendo 14 mL de extrato por amostra. Os açúcares solúveis totais (AST) foram mensurados pelo método da antrona (Morris, 1948), empregando D-glicose como padrão. Os açúcares não redutores (ANR) foram quantificados por uma modificação do método da antrona (Van Handel, 1968), utilizando uma curva-padrão de sacarose. Os conteúdos de AST e ANR foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$.

O amido foi extraído a partir dos resíduos obtidos após a extração dos metabólitos solúveis. Estes resíduos foram macerados com 1,5 mL de HClO_4 30% (v/v) e os macerados foram centrifugados a 10.000 xg por 10 min. Os sobrenadantes foram coletados, enquanto que os precipitados foram extraídos com 1 mL de HClO_4 30% (v/v) por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram reunidos, perfazendo 3,5 mL de extrato por amostra. Estes procedimentos foram realizados a 4 °C. O amido foi quantificado pelo método da antrona (Morris, 1948), utilizando D-glicose como padrão. Os valores calculados foram multiplicados por 0,9 para conversão em amido (McCready et al., 1950) e os resultados foram expressos em $\text{mg cotilédone}^{-1}$.

As amilases foram extraídas de amostras congeladas de cotilédones com 300 a 500 mg por maceração com 1,5 mL de tampão acetato de potássio 100 mM pH 6,0 adicionado de CaCl_2 5 mM. Após centrifugação a 10.000 xg por 20 min, os sobrenadantes foram reservados e usados como fontes de enzimas. Estes procedimentos foram conduzidos a 4 °C. A atividade das amilases foi determinada pela liberação de açúcares redutores no meio de reação, tendo como substrato o amido solúvel (Elarbi et al., 2009). A concentração de açúcares redutores foi quantificada com o reagente do 3,5-dinitro-salicilato (DNS) (Miller, 1959), usando uma curva-padrão de D-glicose, e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$.

Ao longo dos experimentos, amostras foram coletadas aleatoriamente em cada um dos sete estágios fisiológicos estudados. A unidade experimental foi equivalente a uma plântula. Os resultados foram avaliados por estatística descritiva, utilizando média e desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas sementes de *E. velutina*, foram encontrados conteúdos significativos de LN, amido e ANR, como reservas de carbono. Quando estes conteúdos foram calculados como porcentagem de MS, foi possível verificar que o amido foi a reserva majoritária, perfazendo aproximadamente 20% da semente. O segundo maior conteúdo de reservas de carbono foi o de lipídeos, equivalente a cerca de 11,6%. Como esperado, os ANR foram as reservas minoritárias, representando em torno de 5,7% da semente.

Segundo os resultados deste trabalho, o amido foi a reserva mais frequente nas sementes de *E. velutina*, cerca de 20% em base de MS. Em comparação, Carvalho et al. (2011) inferiram que aproximadamente 10% da MS da semente é composta por carboidratos digestíveis. Novamente, discrepâncias nos conteúdos mensurados refletem a metodologia empregada, uma vez que neste estudo o amido foi quantificado pelo método químico McCready et al. (1950) e Carvalho et al. (2011) estimaram o conteúdo de carboidratos digestíveis por subtração de outros compostos determinados. Apesar disso, o conteúdo ANR, estimado neste trabalho em 5,7% da MS da semente, condiz com aqueles previamente determinados em sementes de outras espécies, os quais variam entre 2 e 6% em base de MS segundo Black et al. (2006).

Na semente embebida (estágio I), o conteúdo de amido foi equivalente a 40,7 $\text{mg cotilédone}^{-1}$, o qual se manteve praticamente inalterado até a abertura do gancho plumular (estágio IV). A mobilização do amido foi mais rápida entre a abertura do gancho plumular e a emissão das folhas cordiformes (estágio V), uma vez que o conteúdo desta reserva decaiu 64% durante este período. Em comparação, a mobilização do amido foi mais lenta a partir de então até o brotamento da segunda folha trifoliolada (estágio VII), tendo em vista que o conteúdo de amido foi igual a 14,4 $\text{mg cotilédone}^{-1}$ no estágio V e diminuiu para 9,1 $\text{mg cotilédone}^{-1}$ no final do experimento.

A atividade de amilases nos cotilédones apresentou um padrão bifásico de aumento. Na semente embebida, a atividade mensurada foi de 6,39 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$, a qual aumentou progressivamente até a emissão do hipocótilo, alcançando 11,61 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$. No

entanto, a atividade de amilases foi intensificada a partir da abertura do gancho plumular até o brotamento da segunda folha trifoliolada, atingindo $31,86 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$. Embora a atividade destas enzimas tenha aumentado em paralelo com a degradação do amido, é curioso que ela tenha se mantido alta mesmo nos estágios mais tardios do estabelecimento da plântula, quando o conteúdo de amido se manteve mais baixo.

O conteúdo inicial de LN foi equivalente a $24,1 \text{ mg cotilédone}^{-1}$, observado na semente embebida. A mobilização dos lipídeos de reserva se iniciou a partir da abertura do gancho plumular e foi mais intensa até o brotamento da primeira folha trifoliolada, considerando que o conteúdo de LN diminuiu cerca de 82,4% neste intervalo. No entanto, o conteúdo destas reservas se manteve praticamente inalterado do brotamento da primeira folha trifoliolada até o último estágio fisiológico estudado.

A atividade das lipases durante a germinação e o estabelecimento da plântula corrobora o padrão de mobilização verificado para os LN, segundo o qual a atividade enzimática na semente embebida (estágio I) foi de $22,45 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$ tendo um aumento de 493% entre abertura do gancho plumular (estágio IV) e a emissão das folhas cordiformes (estágio V); ao final do estabelecimento, com o brotamento da segunda folha trifoliolada (estágio VII), foi verificada a atividade enzimática mais elevada, chegando a $211,27 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$.

O processo de degradação dos lipídeos de reserva envolve diversas enzimas, dentre elas as lipases participam do processo inicial de hidrólise, dando início para a conversão desta reserva majoritária de carbono em açúcares, que podem ser transportados para as partes da plântula em desenvolvimento (Bewley et al. 2013). Este processo coincide com um decréscimo no conteúdo de LN e um aumento da atividade das lipases entre o fim da germinação e o início do estabelecimento da plântula.

Durante a germinação da semente de *E. velutina*, não foi verificada mobilização significativa das reservas majoritárias, considerando que os conteúdos de amido e LN se mantiveram praticamente inalterados da semente embebida (estágio I) à protrusão da radícula (estágio II). Estes resultados corroboram a noção de que a mobilização de reservas é um processo primordialmente pós-germinativo (Bewley et al. 2013). De forma semelhante à *E. velutina*, não houve diminuição do conteúdo de amido em *Caesalpinia peltophoroides* (Corte et al. 2006), assim como não foi constatada a utilização do amido em *Enterolobium contortisiliquum* (Veronesi et al. 2014) ao longo da germinação. Assim sendo, é possível que a germinação de sementes de *E. velutina* tenha sido sustentada pela utilização das reservas contidas no eixo embrionário, as quais serão determinadas a posteriori. No entanto, alguns trabalhos demonstram que a mobilização de reservas majoritárias pode ser iniciada antes do estabelecimento da plântula em algumas espécies florestais. Por exemplo, houve degradação de amido durante as fases I e II da embebição em sementes de *Caesalpinia pyramidalis* (Dantas et al. 2008a) e *Schinopsis brasiliensis* (Dantas et al. 2008b).

Embora a mobilização das reservas majoritárias de carbono (amido e lipídeos de reserva) tenha ocorrido de forma mais intensa a partir do estágio IV, a utilização dos açúcares teve seu início no estágio anterior, durante a emissão do hipocótilo. De fato, o conteúdo de AST e ANR na semente embebida foi de 558,4 e 172,3 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$, respectivamente, mantendo-se quase inalterado até o estágio III. Entre a emissão do hipocótilo e a abertura do gancho plumular, o conteúdo de AST e ANR teve decréscimo de 50 e 69,5%, nesta ordem, evidenciando a utilização destes metabólitos. A partir do estágio IV até o estágio VII, não foi possível constatar alterações significativas no conteúdo de AST e ANR.

A utilização dos açúcares solúveis ocorreu mais precocemente, em relação às reservas majoritárias, nos cotilédones de *E. velutina*, pois o conteúdo de AST e ANR diminuiu a partir da emissão do hipocótilo (Estágio III). Dentre os açúcares solúveis depositados em sementes, os ANR têm sido considerados reservas minoritárias, os quais correspondem à sacarose e aos

oligosacarídeos da família da rafinose. Aos ANR são comumente atribuídas as funções de manutenção do estado vítreo e estabilização das membranas em sementes durante a dessecação, bem como o fornecimento inicial de energia durante a germinação (Bewley et al. 2013; Rosental et al. 2014). Embora não tenha sido constatada a utilização dos ANR nos cotilédones de *E. velutina* durante a germinação, estes compostos, juntamente com os AST, provavelmente atuaram como fontes acessíveis de energia durante os momentos iniciais do processo de estabelecimento. De forma semelhante, os açúcares solúveis também sustentam o estabelecimento inicial de *C. peltophoroides* (Corte et al. 2006) e *M. citrifolia* (Paula et al. 2016).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista que o amido é armazenado em maiores quantidades que as demais reservas nos cotilédones de *E. velutina*, é notável a contribuição das amilases no estabelecimento da plântula, pois o aumento da sua atividade coincide com a mobilização do amido, mas não é acompanhado pela acumulação de AST e ANR nos cotilédones. Estes resultados corroboram aqueles previamente verificados em outras dicotiledôneas não endospermicas, nas quais as amilases apresentam um importante papel no desmantelamento dos grânulos de amido no interior dos plastídios, iniciando o processo de mobilização (Bewley et al. 2013). Considerando que este processo gera açúcares livres que podem ser consumidos nos tecidos de armazenamento ou utilizados na produção de sacarose para transporte aos tecidos em crescimento (Dong e Beckles, 2019), o fato de que os conteúdos de AST e ANR se mantiveram praticamente inalterados em paralelo com o aumento da atividade de amilases, provavelmente está relacionado à alteração da relação fonte-dreno durante o estabelecimento da plântula. No estágio V, a emissão das folhas cordiformes ocorre em paralelo com o crescimento das raízes secundárias, exercendo força de dreno sobre as reservas mobilizadas nos cotilédones. O esclarecimento dos processos de mobilização de reservas e utilização dos seus produtos pode auxiliar na compreensão das estratégias utilizadas por *E. velutina* para a colonização do ambiente como espécie pioneira da Caatinga.

Palavras-chave: Espécie pioneira; Estabelecimento da plântula; Germinação da semente; Mulungu.

REFERÊNCIAS

BEWLEY, JD. Et al., **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York, Springer, 392p, 2013.

BLACK, M.J. **The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses The Encyclopedia of Seeds**. 2008.

CARVALHO, A.F.U et al., Preliminary assessment of the nutritional composition of underexploited wild legumes from semi-arid Caatinga and moist forest environments of northeastern Brazil. **Journal Of Food Composition And Analysis**, v. 24, n. 4-5, p.487-493, 2011.

CARVALHO, P, E, R. Espécies arbóreas brasileiras. **Embrapa Florestas**, v. 3. 2008.

CORTE, V.B et al., Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth (Leguminosae-Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 60, n. 6, p.941-949, 2006.

DANTAS, B.F et al., Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.). **Revista Brasileira de Sementes**, Juazeiro-BA, v. 30, n. 1, p.221-227, 2008a.

DANTAS, B.F et al., Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de baráúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Sementes**, Juazeiro-BA, v. 30, n. 2, p.214-219, 2008b.

DANTAS, B, F; et al., Germinative metabolism of Caatinga forest species in biosaline agriculture. **Journal of Seed Science**, v.36, n.2, p.194-203, 2014.

DONG, S., BECKLES, D.M. Dynamic changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink tissues promote a better abiotic stress response. **Journal Of Plant Physiology**, v. 234-235, p.80-93, 2019.

ELARBI, M.B ET AL., Purification and characterization of α -amylase from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germinating seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v.332, p.426-432, 2009.

GOMMERS, C.M.M., MONTE, E. Seedling Establishment: A Dimmer Switch-Regulated Process between Dark and Light Signaling. **Plant Physiology**, v. 176, n. 2, p.1061-1074, 2017.

MARRIOT, K.M.; NORTHCOTE, D.H., The induction of enzyme activity in the endosperm of germinating castor-bean seeds. **Biochemical Journal**. Vol. 152, p. 65-70, 1975.

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

MILLER, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p.426-428, 1959.

MORRIS, D.L., Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. **Science**, v. 107, p. 111-114, 1948.

PAULA, S.O et al., The morphological characterization of the dry seeds and reserve mobilization during germination in *Morinda citrifolia* L. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 3, p.556-563, 2016.

PINHEIRO, F, M; NAIR, P, K, R. Silvopasture in the Caatinga biome of Brazil: A review of its ecology, management, and development opportunities. **Forest Systems**. v. 27, n. 1. 2018.

RODRIGUES, R, D. et al., Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 39, p. 503-512, 2018.

ROSENTAL, L; NONOGAKI, H; FAIT, A. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. **Seed Science Research**, v. 24, n. 1, p.1-15, 17, 2014.

VAN-HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v.22, p.280-283, 1968.

VERONESI, M.B. et al., Carbohydrate mobilisation in germinating seed of *Enterolobium contortisiliquum* and *Peltophorum dubium* (Fabaceae), two tropical trees used for restoration. **Australian Journal Of Botany**, v. 62, n. 2, p.132-139, 2014.

SORIANO, D. et al., Seed reserve translocation and early seedling growth of eight tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. **Plant Ecology**, v. 214, n. 11, p.1361-1375, 2013.

SOXHLET, F., Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. **Dingler's Polytechnisches Journal**. Vol. 232, p. 461-465, 1879.