

GILBERTO BARBANTE KERBAUY

Fisiologia *Vegetal*

TERCEIRA EDIÇÃO



ATENÇÃO

Devido à pandemia em que o país se encontra e seguindo Diretrizes adotadas pela Universidade de São Paulo, as Bibliotecas da USP estão fechadas por tempo indeterminado, não sendo possível a utilização dos exemplares físicos disponíveis no acervo da Biblioteca do IB/USP.

Para atender demandas específicas e não prejudicar as atividades em sala de aula, este material foi digitalizado com autorização do autor da obra, para uso exclusivamente na disciplina “Forma e Função do Desenvolvimento Vegetal”.

De acordo com a lei de Direitos Autorais (Lei 9.610, de 1998), não é permitida a reprodução deste material.

Serviço de Biblioteca do IB/USP

Julho, 2020

O que é germinação

Germinação é um conjunto de etapas e processos associados à fase inicial do desenvolvimento de uma estrutura reprodutiva, seja uma semente, um esporo, seja até mesmo uma gema. De maneira tradicional, o termo é aplicado ao crescimento do embrião – particularmente do eixo radicular – em sementes maduras de espermatófitas, embora possa ser estendido a outros eventos, como o crescimento do tubo polínico (grãos de pólen), do rizoide (esporos de pteridófitas) ou de gemas (cana-de-açúcar).

Semente

Do ponto de vista biológico, a semente representa o resultado de uma tendência evolutiva à redução do gametófito, que passa de organismo individualizado e autotrófico, como nas briófitas, a “parasito” do esporófito, como nas angiospermas, nas quais o gametófito feminino, também chamado de *saco embrionário* ou *megagametófito*, é resultado do crescimento de um esporo (megásporo n) retido dentro do megasporângio (óvulo, $2n$). O megagametófito maduro é composto por sete

células: na extremidade micropilar ficam a oosfera (gameta feminino haploide) e duas sinérgides, cada qual com um núcleo; na extremidade oposta ficam outras três células, denominadas antípodas; restando uma grande célula central contendo dois núcleos, chamados polares (Figura 20.1). Já o gametófito masculino (microgametófito) maduro, também chamado de pólen, é composto por uma célula vegetativa maior e uma generativa menor, cada qual com um núcleo. Após a polinização – transferência do pólen da antera para o estigma (extremidade superior do ovário) –, o grão de pólen “germina”, formando o tubo polínico. Os fatores e mecanismos envolvidos na germinação do pólen no estigma ainda não são totalmente conhecidos, mas estudos *in vitro* mostram que o crescimento do tubo polínico é favorecido pela adição de sacarose, cálcio e boro ao meio de cultura. O crescimento do tubo envolve também a participação de proteínas, como a PSiP (proteína sinalizadora do pólen), uma enzima. Além disso, em pólen de arroz (*Oryza sativa*) mostrou-se que o gene *OsAP65*, que codifica uma protease, é essencial para a germinação e o crescimento do tubo. Durante o crescimento do gametófito masculino pelo tecido do ovário, a célula generativa sofre mitose, formando

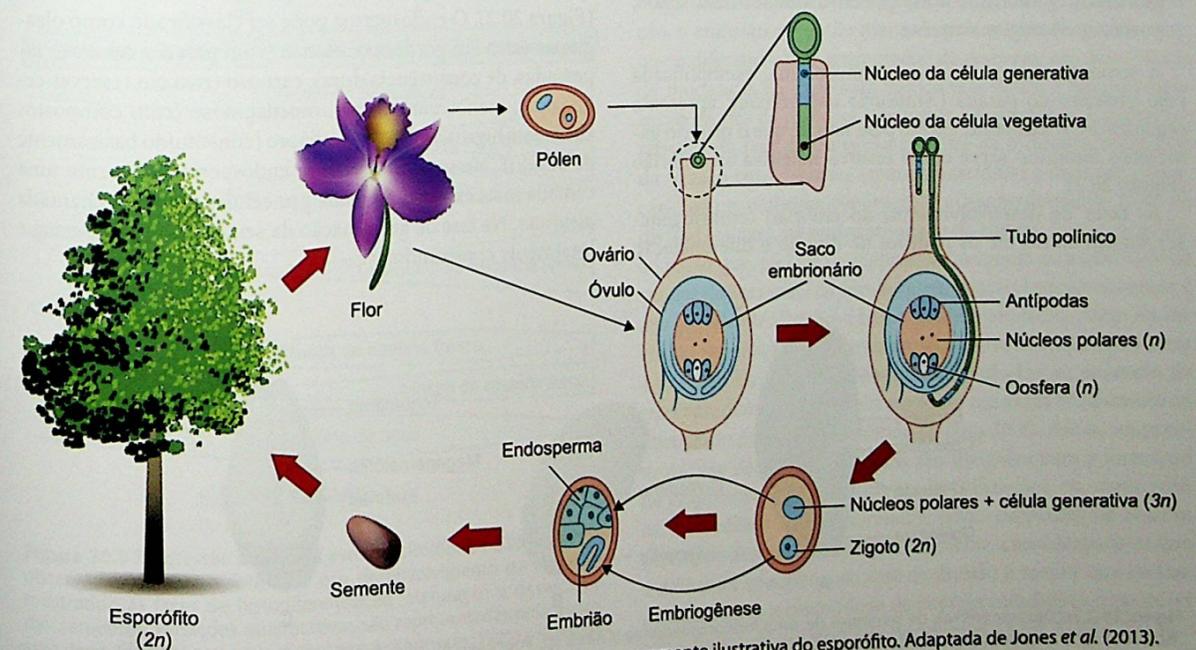


Figura 20.1 Ciclo de desenvolvimento de uma angiosperma. Imagem meramente ilustrativa do esporófito. Adaptada de Jones et al. (2013).

duas células espermáticas, cada qual com um núcleo haploide. No momento da fertilização, quando o tubo polínico atinge o saco embrionário na região da micrópila, uma das células espermáticas se funde com a oosfera, resultando no zigoto ($2n$), enquanto a outra se une à célula central, quando se fundem os respectivos núcleos (dois núcleos polares + um núcleo espermático), resultando em um único núcleo triploide ($3n$). Esse núcleo $3n$ entrará em processo de contínua divisão, sem a formação de paredes, originando inicialmente um endosperma nuclear ou cenocítico que resultará em endosperma celular graças à formação de microtúbulos radiais, deposição de calose e alveolação (formação de pequenas cavidades limitadas por paredes). As sinérgides e as antípodas são degradadas após a fertilização. O processo da dupla fertilização descrito anteriormente é exclusivo das angiospermas. Nas gimnospermas, apenas um gameta participa da fertilização, e, na semente madura, o próprio gametófito feminino servirá como reserva nutritiva ao embrião, cumprindo um papel semelhante ao do endosperma.

O desenvolvimento do zigoto, formando o esporófito jovem de segunda geração (embrião), dá-se à custa do esporófito anterior ou *planta-mãe*. Nutrientes oriundos das fontes na planta são descarregados no apoplasto (paredes celulares) dos tecidos adjacentes ao óvulo (p. ex., integumentos e calaza), ocorrendo então o influxo de nutrientes no embrião via apoplasto e/ou simplasto (protoplasto). O conjunto formado pelo embrião, pelo tecido de reserva e pelas estruturas que os envolvem é chamado de *semente*, o qual, dependendo da complexidade das estruturas envolvidas, constitui o *diásporo* ou a *unidade de dispersão*. Nas angiospermas, a semente madura é basicamente constituída por três estruturas distintas:

- O *embrião*, que se desenvolve a partir do zigoto diploide
- O *endosperma*, geralmente triploide
- O *tegumento* ou *testa* (casca), formado a partir dos integumentos (geralmente dois) que envolvem o óvulo, sendo, portanto, de origem materna.

A semente madura de uma gimnosperma, exemplificada pelo pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*), apresenta organização semelhante, exceto pelo fato de que o próprio gametófito feminino serve como reserva nutritiva ao embrião (Figura 20.2).

As fases de desenvolvimento do embrião (embriogênese) variam conforme os padrões de divisão e diferenciação

celular característicos dos diferentes *taxa*. No caso do embrião de dicotiledôneas, seu desenvolvimento divide-se em diferentes estágios, de acordo com a forma aproximada que o embrião assume com o aumento do número de células: linear; globular; trapezoidal; cordiforme; torpedo; e embrião maduro. Em monocotiledôneas, o desenvolvimento inicial do embrião é similar ao das dicotiledôneas, havendo nas etapas finais algumas diferenças importantes: o par de cotilédones reduz-se a um único cotilédone modificado, denominado *escutelo*, que atua como tecido condutor entre o endosperma e o embrião. Além disso, os primórdios da parte aérea e da raiz são protegidos por tecidos especializados denominados, respectivamente, *coleoptilo* e *coleorriza*. O embrião maduro em geral é formado pelo *eixo embrionário* (ou eixo hipocótilo-radícula), que apresenta em uma de suas extremidades o primórdio caulinar ou *plúmula*, e um ou mais cotilédones, e na outra extremidade o primórdio radicular. Este pode ser uma raiz embrionária (*radícula*), enquanto o primórdio caulinar pode ser um caule embrionário formado por uma gema apical (*plúmula*) inserida no *epicótilo* (parte do caule acima da inserção dos cotilédones). A parte do eixo caulinar abaixo dos cotilédones é chamada de *hipocótilo* (região de transição para a radícula).

O endosperma, por sua vez, completa o desenvolvimento geralmente antes do embrião, absorvendo material nutritivo depositado em outras partes do óvulo. Em dicotiledôneas (como no caso de sementes de feijão), o endosperma celular é consumido pelo embrião durante as etapas de maturação da semente, sendo os principais produtos de armazenamento (lipídios e proteínas) acumulados nos *cotilédones* (estruturas foliares primárias do embrião), que exercem a função de nutrir o embrião na germinação. Em monocotiledôneas (como grãos de milho), o endosperma persiste após a celularização, acumulando principalmente amido e proteínas de reserva, enquanto o embrião permanece delgado no interior da semente (Figura 20.2). O endosperma pode ser classificado como oleaginoso (rico em gorduras), córneo (com paredes celulares espessadas, de consistência dura), carnoso (rico em reservas celulósicas, menos compactas), mucilaginoso (com compostos altamente higroscópicos) e amiláceo (constituído basicamente de amido). Nesse último caso, o endosperma apresenta uma camada mais externa, formada por células menores, chamada *aleurona*. Na fase de germinação da semente, o endosperma é totalmente consumido.

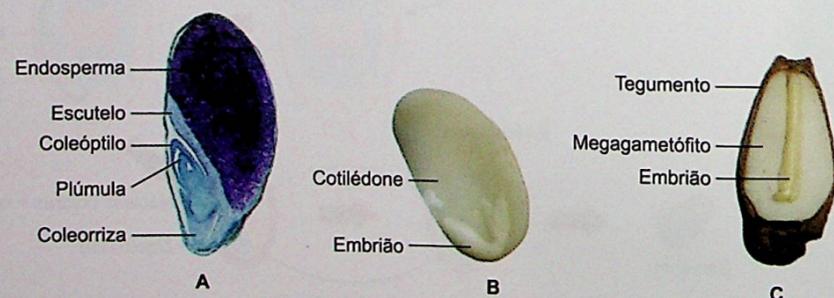


Figura 20.2 Seções transversais de sementes de: uma monocotiledônea (*Chloris* sp., Poaceae) (A); uma dicotiledônea (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) (B); e uma gimnosperma (*Araucaria angustifolia*, Araucariaceae) (C – imagem de *Chloris* cedida pela Prof. Dra. Vera Lucia Scatena).

O revestimento ou a casca (*seed-coat*) inicia seu desenvolvimento com a fecundação do óvulo, sendo inteiramente formado a partir de tecido diploide da planta-mãe. É constituído pelos tegumentos (*testa* e *tégmen*), pelos tecidos calazal e rafeal e, frequentemente, pelo nucelo. De modo generalizado, os termos *testa* ou *tegumento* podem ser usados para designar o envoltório das sementes como um todo. A transformação da parede do ovário em envoltório se dá por intermédio de divisões celulares periclinais (responsáveis pelo crescimento em espessura) e anticlinais (responsáveis pelo crescimento em superfície), bem como por alongamento celular. As principais propriedades do revestimento da semente são determinadas durante as fases de maturação e dessecação. O tegumento representa uma via de troca de matéria entre os meios interno e externo, mas ao longo do desenvolvimento pode lignificar-se, suberizar-se ou cutinizar-se, aumentando a resistência às trocas de gases, de água e de solutos entre a semente e o meio.

Desenvolvimento da semente

O desenvolvimento da semente refere-se ao conjunto de modificações pelo qual ela passa durante sua retenção na planta-mãe. Nessa fase, o desenvolvimento é representado por variações quantitativas (crescimento) e qualitativas (diferenciação), sendo dividido em três etapas ou fases:

- Embriogênese ou histodiferenciação
- Maturação ou armazenamento
- Dessecação (Figura 20.3).

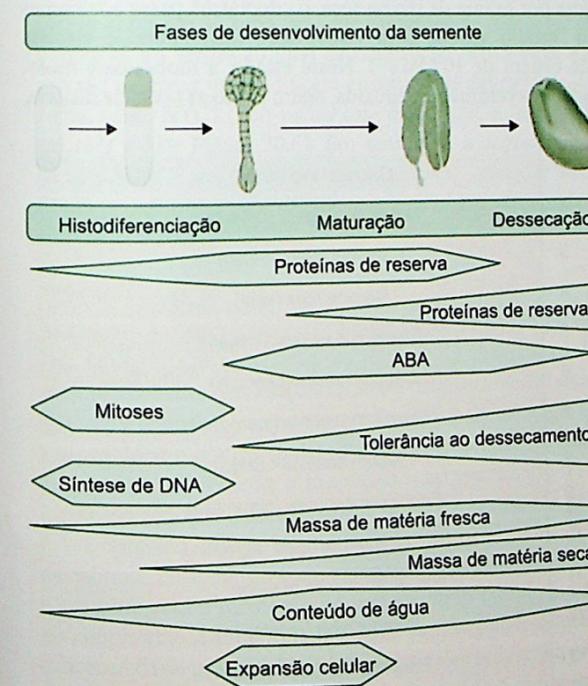


Figura 20.3 Progressão de alguns eventos citológicos e bioquímicos observados durante a formação e o desenvolvimento da semente, mostrando as fases de histodiferenciação, maturação e dessecação das sementes. Variações quantitativas são representadas pela espessura dos polígonos em verde. Adaptada de Kermod (1995) e Bradford (1994).

Histodiferenciação e maturação

A histodiferenciação ou embriogênese é marcada por intenso processo de divisão e diferenciação celular, originando os tecidos do embrião e o endosperma. Também pode ser chamada de fase de divisão celular – ou seja, na fase de histodiferenciação, constrói-se embrião. A suspensão da síntese de DNA e da atividade mitótica marca o fim dessa fase e o início da maturação, conforme observado em sementes de tomate. Cerca de 80% dos genes representados no genoma são transcritos nessa fase e na fase intermediária, coincidindo com uma maior porcentagem de eucromatina (complexo proteínas-DNA ativo). Essa proporção cai para algo em torno de 40 a 45% na fase de maturação, quando ocorrem o aumento da condensação da cromatina e a redução do núcleo. Assim, a regulação dos eventos na histodiferenciação se dá predominantemente no nível de transcrição, mediado por fatores de transcrição (como LEC1, *leafy cotyledon 1*) e por eventos epigenéticos (não envolvem diretamente transcrição gênica). As citocininas (ver Capítulo 10) desempenham importante papel nessa fase.

A fase de maturação da semente caracteriza-se pela expansão celular e alocação de substâncias, notadamente proteínas, lipídios e/ou carboidratos, para os tecidos de reserva (os cotilédones ou o endosperma), resultando no aumento da matéria seca na semente em desenvolvimento. Por esse motivo, a fase de maturação também é chamada de *fase de armazenamento*, *preenchimento* ou *enchimento*. O crescimento do embrião nessa fase ocorre por meio do alongamento celular, resultante da captação de água e do acúmulo de reservas. Em geral, o final da fase de maturação, quando a massa de matéria seca da semente atinge o máximo, representa o ponto de maturidade fisiológica.

Estudos realizados com sementes de leguminosas mostram que entre as fases de histodiferenciação e de maturação há uma etapa intermediária ou de *transição* (Figura 20.4). Na transição, o embrião até então marcado pela atividade mitótica torna-se diferenciado e acumulador de reservas, em decorrência de mudanças na expressão gênica que levam à operacionalização de vias de resposta a açúcares e hormônios. Uma característica da fase de transição consiste na mudança acentuada da relação entre hexoses (monossacarídeos) e sacarose (dissacarídeo) no embrião. No início do desenvolvimento (fase de divisão celular), há maior atividade da enzima invertase ácida, ao passo que, na fase de maturação, aumenta-se a atividade da sintase da sacarose, de modo que a relação hexoses:sacarose é alta na fase de divisão e baixa na de maturação. Além da inversão na relação hexose:sacarose, na fase de transição ocorre a indução da expressão de genes associados ao acúmulo de reservas, demonstrada pelo aumento nas taxas de acúmulo de nitrogênio e amido no embrião (Figura 20.4). Assim, enquanto na fase de divisão os fluxos são dirigidos para a formação de compostos celulares (dreno de utilização), na maturação os metabólitos são direcionados para compostos de reserva (dreno de armazenamento). Finalmente, considerando-se que a demanda energética na fase de divisão é menor que na fase de maturação, a quantidade de energia metabólica disponível sob a forma de nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) é

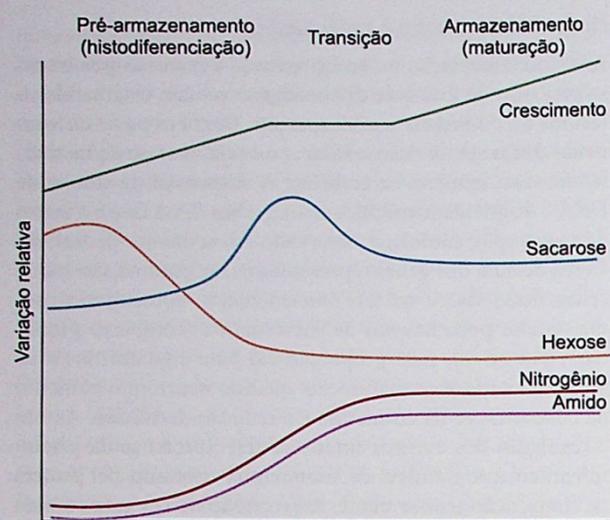


Figura 20.4 Variação relativa do crescimento e dos níveis de nitrogênio, amido, sacarose e hexoses no embrião de sementes de *Vicia fava* nas fases de histodiferenciação (pré-armazenamento) e maturação (armazenamento) Fonte: Weber *et al.* (2005).

baixa na fase de divisão e elevada na maturação. Em suma, na fase de transição, a passagem do crescimento mitótico para o crescimento por expansão celular é acompanhada de mudanças intensas no metabolismo e na distribuição de metabólitos no embrião. Além disso, em sementes de leguminosas, na fase de transição o embrião torna-se verde e fotossinteticamente ativo, o que assegura suprimento extra de oxigênio ao embrião em um ambiente hipóxico.

Dessecação

Ao final da fase de maturação, há um acentuado aumento na taxa de desidratação e a ruptura das conexões tróficas da semente com a planta, ocorrendo forte redução do metabolismo no embrião. Essa perda progressiva de água deve ser controlada com precisão, permitindo à semente sobreviver no estado desidratado após a dispersão. Ao final dessa fase, chamada de *dessecação*, as sementes em geral atingem o estágio ótimo para a *dispersão*, ou para a coleta e o beneficiamento pelo homem. Na etapa de dessecação, ocorre a ruptura entre o metabolismo direcionado ao desenvolvimento e aquele voltado à germinação. Enquanto a via para o desenvolvimento é predominantemente *anabólica* e marcada pelo acúmulo de energia potencial nos tecidos de reserva da semente, na germinação predominam os processos *catabólicos* e a mobilização da energia acumulada, retomando-se o crescimento do embrião. A fase de dessecação normalmente é mais acentuada em frutos secos, como em *Phaseolus vulgaris* (feijão), mas também pode ser observada em frutos carnosos, como *Cucumis anguria* (maxixe). Embora não haja consenso, o critério mais simples para marcar o início da fase de desidratação ou dessecação consiste na estabilização da massa de matéria seca, quando o embrião e/ou o endosperma param de acumular reservas. Com base nesse critério, observa-se que o início da fase de desidratação, em relação ao tempo total de desenvolvimento da semente, varia bastante dependendo da espécie, conforme ilustrado na Figura 20.5.

O processo de desidratação na fase final da maturação é característico das sementes classificadas como *ortodoxas*, capazes de serem armazenadas por períodos relativamente longos. Em algumas espécies, como *Hevea brasiliensis* (seringueira), as sementes não sofrem desidratação acentuada ao final da maturação, sendo dispersas com conteúdos de água elevados (da ordem de 30 a 40%) e estando, dessa forma, sujeitas a estresse hídrico e perda da viabilidade. Tais sementes são denominadas *recalcitrantes*.

Do ponto de vista fisiológico, a fase de dessecação é importante para o embrião tolerar níveis baixos de água (cerca de -150 Mpa) no período pós-dispersão e retomar o crescimento durante a germinação. Sementes removidas da planta-mãe e submetidas à secagem antes de completarem seu ciclo de desenvolvimento podem germinar se tiverem atingido a condição de tolerância à dessecação, adquirida gradualmente ao longo do desenvolvimento e perdida na fase de germinação. A tolerância à dessecação pode ser definida como a capacidade do sistema vivo de sobreviver à desidratação celular, até concentrações de água da ordem de 0,1 g por grama de tecido (base massa seca) ou menores, por período relativamente prolongado. Sementes de tâmara encontradas em escavações em Israel germinaram após cerca de 2 mil anos. No caso da semente, a desidratação pode alcançar algo em torno de 90% do conteúdo de água inicialmente presente nos tecidos.

Durante essa fase tardia da maturação, a semente vai adquirindo longevidade cada vez maior, que atinge o pico pouco antes do estado "seco", que antecede a etapa da dispersão. Quando o conteúdo de água na célula cai abaixo de 0,1 g de água por grama de massa seca, o citoplasma passa ao chamado "estado vítreo", com viscosidade extremamente elevada (da ordem de 10^{14} Pa.s⁻¹). Nesse estado, a mobilidade molecular é severamente reduzida, assim como as taxas de difusão,

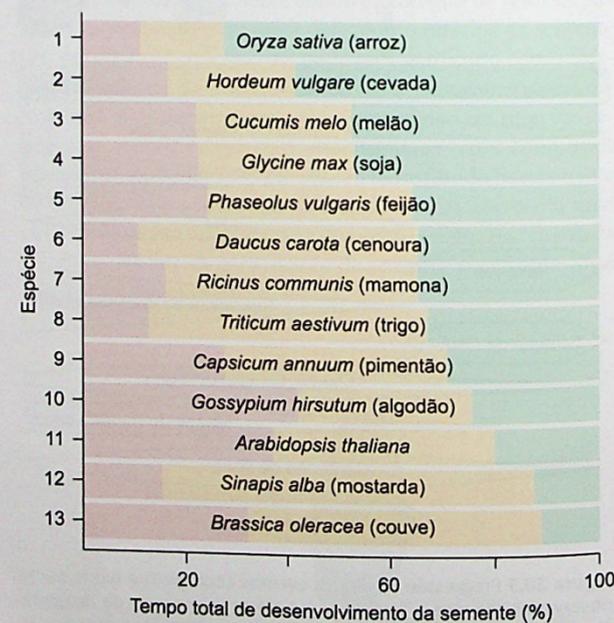


Figura 20.5 Duração relativa das fases de embriogênese (barras horizontais rosadas), maturação (barras laranjas) e dessecação (barras verdes). Adaptada de Leprince *et al.* (2016).

desfavorecendo reações químicas deletérias e causando *hipobiose*, condição em que as trocas de matéria e energia entre a semente e o meio ocorrem em velocidades extremamente baixas. Há evidências, contudo, da existência de "ilhas" de maior concentração de água localizadas, por exemplo, no interior da mitocôndria e dos plastídios. Isso indicaria um meio intracelular vítreo não homogêneo, com densidade variável, com bolsões suficientemente fluidos para permitir reações químicas em tecidos com elevado grau de desidratação e considerados tolerantes ao dessecação.

Entre os principais eventos fisiológicos e bioquímicos associados à fase de desidratação, destacam-se: degradação de pigmentos fotossintéticos; mudanças no conteúdo e na composição de açúcares solúveis; condensação da cromatina; indução de proteínas de choque térmico (HSP); e acúmulo de proteínas LEA (abundantes nas fases tardias da embriogênese; Figura 20.6).

Degradação de pigmentos

Uma das alterações mais visíveis associadas à fase final da maturação é a degradação de pigmentos fotossintéticos, particularmente clorofilas e carotenoides. As razões fisiológicas disso ainda não são claras, acreditando-se que, no caso das clorofilas, sua retenção possa ser prejudicial à longevidade da semente, ou, então, que produtos da quebra da clorofila possam ser usados como substratos para a síntese de tocoferóis, agente antioxidante envolvido na longevidade. Em sementes de *Arabidopsis*, a degradação de clorofila é regulada pelo ácido abscísico (ABA), por meio do fator de transcrição ABI3 (ácido abscísico 3), uma vez que sementes de mutantes *abi3* permanecem verdes ao final da maturação. ABI3 ativa a expressão de genes que codificam enzimas que degradam a clorofila, como NYC1 (*non-yellow coloring 1*) e NOL (*non-yellow coloring 1-like*; Figura 20.6). Em sementes, a degradação de carotenoides é regulada por dioxigenases, como a NCED (9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase), também envolvida na síntese de ABA.

Açúcares

Alterações no conteúdo e na composição de açúcares solúveis também são características da fase de dessecação. Um exemplo consiste no desaparecimento progressivo de hexoses (glicose e frutose) -, monossacarídeos que podem reagir com aminoácidos e liberar moléculas tóxicas, comprometendo a longevidade da semente armazenada - acompanhado do aumento de açúcares não redutores (sacarose, arabinose, galactose e rafinose). Não se sabe ainda qual a função da sacarose e da rafinose na semente seca, acreditando-se que elas possam contribuir para a formação do estado vítreo (sólido amorfo) no citoplasma. A estabilidade dessas matrizes vítreas intracelulares se daria graças à interação entre esses açúcares e proteínas LEA, com os filamentos proteicos atuando como elemento de reforço da matriz amorfa de carboidratos, à semelhança da armadura de ferro no concreto armado. A regulação do conteúdo de rafinose (RFO) ocorre no nível de transcrição durante a fase final de maturação, controlada pelos hormônios ácido abscísico (ABA) e giberelina (AG).

Cromatina

Durante a dessecação, há acentuada redução dos núcleos e condensação da cromatina, fenômeno que não deve ser provocado pela dessecação em si, mas sim controlado pelo fator de transcrição ABI3 (Figura 20.6). Embora essa "compactação" do DNA não impeça a transcrição, a cromatina condensada pode proteger o genoma contra danos oxidativos ou aqueles causados pela radiação à estrutura da dupla-hélice. Estudos mostram também que modificações na cromatina podem regular os níveis de transcrição de genes associados à dormência de sementes.

Proteínas de choque térmico

O programa genético na fase de dessecação envolve também a indução de genes da síntese de HSP (proteínas de choque térmico), as quais devem desempenhar algum papel protetor na longevidade da semente. A expressão desses genes é induzida por *fatores de choque térmico* (HSF), que atuam na via de sinalização de HSP em situações de estresse, embora, no caso das sementes, o acúmulo de HSP ocorra independentemente do estresse. Na maturação, a expressão das HSP é regulada a montante ("antes" da região codificadora do DNA, ou seja, entre essa região e a extremidade 5' da fita) por um fator específico de sementes (HSFA9 - *heat shock transcription factor 9*) expresso exclusivamente no final da maturação. HSFA9 é também controlada pelos fatores ABI3 (*abscisic insensitive 3*), ABI5 e DOG1 (*delay of germination 1*; Figura 20.6).

Proteínas LEA

Finalmente, o acúmulo de proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*) representa um marco do final da maturação. Embora essas proteínas apareçam na fase final do desenvolvimento, seus transcritos (RNAm) podem ser detectados 10 a 20 dias antes, indicando que a regulação de sua quantidade ocorre em nível pós-transcrição (Figura 20.6). Tais proteínas podem estar associadas à tolerância do embrião à dessecação, verificando-se uma coincidência entre a aquisição de tolerância ao dessecação durante o desenvolvimento de sementes e a síntese e o acúmulo dessas proteínas. Extremamente hidrofílicas e termoestáveis, as proteínas LEA poderiam atuar como sequestradores de íons - como o Fe²⁺, catalisador da produção de *espécies reativas de oxigênio* (ERO) - ou como agentes de solvatação de membranas e outras proteínas, protegendo os componentes celulares dos danos decorrentes da falta de água. Embora a maioria dos genes *LEA* tenha sido identificada em sementes ortodoxas, portanto tolerantes ao dessecação, essas proteínas, assim como o hormônio ABA, também podem ser encontradas em sementes recalcitrantes (sensíveis ao dessecação). A presença de proteínas LEA nessas sementes poderia contribuir para aumentar, ainda que em pequeno grau, sua tolerância à desidratação e ao frio. A transcrição de inúmeros genes *LEA* durante o desenvolvimento é em parte governada por uma rede de fatores de transcrição, incluindo ABI3, ABI4, ABI5 e DOG1.

A tolerância ao dessecação envolve, portanto, alterações na expressão gênica em função do estado de hidratação do tecido. A síntese de proteínas LEA, bem como de proteínas de choque

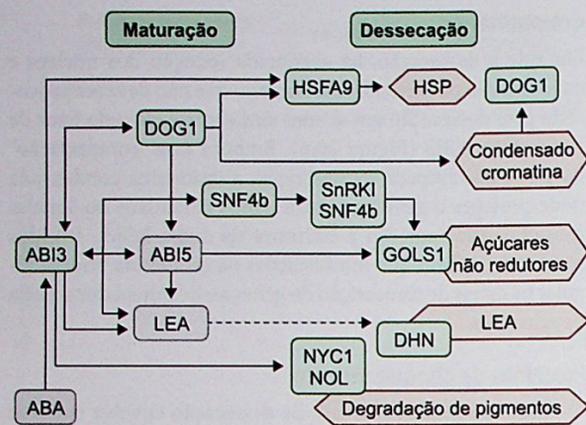


Figura 20.6 Principais eventos e alguns elementos participantes no estabelecimento da longevidade durante as fases de maturação e dessecação de uma semente dicotiledônea. Caixas verdes representam fatores de transcrição ou proteínas cujos mutantes têm longevidade reduzida; caixas cinza, fatores cuja participação na longevidade é indireta ou carecem de estudos; e caixas rosadas, compostos ou eventos cuja síntese ou ativação é estabelecida. ABI: ABA insensível (insensível ao ABA); DOG1: *delay of germination 1* (retardador da germinação 1); GOLSI1: *galactinol syntase 1* (sintase do galactinol); HSF9A9: *heat shock factor A9* (fator de choque térmico A9); HSP: *heat shock proteins* (proteínas de choque térmico); LEA: *late embryogenesis abundant* (abundantes nas fases tardias da embriogênese); NOL: NYC1-like (semelhantes à NIC1); NYC1: *non yellow coloring 1* (coloração não amarela 1); SNF4b: *sucrose non-fermenting subunit 4b* (subunidade não fermentadora da sacarose 4b); SNRK2: *sucrose nonfermenting-related kinase 2* (cinase não relacionada à fermentação da sacarose 2). Adaptada de LePrince et al. (2016).

térmico, pode ser influenciada pelo ABA, conferindo proteção ao embrião contra eventuais danos decorrentes da dessecação. Esse hormônio, quando aplicado exogenamente, restabelece a tolerância à dessecação em mutantes deficientes de ABA.

Controle do desenvolvimento

O desenvolvimento da semente representa um evento complexo, com múltiplos sistemas de regulação e controle, do qual dependerá a capacidade germinativa da semente em resposta ao meio. Conforme os fatores endógenos e/ou externos, ao final do desenvolvimento tem-se uma semente *não dormente ou quiescente*, ou seja, apta a germinar na maior amplitude possível – respeitando-se os limites impostos por seu genótipo – de condições ambientais; ou uma semente *dormente*, que necessitará de estímulos ambientais específicos para adquirir plena capacidade de germinação. Este item tratará principalmente de fatores e mecanismos que atuam durante o desenvolvimento da semente e são determinantes para sua competência germinativa. Nesse contexto, serão abordados também alguns mecanismos relativos à indução da dormência, descrita com mais detalhes no item “Dormência”.

Viviparidade

A existência do período de dessecação entre as fases de desenvolvimento e germinação sugere que a desidratação influencia a transição do metabolismo celular do modo predominantemente anabólico, característico das fases iniciais do desenvolvimento, para o modo catabólico ou germinativo, típico da

semente madura. Existem, entretanto, situações em que a perda de água não constitui pré-requisito para o estabelecimento do metabolismo germinativo, como é o caso de embriões imaturos de várias espécies, que adquirem a capacidade de germinar, quando removidos da semente em desenvolvimento e colocados em água ou meio de cultura. Isso sugere que a competência do embrião para germinar é adquirida já nas primeiras etapas do desenvolvimento, em geral após a fase de histodiferenciação, e que fatores maternos e/ou da própria semente controlam o desenvolvimento do embrião e impedem a germinação da semente na planta-mãe. Assim, concomitantemente à aquisição da capacidade de germinação, a semente deve criar mecanismos que impeçam o crescimento do embrião antes da dispersão. Essa germinação precoce, conhecida como *viviparidade*, acontece quando tais mecanismos restritivos não estão presentes ou são atenuados, permitindo o crescimento ininterrupto do embrião com a semente ainda ligada à planta. Contudo, quando a ação desses fatores restritivos da germinação perdura após a semente ter atingido sua completa maturidade, há uma semente dormente. A compreensão da cadeia de processos permissivos e restritivos à germinação durante o desenvolvimento da semente é de suma importância, particularmente na área de tecnologia de sementes. Em muitas variedades de cereais (p. ex., trigo, sorgo e cevada), a dormência começa a diminuir na fase final da maturação, antes da coleta. Em outras variedades, entretanto, a redução da dormência inicia-se logo após a maturidade fisiológica, como na cevada, ou mesmo antes, como em certas variedades de sorgo, sujeitando a semente à anomalia conhecida como *brotamento pré-coleta* (em inglês, PHS, *pre-harvest sprouting*). Reconhece-se, desse modo, que a dormência é necessária contra o PHS, embora essa característica seja desvantajosa na pós-coleta. Já a ausência total de dormência, exemplificada pelo fenômeno da viviparidade, embora vantajosa para algumas espécies selvagens, como *Rhizophora mangle* (mangue), pode representar sério problema para espécies agrícolas por permitir a germinação precoce. Diversos genes associados à dormência e à resistência ao PHS têm sido identificados, sendo alguns associados também à coloração do tegumento. Em cevada (*Hordeum vulgare*) e trigo (*Triticum aestivum*), os genes *MKK3* (*mitogen-activated protein kinase 3*) e *ARGONAUTE 9* (um regulador da metilação do DNA) causam o brotamento pré-coleta (PHS). Além desses, o gene *MFT* (*mother of FT and TFL1*), expresso no embrião, foi identificado como regulador do PHS em trigo, reprimindo a germinação precoce.

A viviparidade fornece boas evidências sobre o envolvimento de hormônios vegetais no controle da germinação da semente. Estudos com mutantes de milho deficientes e insensíveis ao ABA (ver Capítulo 12) e com inibidores da biossíntese de giberelina (AG) demonstram que este último é um regulador positivo da viviparidade. Não por acaso, a inibição da biossíntese de AG simula o efeito da aplicação de ABA, suprimindo a viviparidade. Verifica-se também que o controle desse fenômeno parece estar relacionado com a razão AG:ABA, e não com a quantidade absoluta do hormônio, sugerindo ação antagônica desses hormônios durante o desenvolvimento do grão de milho. Alguns experimentos sugerem que embriões

de *Rhizophora mangle* são relativamente insensíveis ao ABA, necessitando de concentrações relativamente elevadas do hormônio para inibir seu crescimento. Outras evidências do envolvimento do ABA na viviparidade vêm do fato de que mutantes de milho vivíparos contêm menos ABA ou são menos sensíveis ao hormônio que os tipos selvagens, além de esse hormônio inibir a germinação precoce de embriões imaturos em meio de cultura. Desse modo, a manipulação da biossíntese de ABA pode funcionar como ferramenta para aumentar a dormência e suprimir o PHS. Como exemplo, o aumento da expressão de *NCED*, que codifica uma enzima envolvida na biossíntese de ABA, tem sido usada para suprimir a germinação de *Arabidopsis*. Isso acarreta, por sua vez, a necessidade de tratamentos específicos, como o uso de antagonistas do ABA, para recuperar a capacidade germinativa dessas sementes hiperdormentes.

Indução da dormência

Como mencionado anteriormente, a viviparidade é resultado da capacidade de crescimento do embrião adquirida na maturação. Entretanto, para que a semente cumpra seu papel como agente disseminador na maioria das espermatófitas, é necessário prevenir a germinação precoce e, ao mesmo tempo, preparar o embrião para sobreviver em ambientes desfavoráveis e para responder a estímulos favoráveis ao crescimento (germinação). Assim, a indução de mecanismos restritivos da germinação é parte integrante do controle do desenvolvimento e da maturação da semente. O ABA sintetizado nos tecidos da própria semente desempenha papel fundamental mantendo o metabolismo do embrião no “modo desenvolvimento” até que o embrião esteja apto para uma germinação bem-sucedida da semente após a dispersão. Esse hormônio, cujos níveis na semente são, em geral, relativamente baixos na histodiferenciação e altos na maturação, atua como inibidor da germinação na etapa de expansão celular, além de promover aumento da síntese de proteínas de reserva. Assim, o ABA teria função dupla durante o desenvolvimento, induzindo processos biossintéticos e, ao mesmo tempo, mantendo o embrião em estágio pré-germinativo, por meio da inibição da maquinaria responsável pela hidrólise das reservas. Durante a fase de dessecação, em muitos casos, ocorre decréscimo acentuado na concentração de ABA endógeno, que atinge teores muito baixos na semente madura. O envolvimento do ABA na indução da dormência, bem como no desenvolvimento da semente como um todo, também é demonstrado pelo uso de mutantes com a capacidade de biossíntese ou sensibilidade ao hormônio afetadas (como *abi3*, *nced3* e *aba2*). Tais mutantes apresentam embriões imaturos ao final do desenvolvimento, baixa expressão do gene *LEA*, baixa tolerância ao dessecação e baixos níveis de proteínas de armazenamento em sementes. Entretanto, em geral não há correlação entre os níveis de ABA e o grau de dormência na semente madura, mas sim entre a capacidade de resposta de embriões isolados ao ABA exógeno e o grau de dormência da semente, lembrando que, no caso de *Arabidopsis*, a remoção dos envoltórios (testa e endosperma) favorece o crescimento do embrião. Mutantes de *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana plumbaginifolia* (fuminho) deficientes em ABA são incapazes de entrar em dormência. AG, por sua vez,

apresenta efeito antagônico ao do ABA, e mutantes deficientes em AG (como *ga1*) são incapazes de germinar na ausência de giberelina exógena. Além disso, sementes de mutantes deficientes em GA2 oxidases (*GA2ox*), que inativam AG, exibem reduzido nível de dormência. Com base em estudos realizados em sementes de *Arabidopsis*, observou-se que a giberelina degradada *RGL2* (*RGA-like 2*), fator de transcrição que inibe a via de sinalização desse hormônio (ver Capítulo 11). Em baixos níveis de giberelina, *RGL2* promove a biossíntese de ABA. O OPDA (ácido 12-oxo-fitodienoico) – precursor do ácido jasmônico – age como repressor da germinação em *Arabidopsis*, aumentando a biossíntese e a sensibilidade ao ABA por meio da proteína *MFT* (*mother of FT and TFL1*).

Entre os genes que, até o momento, têm sido associados exclusivamente à regulação da dormência e germinação em sementes de *Arabidopsis*, destacam-se *DOG1* (*delay of germination 1*) e *RDO5* (*reduced dormancy 5*), estando o primeiro envolvido na indução de dormência por temperaturas baixas durante a fase de maturação. *DOG1* codifica uma proteína cuja função é ainda desconhecida, acreditando-se que deva atuar inibindo o enfraquecimento do endosperma durante a embebição e favorecendo a dormência imposta pelos tecidos que envolvem o embrião. Há forte correlação entre os níveis das proteínas *RDO5* e *DOG1* e a dormência em sementes recém-colhidas de *Arabidopsis*, sendo sua atuação aparentemente independente do ABA. Além disso, a função de *DOG1* parece restringir-se à maturação, já que sua expressão é bastante reduzida durante a embebição, primeira etapa do processo de germinação. Curiosamente, demonstrou-se que a região 3’ do gene *DOG1* contém promotor autônomo para a transcrição de RNAm não codificante antissenso (*asDOG1*), que reprime a expressão de *DOG1* durante a maturação, atuando, assim, como regulador negativo da dormência.

Além da temperatura, que influencia a expressão de *DOG1*, o nitrato é um eficiente regulador da expressão gênica durante o desenvolvimento da semente. Nesse caso, o nitrato atuaria reduzindo a expressão de *NCED* – diminuindo, assim, a biossíntese de ABA – e aumentando a expressão de *CYP707A2*, gene envolvido no catabolismo desse hormônio. Desse modo, o nitrato consegue reduzir os níveis de ABA na semente e promover a germinação, podendo ser usado durante a embebição para reverter o estado de hiperdormência. O metabolismo do nitrato, por sua vez, também pode estar envolvido na resposta à temperatura, considerando-se que, em *Arabidopsis*, temperaturas elevadas durante o desenvolvimento estão associadas ao aumento da expressão dos genes *NIA1* (redutase do nitrato) e *NIR1* (redutase do nitrito) em sementes maduras, sugerindo que a temperatura possa afetar a dormência por meio do metabolismo do nitrato durante o desenvolvimento da semente (Figura 20.7).

Os envoltórios parecem desempenhar importante papel no controle do desenvolvimento de algumas sementes na fase de divisão celular. Envoltórios jovens de *Vicia faba* (fava) e ervilha acumulam amido e proteínas, antes de o embrião passar a funcionar como órgão de armazenamento. Qualquer mutação que afete essa atividade armazenadora dos envoltórios impedirá o crescimento do embrião. Essa propriedade dos envoltórios parece estar relacionada com a atividade de enzimas, como invertases e sintase da sacarose, e hormônios,

especialmente o ABA. Em *Arabidopsis* e tabaco, ABA sintetizado nos tegumentos – tecido de origem materna – é translocado para o embrião, evitando o abortamento e promovendo seu crescimento por intermédio da regulação da importação de metabólitos. O aumento da atividade de invertases associadas às paredes do envoltório elevaria a disponibilidade de hexoses para o embrião, estimulando seu crescimento por divisão celular. O ABA controlaria a maturação pela indução de inibidores da invertase, que reduzem os níveis de hexose, cessando as divisões celulares e iniciando a etapa de diferenciação. Além disso, invertases solúveis (INVvc) parecem desempenhar importante papel no decréscimo na atividade de dreno da semente em desenvolvimento. Em situações de estresse, com redução de atividade na fonte, uma maior produção de inibidores de INVvc reduz o consumo de sacarose e, conseqüentemente, a demanda do dreno por esse metabólito, tendo como resultado a redução no tamanho e/ou no número de sementes. A própria sacarose, cuja concentração aumenta sensivelmente na fase de transição, parece induzir a expressão de genes associados ao armazenamento e à expansão celular, características da fase de maturação. Nessa fase, o controle do metabolismo deixa de ser exercido pela invertase – que consome ATP e eleva a concentração de hexose – e passa para a síntese da sacarose, que eleva o teor do açúcar e economiza ATP.

Em *Fabacea*, a natureza do tegumento pode influenciar a capacidade de germinação da semente, limitando a absorção de água. A permeabilidade do tegumento nessas sementes está relacionada com a concentração de pigmentos, como taninos, e sementes mais claras em geral são menos dormentes que as mais escuras (com maior pigmentação). Fatores ambientais, principalmente a temperatura, podem influenciar o tegumento.

Em *Chenopodium*, por exemplo, a dormência depende da espessura do tegumento, que, por sua vez, é afetada pelas condições ambientais durante o desenvolvimento. Estudos em *Arabidopsis* mostram a participação do gene *FT* (*flowering locus*) na resposta à temperatura. Nesse caso, sementes mutantes *ft* exibem elevada dormência quando maturadas a 16°C ou 22°C. Quando a maturação se dá em temperaturas mais elevadas (22°C), a proteína FT do fruto reprime a produção de taninos, tornando o tegumento da semente mais fino e permeável, permitindo germinação mais rápida. Temperaturas mais baixas antes da floração, ao contrário, acarretarão menor produção de FT, mais taninos, tegumentos mais espessos e menos permeáveis e, portanto, germinação mais lenta. Quanto ao efeito da luz, baixas irradiâncias durante a fase de maturação resultam em sementes com maior grau de dormência, enquanto o comprimento do dia não tem efeito, no caso de *Arabidopsis*. Razões elevadas vermelho-extremo:vermelho (VE:V) também produzem sementes mais dormentes em comparação a sementes maturadas em baixas razões VE:V. A Figura 20.7 ilustra a participação de alguns fatores na indução da dormência durante o desenvolvimento da semente na planta-mãe.

Como mencionado anteriormente, a capacidade de germinação é adquirida antes de a semente completar todo o seu ciclo de desenvolvimento na planta. Além do ABA, o potencial osmótico relativamente baixo (causado por concentrações elevadas de solutos) dos tecidos adjacentes ao embrião, impedindo o suprimento adequado de água a este, é fator inibitório da germinação durante o desenvolvimento, conforme observado em frutos carnosos como o tomate. O estresse hídrico causado pelo potencial osmótico mais baixo pode aumentar a concentração de ABA no embrião, embora isso nem sempre

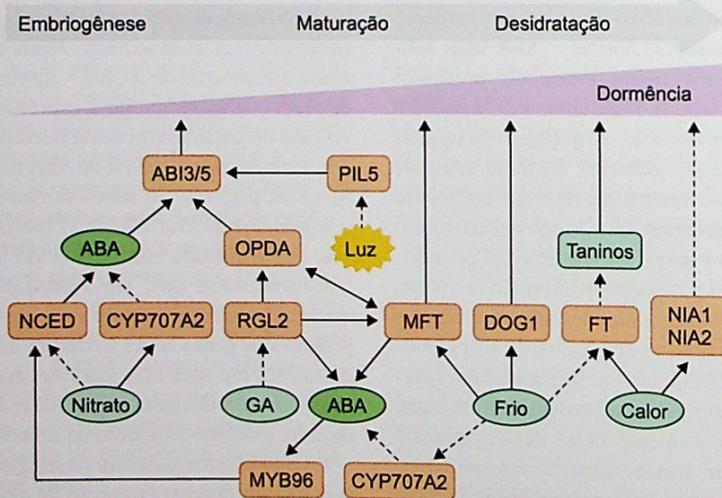


Figura 20.7 Modelo simplificado mostrando as ações de alguns fatores endógenos (AG, ABA e taninos) e ambientais (nitrito, luz, frio e calor) sobre a indução de dormência em sementes de *Arabidopsis*. Setas contínuas indicam regulação positiva (promoção) e setas tracejadas, regulação negativa (inibição) pela luz e temperatura baixa. Elementos mediadores das ações são mostrados dentro das molduras laranja. OPDA: 12-oxo-phytodienoic acid (ácido 12-oxofitodienoico); MFT: *mother of FT and TFL1* (mãe do FT e TFL1); NCE1: *nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase* (dioxigenase do nove-cis-epoxycarotenóide); CYP707A2: *cytochrome P701 ABA8' hidroxilase* (hidroxilase do citocromo P701 ABA8'); RGL2: *repressor-of-GA-like2* (semelhante ao repressor do GA 2); DOG1: *delay of germination1* (retardador da germinação 1); FT: *flowering locus T* (locus T da floração); NIA1: *nitrate reductase1* (redutase do nitrato 1); NIA2: *nitrate reductase2* (redutase do nitrato 2); PIL5: *phytochrome-interacting factor3-like5* (semelhante ao fator de interação3 com fitocromo 5); ABI3/5: *abscisic acid insensitive 3/5* (insensível ao ácido abscísico 3/5).

ocorra. Outras substâncias inibidoras – provavelmente alcaloides – no fruto, como as detectadas em algumas espécies de *Psychotria* (Rubiaceae), também podem restringir a germinação. Em muitas outras espécies – particularmente arbóreas tropicais –, é possível que outras substâncias (especialmente compostos do metabolismo secundário) atuem durante a fase de desenvolvimento da semente. Em *Myroxylon peruiferum* (cabreúva), por exemplo, detectou-se a presença de cumarina no fruto e na semente, podendo essa substância estar envolvida na supressão da germinação precoce.

Germinação

Terminologia e tipos

A germinação inicia-se com a entrada de água na semente (embebição) que ativar o metabolismo, culminando no crescimento do eixo embrionário. De acordo com o critério fisiológico, a germinação se completa quando uma parte do embrião, em geral a raiz primária (chamada, nesse estágio, *radícula*), penetra e trespassa os tecidos que o envolvem. Além desse, existem outros critérios de germinação, como a curvatura gravitropica da radícula ou a emergência da plântula através da superfície do solo (critério agrônomico ou tecnológico).

Se, do ponto de vista fisiológico, a germinação se encerra com a protrusão radicular, em estudos de ecofisiologia, os atributos da plântula também devem ser levados em consideração. A plântula é o resultado da germinação, mas até quando um indivíduo jovem pode ser considerado uma plântula ainda não está bem definido. Um critério morfológico estabelece o uso do termo “plântula” até o surgimento do primeiro eófilo (primeira folha após os cotilédones), quando então a planta entraria na fase juvenil. Outro critério, este de natureza fisiológica, considera plântula enquanto essa depender, predominantemente, das próprias reservas seminais.

No caso das dicotiledôneas, a classificação das plântulas em geral leva em consideração o comprimento do hipocótilo (*epigeas* ou *hipógeas*), a exposição dos cotilédones (*criptocotiledonar* e *fanerocotiledonar*) e a natureza dos cotilédones (*carnosos* ou *foliáceos*). Na germinação *epigea*, o crescimento do hipocótilo faz com que os cotilédones se elevem acima do solo (p. ex., feijão), enquanto na *hipógea* o hipocótilo é curto, de modo que os cotilédones permanecem no solo (p. ex., ervilha). Uma plântula é *criptocotiledonar* quando seus cotilédones permanecem envolvidos pelos tegumentos, como em *Viola bicuhyba*, e *fanerocotiledonar* quando estão livres, como em *Trema micrantha* (candiúva). Finalmente, cotilédones carnosos, exemplificados em *Hymenaea courbaril* (jatobá), apresentam função principalmente armazenadora de energia, enquanto cotilédones foliáceos, como em *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), são predominantemente fotossintéticos, fazendo o papel de verdadeiras folhas.

Etapas

Embebição

A embebição (hidratação dos tecidos) é um processo físico, relacionado basicamente com as propriedades coloidais e as diferenças de potencial hídrico (Ψ_w) entre a semente

e o meio externo. No início da embebição, o componente matricial (Ψ_m) da semente é o principal responsável pela difusão da água para o seu interior, mas, com o aumento da disponibilidade de água livre e do metabolismo na semente, o componente osmótico ($\Psi\pi$) aumenta sua participação no processo.

Os valores de Ψ em sementes secas são muito variáveis, situando-se entre -50 MPa e -400 MPa, produzindo gradiente de potencial hídrico relativamente elevado entre a semente e um solo com, por exemplo, -2 MPa (próximo ao ponto de murcha permanente de diversas culturas, como a cana-de-açúcar). Entretanto, para que ocorra a embebição, os tecidos que envolvem o embrião precisam ser permeáveis à água. Considerando as estruturas da semente e do fruto, existem sementes com envoltórios impermeáveis (impedem a entrada de água no interior da semente), parcialmente permeáveis (reduzem a velocidade de embebição) ou totalmente permeáveis (não afetam a velocidade de embebição).

Com base na cinética de absorção de água, as etapas da germinação de uma semente não dormente ou com baixa dormência formam uma curva trifásica: na fase I, que constitui a embebição propriamente dita, o teor de água na semente aumenta rapidamente, seguido de estabilização na fase II, mantida até o início da germinação visível (protrusão radicular), quando se inicia a fase III, caracterizada por um segundo aumento na captação de água em decorrência do crescimento da plântula (ver Figura 20.10 mais adiante).

A rápida entrada de água na fase I causa alterações na permeabilidade das membranas resultadas da mudança do estado gel (na semente seca) para o estado líquido-cristalino, característico das membranas normalmente hidratadas (Figura 20.8). Essas alterações promovem o vazamento de metabólitos de baixo peso molecular e outros solutos para o meio, sendo essa perda reduzida com o retorno à configuração líquido-cristalina. A pré-umidificação e o aquecimento da semente não hidratada podem reduzir eventuais danos decorrentes da embebição. Alguns carboidratos (especialmente a sacarose) e fosfolípidios (como o N-acetilfosfatidiletanolamina), cuja concentração aumenta durante a embebição de sementes de algodão, podem estar envolvidos na estabilização e no reparo das membranas.

A fase II, ou fase estacionária, caracteriza-se pela estabilização no conteúdo de água e pela ativação de processos metabólicos necessários para o início do crescimento do embrião. A fase II termina com a protrusão da raiz primária através da

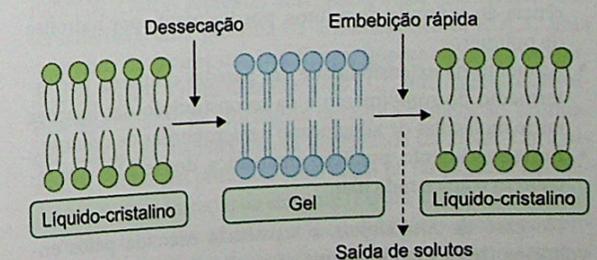


Figura 20.8 Mudanças de fase das membranas durante a dessecação e a embebição da semente. Adaptada de Oliver *et al.* (1998).

testa. A duração dessa fase e a quantidade de água absorvida dependem do potencial hídrico do meio, da temperatura e da presença ou não de dormência. Sementes dormentes podem conservar-se na fase II durante meses ou anos, até a quebra da dormência. Nessa fase, o embrião ainda é capaz de suportar a desidratação, característica perdida na fase III, que marca o início do crescimento do eixo embrionário e a retomada da absorção de água. Nas duas primeiras fases, o desenvolvimento se dá sem divisão celular, enquanto a fase III está associada ao crescimento da radícula e ao início da divisão celular no embrião.

Crescimento radicular

Em sementes de *Arabidopsis*, a protrusão radicular (após cerca de 32 h do início da embebição) decorrente do alongamento do eixo embrionário e traspasse do endosperma pela radícula é precedida de uma primeira etapa representada pela ruptura da testa, que ocorre aproximadamente após 25 a 28 h da embebição. Nessa primeira etapa, o crescimento das células corticais da radícula é baixo, e a expansão ocorre inicialmente nas células epidérmicas, movendo-se progressivamente para as camadas mais internas. A direção de crescimento do eixo do embrião é radial, principalmente na epiderme, e se dá nas células subjacentes à região na qual a testa se romperá. Inicialmente, esse crescimento radial limita-se à radícula e à região inferior do hipocótilo; mas, na transição para a etapa de protrusão radicular, o crescimento se expande como uma onda, ao longo do comprimento do eixo, para as regiões superiores do hipocótilo. Nessa fase, o crescimento da célula é predominantemente longitudinal, em particular nas células corticais da região mediana do hipocótilo. Esse crescimento longitudinal é que dará origem à segunda etapa do processo germinativo de *Arabidopsis*, ou seja, a ruptura do endosperma e a protrusão radicular. O topo da radícula, no qual ocorre a indução da primeira etapa da germinação e o crescimento começa, é o sítio de onde se irradia a expressão gênica relacionada com a promoção do crescimento. A segunda etapa da germinação, por sua vez, é precedida pela expressão gênica na região mediana do hipocótilo, destacando-se *EXPA3* (*EXPA3*), codificante para expansina (ver Capítulo 8), e *SUBTILISIN4.11* (*SBT4.11*), que codifica uma protease da parede celular. A partir desse sítio de indução, a atividade promotora desses dois genes se espalha para regiões superiores do eixo embrionário antes da conclusão do processo germinativo e da expansão da região superior do hipocótilo (Figura 20.9).

O crescimento da radícula pode resultar de:

- Redução no potencial osmótico (Ψ_w) das células, em decorrência do acúmulo de solutos, possivelmente por hidrólise de polímeros
- Aumento na extensibilidade das paredes celulares, por intermédio do rompimento e da reconstituição das ligações entre moléculas de xiloglucano e microfibrilas de celulose
- Enfraquecimento, por ação enzimática, dos tecidos que recobrem o ápice radicular.

No caso de *Arabidopsis*, a resistência exercida pelos envoltórios (testa e endosperma) é o principal fator limitante do início do crescimento do eixo embrionário. A capacidade de o embrião superar ou não essa resistência depende da

comunicação química entre ele e o endosperma, mediada por hormônios (GA e ABA), e de alterações na expressão gênica, que, por sua vez, respondem a estímulos ambientais (Figura 20.9). O início da degradação de reservas requer provavelmente o movimento de GA do embrião para o endosperma, não ocorrendo de maneira autônoma.

Além do enfraquecimento dos envoltórios, a germinação depende do potencial de crescimento do embrião. Durante a embebição, as células do embrião se expandem em um processo que envolve ao mesmo tempo a entrada de água do apoplasto e o enfraquecimento das paredes celulares, o qual, por sua vez, está ligado à quebra de polissacarídeos pela ação de proteínas CWRP (em inglês, *cell wall remodeling proteins*, ou proteínas remodeladoras da parede, como expansinas e glucanases), sintetizadas no ápice do primórdio radicular (Figura 20.9).

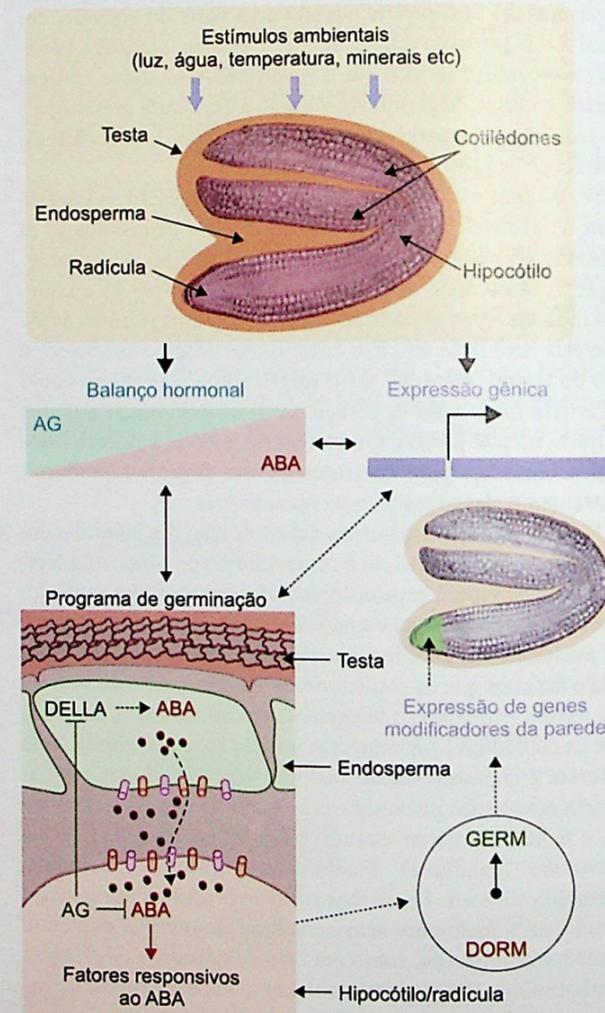


Figura 20.9 Esquema simplificado ilustrando as etapas da comutação do metabolismo germinativo em sementes de *Arabidopsis*. Sinais ambientais são percebidos em tecidos do embrião e endosperma, causando alterações no balanço hormonal e na expressão gênica, as quais colocarão o programa de germinação no modo "ligado" ou "desligado". No modo "ligado", ocorrerá a indução de genes relacionados com o afrouxamento da parede celular, na região apical da radícula. Adaptada de Bassel (2016) e Chahtane *et al.* (2016).

Em sementes de tomate, a maior atividade de enzimas como endo-beta-mananase, expansinas, beta-1,3-glucanase, poligalacturonase ou pectinase, quitinase e arabinosidase pode estar envolvida na hidrólise parcial das paredes celulares do endosperma durante a germinação. Nessa espécie, endo-beta-mananase e expansinas são expressas especificamente na região do endosperma que cobre o ápice radicular. No caso das enzimas poligalacturonase e quitinase, a transcrição ocorre tanto no endosperma quanto na extremidade da radícula. Por sua vez, sementes dormentes de tomate não são capazes de produzir enzimas que degradam a parede celular.

Metabolismo da semente germinante

Durante a embebição, ocorre a reativação do metabolismo por intermédio de substâncias e estruturas preservadas após a fase de dessecação. O aumento na atividade respiratória pode ser detectado poucos minutos após o início da embebição e, muitas vezes, o padrão de consumo de oxigênio assemelha-se ao da entrada de água, exibindo três fases. Esse padrão de consumo de oxigênio apresenta uma fase de aumento rápido, com duração variável dependendo da semente; uma fase estacionária, com aumento lento ou consumo de oxigênio estabilizado (algumas sementes, como a cevada, a mamona e o arroz, não apresentam essa fase); e uma terceira fase caracterizada por novo aumento na taxa respiratória, associado à protrusão radicular. Pode ainda ser observada uma quarta fase em plântulas mantidas no escuro, na qual a respiração diminui em consequência da exaustão das reservas cotiledonares. O aumento da resistência à difusão de oxigênio através dos envoltórios, como observado em *Brachiaria decumbens* (capim-braquiária) e *B. brizantha* (braquiária), também determina a estabilização no consumo desse gás, além de acelerar a produção de etanol, afetando negativamente a qualidade fisiológica da semente. Essa hipótese é corroborada por experimentos nos quais a remoção do tegumento causa uma redução da fase estacionária.

A curva de ATP durante a germinação também exibe aspecto trifásico: um rápido aumento durante as primeiras horas de embebição, provavelmente por síntese *de novo* via fosforilação oxidativa; uma fase estacionária, com taxas equivalentes de produção e consumo; e um novo aumento no conteúdo de ATP, associado ao crescimento do embrião. Apesar de a fosforilação oxidativa ser considerada a principal fonte de ATP no início do processo germinativo, no decorrer da embebição o embrião é exposto à anaerobiose parcial. Principalmente em sementes grandes, a maior resistência à difusão de oxigênio no meio líquido dificulta a penetração do gás nos tecidos mais internos, ocorrendo a ativação da fermentação alcoólica e o estabelecimento de quocientes respiratórios (CO_2/O_2) maiores que 1. À medida que o embrião cresce e as mitocôndrias se tornam mais ativas, há maior disponibilidade de oxigênio e quocientes respiratórios menores são observados, ocorrendo um aumento no suprimento de ATP graças à ativação do ciclo de Krebs e da via oxidase do citocromo.

Durante a fase I da embebição, a respiração é mantida graças à disponibilidade de açúcares, principalmente sacarose, rafinose e estaquiase, já que a mobilização das principais substâncias de reserva – amido, proteínas e lipídios – ocorre após o início do crescimento do embrião, na fase III da germinação.

Entre os processos ligados à reativação do metabolismo disparado pela embebição, destacam-se a síntese de mitocôndria, o reparo de DNA, a tradução e/ou a degradação de RNAm armazenados, a transcrição e a tradução de RNAm novo e a mobilização de reservas, os quais são acompanhados pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente peróxido de hidrogênio. A produção de ERO durante a embebição contribui para a mobilização de reservas por intermédio de oxidação seletiva de proteínas e RNAm, e pela ativação de proteínas remodeladoras da parede. Por sua vez, a regulação da concentração de ERO pela maquinaria antioxidante da célula é fundamental para assegurar o balanço adequado entre processos oxidativos sinalizadores que favorecem a germinação e processos oxidativos danosos que impedem ou retardam a germinação.

Em *Arabidopsis*, na fase I não se observa a transcrição de genes que codificam proteínas ribossômicas (proteínas-r), sendo as reações catalizadas por enzimas preservadas na semente e ativadas pela hidratação. Esgotamento de substrato e substituição do sistema mitocondrial originalmente presente na semente seca por outro, estrutural e funcionalmente mais eficiente, poderiam ser fatores responsáveis pela fase estacionária. A síntese proteica *de novo* inicia-se logo após a hidratação, a partir de substratos (enzimas, RNAt, ribossomos, RNAm etc.) presentes na semente madura e reativados com a embebição. Nessa fase, existe grande quantidade de RNAm conservado, porém apenas parte dela será transcrita e traduzida em proteínas. De fato, entre as proteínas sintetizadas *de novo*, aquelas envolvidas na tradução de RNAm (10% do total) são sintetizadas somente a partir de 8 h de embebição, indicando que a maquinaria traducional armazenada já está em atividade nas primeiras horas de embebição, ainda que a quantidade de proteínas sintetizadas nesse período (0 a 8 h) seja relativamente baixa (Figura 20.10).

A baixa atividade traducional nas primeiras horas de embebição poderia representar um mecanismo de proteção ao embrião nas primeiras etapas da germinação, ou seja, se o ambiente for eventualmente desfavorável à germinação e ao estabelecimento da plântula, o programa metabólico da fase final da maturação poderia ser estendido, suspendendo-se assim a retomada plena do metabolismo germinativo e mantendo a dormência da semente.

Entre as proteínas sintetizadas nas primeiras 8 h após o início da embebição, destacam-se as proteínas LEA e RAB18 (deidrina), ambas envolvidas na tolerância ao dessecação, que permitem que o embrião suporte desidratação até a protrusão radicular. Outras proteínas observadas nessa fase foram: CRA (cruciferina), uma proteína de armazenamento; ROC1, uma isomerase da família das ciclofilinas, importante em mecanismos de reparo e remodelagem; e SBT1.7, uma protease envolvida na produção de mucilagem durante a embebição, produto que auxilia na manutenção da integridade do DNA. Curiosamente, muitas das proteínas observadas na fase I estão associadas à fase de maturação da semente (Figura 20.10).

A fase II, intermediária, período durante o qual a porcentagem de hidratação da semente permanece mais ou menos constante, caracteriza-se pela ativação de uma série de processos metabólicos relacionados com a produção de energia e

mobilização de reservas. Nessa fase, há um acentuado aumento na expressão de proteínas-r e na atividade ribossômica, facilitando a síntese *de novo* de proteínas necessárias à germinação. Na fase II, que em *Arabidopsis* corresponde ao período de 8 a 32 h após o início da embebição, destacam-se as proteínas:

- KAT2 (3-cetoacil-CoA tiolase) ligada à oxidação de ácidos graxos
- MDAR6 (monodeidroascorbato redutase), antioxidante
- CAT2 (catalase), ligada à quebra do peróxido de hidrogênio
- HSP (proteínas de choque térmico), ligadas à proteção da conformação proteica
- GLN1.3 (glutamina sintetase), ligada à assimilação e à remobilização de nitrogênio inorgânico
- MST1 (mercaptopiruvato sulfurtransferase 1), envolvida em mecanismos de detoxificação
- TPP2 (tripeptidil peptidase), uma protease
- PAB1, uma subunidade do proteossomo 20S, ligada à degradação de proteínas de reserva
- ATMS1 (cobalamina-independente Met sintase), envolvida na síntese de metionina
- PYK10, proteína do catabolismo de glicosinatos, cuja degradação deve representar importante fonte de enxofre e nitrogênio.

Na fase III, o estabelecimento da plântula é preparado graças à tradução de componentes do citoesqueleto, como as proteínas ACT2 (actina 2) e TUB3 (tubulina 3). Entretanto, proteínas envolvidas na reorganização do citoesqueleto podem

ser detectadas já na fase II, indicando que esse evento é necessário para manter as altas taxas de alongamento celular que precedem a protrusão radicular (Figura 20.10). A síntese de DNA ocorre apenas na fase de crescimento do eixo embrionário, quando se iniciam as divisões mitóticas. O aumento no conteúdo de DNA, após o início da embebição, resulta, provavelmente, do reparo e da reidratação de moléculas preexistentes, bem como da síntese de DNA mitocondrial.

Controle

Em algumas sementes, como *Nicotiana* e *Arabidopsis*, a ruptura da testa e a do endosperma são eventos distintos e temporalmente separados. Enquanto o primeiro é consequência do intumescimento da semente decorrente da embebição (mais especificamente, de entrada extra de água ao final da fase 2), o segundo decorre da degradação enzimática do endosperma micropilar (parte do endosperma que cobre o topo da radícula), provocando um "buraco" no tecido, através do qual a radícula emerge (Figura 20.11).

Pesquisas realizadas em plantas-modelo, como *Arabidopsis*, tomate e tabaco, mostram que o controle da germinação ocorre por meio de interações entre o embrião e o tecido que o envolve (endosperma e tegumento). Essa interação entre o eixo embrionário e os tecidos de reserva envolve hormônios vegetais, sendo a indução da síntese de alfa-amilase pelo ácido giberélico (GA_3) no endosperma de cevada um exemplo desse mecanismo. Estudos baseados na distribuição de transportadores de ABA mostram que esse hormônio é produzido

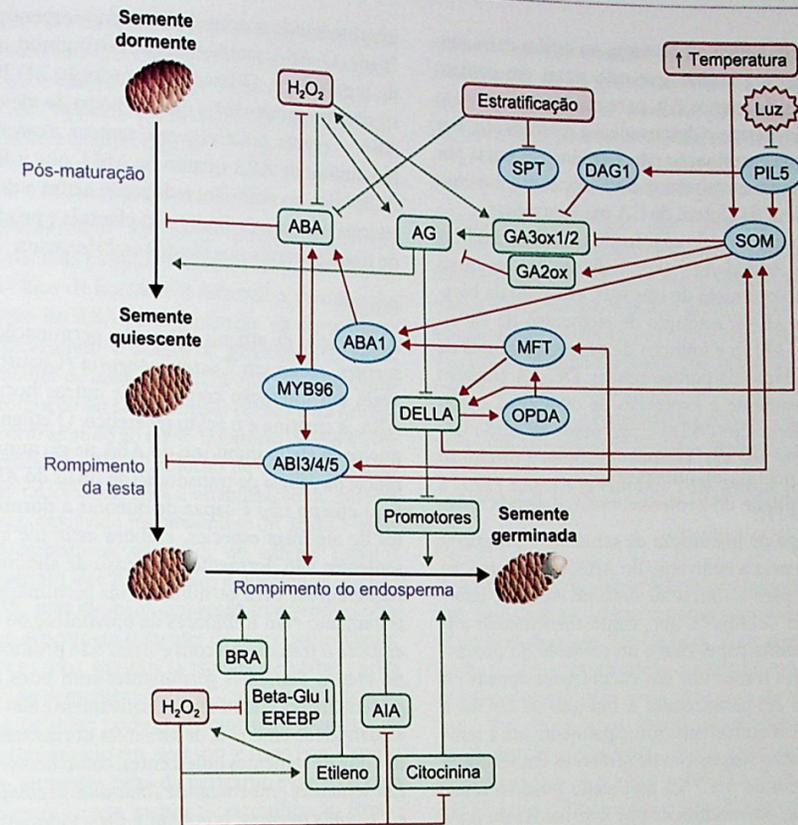


Figura 20.11 Ação de fatores ambientais, hormônios e fatores de transcrição durante a transição do estado de dormência de sementes de tabaco, para a germinação. Ações regulatórias positivas (favoráveis à germinação: →) são indicadas por linhas verdes, e ações negativas (repressão à germinação: -) por linhas vermelhas. ABA: ácido abscísico; AG: giberelina ativa; BRA: brassinosteroides; Beta-Glu I: beta-1,3-glucanase classe I; EREBP: ethylene responsive element binding proteins (proteínas de ligação a elemento sensível ao etileno); H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; SPT: spatula; DAG1: *dof affecting germination 1* (*dof* influenciadores da germinação 1); SOM: *somnus*; GA3ox: *gibberellin A3 oxidase* (oxidase da giberelina A3); GA2ox: *gibberellin A2 oxidase* (oxidase da giberelina A2); PIL5: *PIF3-like 5* (semelhante a PIF5; PIF3); MFT: *mother of FT and TFL1* (mãe de FT e TFL1); OPDA: ácido 12-oxofotodienoico; MYB96: *MYB domain protein 96* (proteína de domínio MYB96; MYB); ABA1: regulador da via de resposta do ABA; ABI4-5: *abscisic acid insensitive 4/5* (insensível ao ácido abscísico 4/5). Adaptada de Kucera *et al.* (2005).

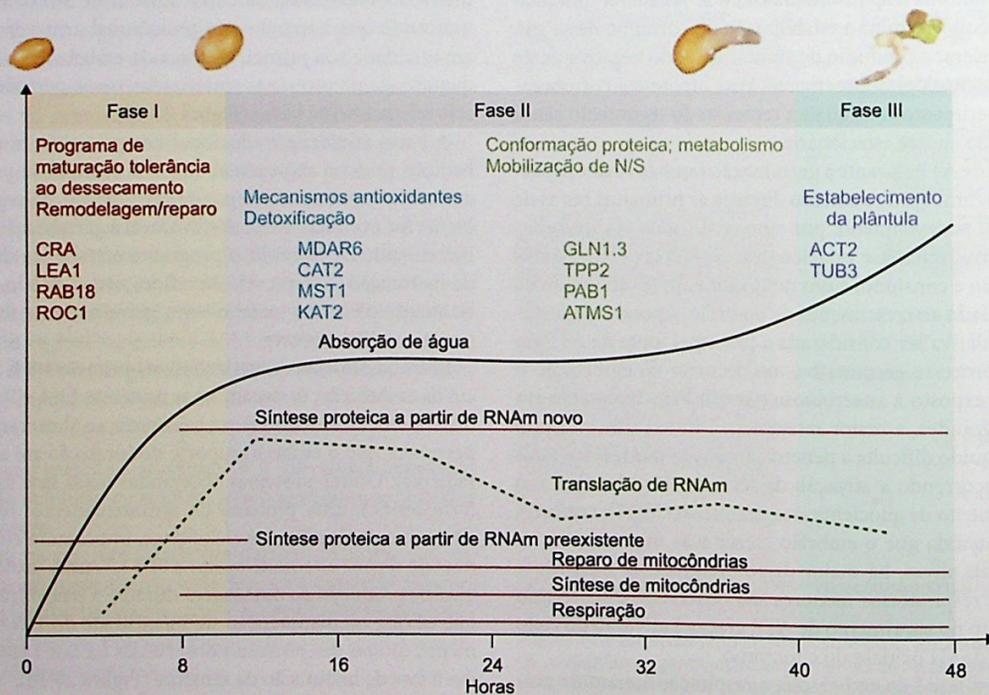


Figura 20.10 Padrão de variação do conteúdo de água (linha preta), tradução de RNAm (linha tracejada verde) e alguns eventos fisiológicos e metabólicos (linhas vermelhas) associados às três fases da captura de água pela semente durante a germinação. As siglas em colunas coloridas representam grupos de proteínas sintetizadas *de novo* nas diferentes fases de embebição, com a descrição das respectivas funções. Fonte: Bewley (1997) e Galland *et al.* (2013).

no endosperma e transportado para o embrião, embora este também o produza, enquanto a giberelina é sintetizada no embrião de sementes germinantes de *Arabidopsis* e transportada para o endosperma.

Giberelina e ABA

Por meio do uso de linhagens mutantes, assim como da aplicação de hormônios ou seus inibidores, a maioria dos estudos sobre o papel dos hormônios no controle da germinação concentra-se na AG, no ABA e o no etileno. A giberelina estimula a germinação de sementes não dormentes, agindo também na liberação da dormência. A presença de inibidores da biossíntese de giberelina impede a germinação de várias espécies, processo que ocorre em mutantes deficientes nesse hormônio apenas quando há aplicação de AG, ou quando o embrião é isolado do restante da semente. Giberelinas promovem a germinação atuando como mediadores entre fatores ambientais, como luz e temperatura, e fatores internos restritivos da germinação, como o endosperma. São propostos dois mecanismos para explicar o papel da AG no controle da germinação:

- Indução de genes que codificam enzimas que reduzem a resistência mecânica dos envoltórios ao crescimento do embrião e mobilizam nutrientes para o embrião
- Efeito direto sobre o potencial de crescimento do embrião, mais propriamente a capacidade da célula de gerar potencial de pressão intracelular suficiente para vencer a resistência da parede e se expandir.

Em sementes de *Arabidopsis*, a indução precoce de genes ligados à biossíntese de AG na radícula e a presença de genes capazes de responder à giberelina em tecidos não produtores desse hormônio sugerem que a AG embrionária se difunde, já nas primeiras etapas da embebição, para o endosperma micropilar, tornando-o competente para o rompimento durante a etapa final da germinação (protrusão radicular). O aumento de giberelinas ativas durante a fase de ruptura da testa se dá graças ao aumento da expressão de GA3ox (ver Capítulo 11) tanto no embrião (radícula e cotilédone) quanto no endosperma (micropilar e periférico), causando aumento no teor de AG necessário ao enfraquecimento do endosperma micropilar. A degradação do endosperma, portanto, depende de um sinal

do embrião, como em *Lepidium sativum*, no qual o enfraquecimento do endosperma requer que este esteja em contato com o embrião por pelo menos 2 h, para que o sinal químico se mova para o endosperma e desencadeie a germinação. Por sua vez, sementes cuja germinação não sofre interferência por parte das estruturas que envolvem o embrião, como é o caso da soja, não dependem da síntese de GA para germinar.

Sabe-se que GA atua na degradação de proteínas DELLA (RGL2 e RGL3, em *Arabidopsis*) (ver Capítulo 11), as quais inibem a germinação por meio de três vias: estímulo da biossíntese de ABA, via ABA1; estímulo de elementos da via sinalizadora do ABA (ABI5); e inibição da expressão gênica de proteínas de remodelação da parede celular. DELLA também pode regular positivamente a expressão de oxilipinas, como o ácido 12 oxo-fitodienoico (OPDA), precursor do ácido jasmônico. O OPDA, por sua vez, também estimula a produção de ABA por meio dos fatores MFT (*mother of FT and TFL1*) e ABA1 (ver Figura 20.11).

Se, no final da etapa de maturação da semente, o programa metabólico é voltado para a inativação do ABA, na germinação o programa volta-se para a síntese *de novo* de AG, por intermédio da ativação de *GA3ox1/2*, que, como mencionado anteriormente, desempenha papel-chave no controle do processo germinativo, e cujos transcritos são encontrados apenas no embrião de sementes em germinação. A indução de *GA3ox* é sensível a vários fatores ambientais, principalmente luz e temperatura. A estratificação (exposição de sementes embebidas a temperaturas da ordem de 5 a 7°C) tem efeito positivo sobre a expressão de *GA3ox*, provavelmente por intermédio do fator *spatula* (SPT), que codifica uma proteína repressora de *GA3ox*. Temperaturas elevadas (na faixa de 22 a 32°C), por sua vez, inibem a germinação de *Arabidopsis*, regulando negativamente a expressão de *GA3ox*, reduzindo assim a biossíntese de giberelina. A complexa cadeia regulatória da síntese de AG conta ainda com a ação dos fatores ABI3 (*ABA-insensitive 3*), ABI5 (*ABA-insensitive 5*) – pertencentes à via sinalizadora do ABA – e DELLA, que também regulam negativamente *GA3ox* por meio da ativação de *somnus* (SOM) (ver Figura 20.11).

Os estudos em *Arabidopsis* sugerem que a resposta da semente à giberelina seja determinada pela quantidade de ácido abscísico (ABA) produzido na semente durante o desenvolvimento e/ou pelo grau de dormência imposto pelo ABA, bem como pela quantidade de ABA produzida durante a embebição, particularmente em sementes dormentes. ABA e GA atuam, portanto, de modo *inverso* no controle da síntese das enzimas envolvidas na degradação de paredes celulares do endosperma: enquanto o primeiro hormônio inibe – ou não causa efeito – sobre a expressão dos genes, o segundo promove a expressão. Experimentos realizados com sementes de tomate e café, cuja germinação é inibida pelo ABA, mostram que o efeito do ABA se dá por intermédio da inibição de endo-beta-mananases, enzimas envolvidas na hidrólise de galactomananos (carboidratos de reserva presentes nas paredes celulares do endosperma). No café (Silva *et al.*, 2004), o controle que o ABA exerce sobre a germinação parece envolver indiretamente a inibição do potencial de crescimento do embrião. Em espécies do gênero *Vellozia*, o ABA também parece desempenhar importante papel no controle da germinação,

intermediando a ação da luz e da temperatura (Vieira *et al.*, 2016). O ABA também atua restringindo a disponibilidade de metabólitos. O fator de transcrição MYB96 (*myeloblastosis domain protein96*) – que participa da via da sinalização do ABA – regula positivamente tanto a expressão de genes da biossíntese de ABA quanto de ABI4, que inibe o catabolismo de lipídios no embrião, reduzindo assim a disponibilidade de energia para o crescimento da plântula e produzindo acúmulo de triacilgliceróis nos tecidos embrionários.

Etileno

A aplicação de etileno estimula a germinação de algumas sementes, como em *Cucumis anguria* (Cucurbitaceae), muitas vezes em interação com a luz e outros hormônios, como o ABA, a cinetina e o ácido giberélico. O etileno parece contrapor-se ao efeito inibitório do ABA na germinação por interferência na cadeia de transdução de sinais do ABA. Isoladamente, o etileno não é capaz de quebrar a dormência de sementes de algumas espécies, embora estimule a germinação de sementes não dormentes. É o caso de algumas sementes que requerem luz para germinar e cuja germinação é inibida após tratamento com inibidores da biossíntese ou ação do etileno, embora o tratamento com etileno não promova a germinação no escuro. Sementes germinantes com bons índices de vigor podem liberar quantidades relativamente elevadas desse gás, e a quantidade emanada de sementes dormentes tende a ser menor que de sementes quiescentes, como ocorre em amendoim. Em sementes embebidas de *Amaranthus caudatus* (amaranto) e *Cucumis anguria*, o etileno é detectado antes da protrusão da radícula, havendo um pico de produção associado à germinação visível. Na semente, o sítio de produção de etileno localiza-se quase exclusivamente no eixo embrionário, particularmente nas zonas de alongação e diferenciação celular na radícula. Primariamente, o etileno parece agir na promoção do crescimento radial do hipocótilo e no aumento da taxa de respiração. Assim como as giberelinas, acredita-se que o etileno possa também estimular a síntese de enzimas na região do ápice da radícula relacionadas com a degradação do endosperma, entre elas a endo-beta-mananase e a beta-1,3-glucanase. O etileno está associado ainda ao aumento da respiração e à redução do potencial hídrico na semente.

Citocininas e auxinas

A germinação também pode ser promovida pela aplicação de citocininas, como em *Rumex obtusifolius* (língua-de-vaca), porém os efeitos do hormônio endógeno nesse processo ainda são pouco conhecidos, acreditando-se que ele possa estar envolvido em processos antioxidativos. Assim como em diversos outros fenômenos, a ação das citocininas no controle da germinação e dormência parece envolver a interação com outros hormônios, como a inibição do ABA e o estímulo do etileno.

O papel das auxinas na indução da germinação é controverso, sendo sua ação mais diretamente relacionada com o alongamento do hipocótilo e o crescimento da plântula. O uso de inibidores de transporte de auxinas (TIBA, ácido 2,3,5-triiodobenzoico) afeta negativamente a velocidade de germinação, sugerindo a necessidade do transporte de auxinas para a germinação. A expressão da proteína transportadora de auxina

AUX1 (*auxin resistin 1*) no ápice da radícula não é essencial para a protrusão radicular, mas desempenha papel importante na velocidade de germinação por intermédio da ativação de genes *CYCD* (ciclina tipo D), conhecidos por participar da germinação regulando a divisão celular.

Brassinosteroides e ácido jasmônico

A ação dos brassinosteroides (BR) na germinação ainda não está bem esclarecida, mas pesquisas recentes com *Arabidopsis* sugerem que essa classe de hormônios estimule a germinação e antagonize o efeito do ABA na manutenção da dormência, possivelmente promovendo a síntese de giberelina. Estudos realizados em sementes de tabaco sugerem que AG e BR agem em paralelo na promoção do alongamento celular e na germinação, ambos se contrapondo ao efeito inibitório do ABA (ver Figura 20.11). O papel de BR na indução de etileno em *Arabidopsis* deve estar relacionado com a estabilização da enzima ACS (ACC sintase), envolvida na biossíntese do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, precursor do etileno. Estudos em *Arabidopsis* indicam que BR regulam a dormência, não só se opondo ao ABA, mas também aumentando a produção de etileno, o que deve ocorrer em sementes de monocotiledôneas.

Ácido jasmônico, uma substância isolada de várias partes da planta (incluindo sementes imaturas), inibe a germinação de sementes, mas também pode contribuir para a quebra de dormência, como observado em *Acer* spp. e trigo (ver Capítulo 14). Nesse caso, sementes livres do pericarpo e tratadas com o hormônio requerem tempo menor de estratificação (tratamento de frio) para adquirir a capacidade de germinar. O papel do metiljasmonato na redução da dormência de sementes de trigo parece estar relacionado com mudanças no conteúdo de ABA no embrião e na expressão de genes (*NCED1* e *ABA8OH1*) envolvidos na biossíntese de ABA.

Interações entre hormônios e ERO

A rede de interações entre os hormônios ABA-AGs-C₂H₄ no controle da germinação é complexa, destacando-se as interações antagonicas entre o ABA e as giberelinas, o etileno e os brassinosteroides, e os jasmonatos e as auxinas. Associado a esse fato, vem merecendo cada vez mais atenção o papel das espécies reativas do oxigênio (ERO) como agentes sinalizadores e reguladores da germinação, por meio das redes hormonais, especialmente ABA e AG, mas também o etileno. Hormônios com papel mais ativo no processo de germinação (AG e etileno) agem positivamente sobre a produção de ERO, particularmente H₂O₂, e também são influenciados positivamente por essa molécula. Já em relação ao ABA, sua biossíntese e ação são afetadas negativamente pelo H₂O₂, que, por sua vez, também é inibido pelo ABA. O H₂O₂ contribui para o enfraquecimento do endosperma estimulando – por meio da oxidação proteica, da ativação de cinases e das mudanças no potencial *redox* – a expressão de hidrolases (Tabela 20.1).

Esta seção tratou de alguns aspectos do controle da germinação, principalmente por intermédio da ação de hormônios vegetais. Além disso, trabalhos com mutantes (particularmente *Arabidopsis*) mostram que a germinação e a dormência devem estar submetidas a um complexo controle genético, conforme

mostra o grande número de loci identificados até o presente momento. Esses genes, por sua vez, determinam toda uma gama de caracteres da semente, desde morfológicos até fisiológicos, que afetarão sua resposta aos diversos fatores do meio.

Fatores que influenciam a germinação

Condições ambientais que propiciam uma germinação bem-sucedida, em geral, refletem as condições que a plântula normalmente encontra em seu ambiente natural. Se tais condições permitirem que a planta jovem cresça e se reproduza, isso assegurará o sucesso do genótipo; portanto, a sobrevivência em determinado ambiente passa pela capacidade de resposta da semente aos diferentes sinais do meio. Nesta seção, será discutido como as sementes respondem a alguns fatores ambientais (luz, temperatura, potencial da água, fatores químicos, gases e fatores bióticos) e a fatores endógenos (morfologia e viabilidade). A dormência será tratada em um item à parte.

Luz

A luz é percebida pela semente por meio do pigmento *fitocromo*, uma cromoproteína vegetal que absorve luz vermelha (V), vermelho-extremo (VE) e azul. Esse pigmento é encontrado na forma Fv, com absorção máxima em V (660 nm), e na forma Fve, considerada ativa, com pico de absorção no VE (730 nm). Em *Arabidopsis*, foram identificados cinco genes codificadores da apoproteína, destacando-se *PHYA*, responsável pelo fitocromo A – mais sensível à degradação pela luz –, e *PHYB*, que codifica o fitocromo B, um tipo fotoestável. Comprimentos de onda ricos em VE tendem a inibir a germinação, em virtude da fotoconversão do Fve para a forma Fv. Do mesmo modo, a ação da cobertura vegetal e/ou dos tecidos que envolvem a semente durante sua maturação na planta-mãe pode fazer com que o *fotoequilíbrio* ou *estado fotoestacionário* do fitocromo (relação Fve:fitocromo total) no embrião seja baixo ao final de seu desenvolvimento. Portanto, uma semente amadurecida em um ambiente rico em VE (como sob dossel, cuja razão V:VE tende a ser baixa) pode ter sua germinação inibida e apresentar maior dormência.

De modo geral, as sementes podem ser divididas em três grupos, dependendo da resposta germinativa à luz branca:

- Sementes *afotoblásticas*, cuja germinação é indiferente à luz (como o feijão e a maioria das hortaliças)
- Sementes *fotoblásticas*, que apresentam maior germinabilidade e/ou velocidade de germinação em luz que em escuro, como *Cecropia glaziovii* (embaúba), *Plantago tomentosa* (tanchagem) e *Hyptis suaveolens*
- Sementes *fotoblásticas negativas* que germinam melhor em escuro que em luz, como *Sida rhombifolia* (guanxuma), *Catharanthus roseus* (vinca) e *Ricinus comunis* (mamona).

O fotoblastismo não é um caractere absoluto, mas depende de inúmeros fatores, como: condições de maturação; tempo de armazenamento; integridade dos tegumentos; nitrato; potencial hídrico do meio; e temperatura de germinação. Sementes maiores ou de espécies em estágios sucessionais mais avançados tendem a ser indiferentes ou ter a germinação inibida pela luz branca, enquanto as sementes pequenas ou de plantas

pioneiras necessitam de luz para germinar. A luz filtrada pelo dossel, rica em vermelho-extremo, atua inibindo a germinação especialmente de espécies consideradas pioneiras (Tabela 20.2). Nesses casos, a luz pode atuar como sinal que permite à semente detectar clareiras ou aberturas no dossel, como no caso das embaúbas.

Os efeitos da luz na germinação podem ser agrupados em três categorias principais:

- Efeitos de exposição curta: a germinação é estimulada ou inibida em uma densidade mínima de fluxo de fótons (fluência) em torno de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$, ocorrendo a saturação da resposta em fluências relativamente baixas (ao redor de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$). Portanto, respostas desse tipo são classificadas como de *baixa fluência* (RBF)
- Efeitos de exposição curtíssima: a resposta das sementes satura (ou seja, atinge seu máximo) em fluências da ordem de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$, motivo pelo qual esse tipo de resposta é conhecido como de *fluência muito baixa* (RFMB)
- Efeitos de exposição longa: nesse caso, a resposta da semente requer exposições prolongadas e altas irradiâncias (energia ou fótons por unidade de área por unidade de tempo), sendo, portanto, classificada como *resposta de alta irradiância* (RAI). Além da irradiância, a RAI depende da composição espectral da luz.

A resposta à irradiância depende, entre outros fatores, do lote de sementes, de pré-tratamentos (p. ex., tratamento

térmico), das condições de maturação e pós-dispersão, bem como das condições do ensaio de germinação. Assim, uma mesma espécie pode apresentar os três tipos de resposta à luz (RFB, RFMB e RAI), como observado em certas variedades de *Lactuca sativa* (alface): quando a semente é previamente tratada com temperatura alta, a resposta muda de RFB para RFMB; ao passo que exposições prolongadas a irradiâncias acima de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ inibem a germinação.

A constatação de que o efeito promotor de período curto de luz vermelha (V) sobre a germinação no escuro de sementes fotoblásticas de alface podia ser revertido por breve exposição ao vermelho-extremo (VE) levou à descoberta da fotoreversibilidade do fitocromo. Essa resposta, caracterizada como RBF, é regulada pelo fitocromo B. O fitocromo A, por sua vez, induz a germinação sob VE contínuo (reação de alta irradiância, RAI) ou sob irradiâncias muito baixas (RFMB). Sementes de *Arabidopsis* embebidas no escuro, e cujo fitocromo foi ativado por V, podem ter a germinação inibida por VE aplicado no início da embebição, graças à reversão do fitocromo B da forma ativa Fve para a inativa Fv. Entretanto, um segundo pulso de VE aplicado 48 h após o primeiro induzirá a germinação por intermédio da ativação do fitocromo A. Assim, no início da embebição, a resposta da semente à luz é controlada principalmente pelo fitocromo B, localizado no endosperma. A luz vermelha ativa o fitocromo B, que causará a inativação do fator PIL5 (*phytochrome-interacting factor 3-like 5*) e, conseqüentemente, reduzirá os níveis de ABA no

Tabela 20.1 Ação de giberelinas (AG) e ácido abscísico (ABA) na expressão de genes detectados antes da protrusão da radícula, em sementes de tomate embebidas. Também se apresenta o tecido no qual o gene é expresso, sendo o endosperma apical a região do endosperma que recobre o ápice radicular.

| Enzima codificada | Tecido da semente no qual ocorre a expressão | ABA | AG |
|---------------------------------|--|------------|---------|
| Endo-beta-mananase | Endosperma apical, endosperma lateral, embrião | Sem efeito | Promove |
| Celulase | Endosperma, ápice radicular | Sem efeito | Promove |
| Poligalacturonase | Endosperma apical, ápice radicular | Sem efeito | - |
| Arabinosidade | Endosperma apical, endosperma lateral | Sem efeito | Promove |
| Beta-1,3-glucanase | Endosperma apical | Inibe | Promove |
| Expansina | Endosperma apical | Sem efeito | Promove |
| Quitinase | Endosperma apical, ápice radicular | Sem efeito | Promove |
| H ⁺ -ATPase vacuolar | Endosperma apical, ápice radicular | Inibe | Promove |

Adaptada de Bradford et al. (2000).

Tabela 20.2 Capacidade relativa de germinação de algumas espécies pioneiras em diferentes condições de luz.

| Espécie | Germinação | | | |
|-----------------------------|--------------|-------------|------------------|--------------|
| | Escuro | Luz branca | Vermelho-extremo | Sob dossel |
| <i>Carica papaya</i> | Não germinou | Alta | Não germinou | Muito baixa |
| <i>Cecropia obtusifolia</i> | Não germinou | Alta | Não germinou | Muito baixa |
| <i>Ficus insipide</i> | Não germinou | Alta | Média | Baixa |
| <i>Piper auritum</i> | Não germinou | Alta | Não germinou | Muito baixa |
| <i>Croton floribundus</i> | Alta* | Alta* | - | Muito baixa |
| <i>Miconia chamiriois</i> | Não germinou | Alta | Alta** | Alta |
| <i>Solanum gracilliamun</i> | Não germinou | Muito baixa | Não germinou** | Não germinou |

*Regime de temperatura alternante de 20 a 30°C.

**Iluminação rica em VE (baixa razão V:VE).

Adaptada de Vazquez-Yanes et al. (2000) e Valio e Scarpa (2001).

endosperma. Ao mesmo tempo, o vermelho ativa o fitocromo A (localizado no embrião) e inibe PIL5, causando desrepressão da GA3ox no embrião e o aumento de AG, a qual induz a germinação (Figura 20.12). A aplicação de VE logo após a luz vermelha converterá o fitocromo B na forma Fv (considerada inativa para esse tipo de fitocromo), de modo que PIL5 poderá agir livremente, estimulando a síntese de ABA no endosperma (ver Figuras 20.11 e 20.12). Já o fitocromo A, mesmo na forma Fv, seguirá inibindo PIL5 e, portanto, liberando a síntese de AG no embrião. Nesse caso, entretanto, o ABA do endosperma penetra no embrião e sobrepuja o efeito promotor do fitocromo A sobre a giberelina, inibindo a germinação (Figura 20.12).

Contudo, quando o VE é aplicado tardiamente durante a embebição no escuro (48 h após a primeira aplicação), há um enfraquecimento da resposta ao ABA endospermico, o qual é incapaz de inibir a ação da giberelina no embrião, ocorrendo, portanto, a germinação (Figura 20.12). Essa germinação

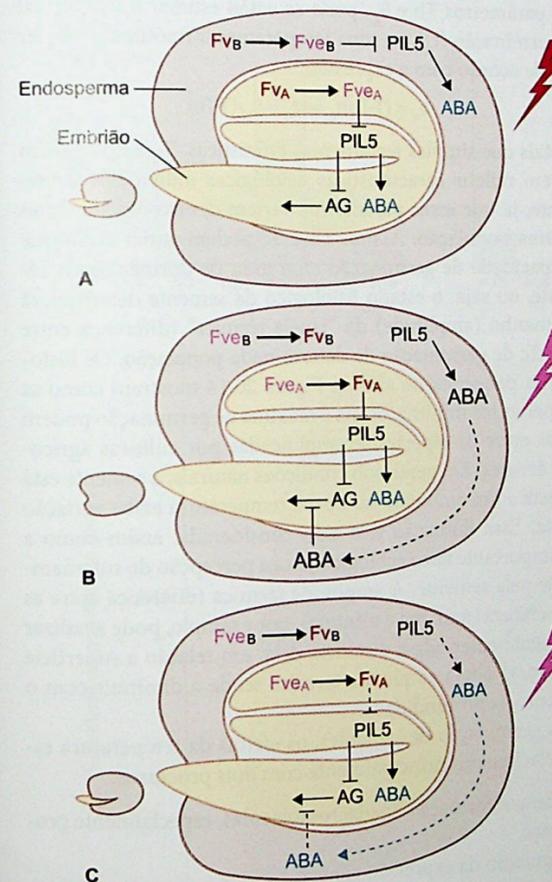


Figura 20.12 Modelo da sinalização fotoregulada da germinação, na planta modelo *Arabidopsis*. A espessura do endosperma está desproporcional, para efeito de apresentação gráfica. A. Sementes embebidas em escuro e submetidas a um pulso de luz vermelha, induzindo-se a germinação. B. Sementes submetidas a um pulso de luz vermelha extrema nas primeiras horas de embebição, inibindo-se a germinação. C. Sementes submetidas a um pulso de vermelho-extremo após 48 h de embebição, com promoção da germinação. Adaptada de DeWitt et al. (2016).

dependente unicamente do fitocromo A é do tipo “explosiva”, ou seja, o embrião transpassa a testa sem que ela sofra ruptura prévia, já que no endosperma ainda predomina a inativação dependente do VE. O mecanismo que leva ao enfraquecimento – dependente do tempo de embebição – da resposta do embrião ao ABA do endosperma é ainda desconhecido, mas observa-se que a expressão dos fatores NCED6/9 e ABI3/5, relacionados com a biossíntese de ABA, diminui com o tempo de embebição após o primeiro pulso de VE.

A percepção da luz pela semente é, portanto, determinada pela dinâmica do fitocromo que, por sua vez, é influenciada pela intensidade e qualidade da luz. Diversos componentes do meio e da própria semente “filtram” a luz que atinge o embrião, alterando a irradiância e a proporção dos comprimentos de onda percebidos pelo fitocromo, conforme ilustrado na Figura 20.13. Como exemplo, na faixa de 400 a 800 nm, a luz que alcança a profundidade de 3 mm em um substrato de areia úmida é mais rica em comprimentos de onda longos que curtos, ou seja, contém mais vermelho-extremo que vermelho. A mesma tendência é observada em tegumentos de algumas sementes, como maxixe (*Cucumis anguria*). Mesmo a serapilheira (camada superficial de material orgânico em decomposição, especialmente vegetal, em solos de florestas) pode modificar a proporção de vermelho e vermelho-extremo, além, é claro, de reduzir a irradiância sobre o solo.

Em resumo, quando a resposta é mediada pelo fitocromo B, a luz branca ou vermelha inibe a síntese de ABA no endosperma, enquanto vermelho-extremo e escuro a promovem. Contudo, quando a ação é mediada pelo fitocromo A, tanto o vermelho quanto o vermelho-extremo inibem a síntese de

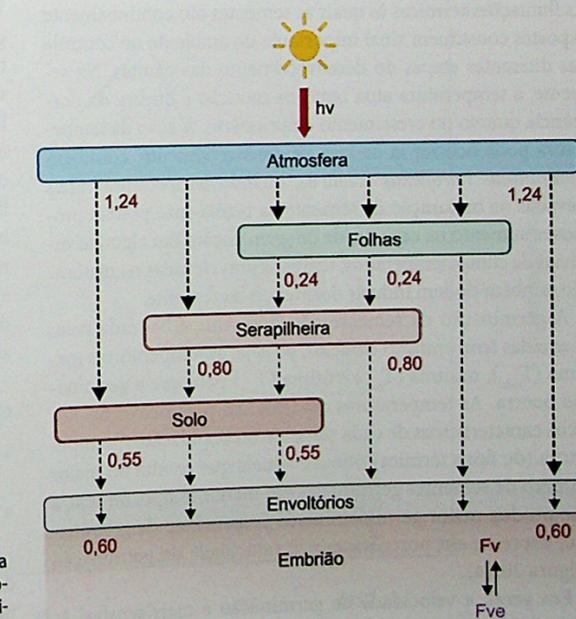


Figura 20.13 Esquema simplificado dos principais “filtros” naturais da luz que atinge o embrião. Os números representam valores da razão V:VE antes e após alguns filtros, e a espessura das setas indica a irradiância relativa.

ABA e estimulam a de AG no embrião, promovendo a germinação. De acordo com o modelo proposto – com base em estudos realizados com *Arabidopsis* –, o fitocromo ativado pela luz vermelha (Fve) penetra no núcleo e inibe o fator PIL5, que regula negativamente a germinação por meio de uma via que envolve também a participação dos fatores SOM (*somnus*) e ABI3/4/5 (*abscisic acid insensitive 3/4/5*), além de proteínas participantes da cadeia sinalizadora do ABA expressas no embrião e no endosperma micropilar. No escuro, PIL5 estimula a expressão do repressor DELLA e, indiretamente, aumenta a expressão de *GA2ox* (que inativa AG) e de genes da biossíntese de ABA. Assim, a participação da luz por meio de PIL5 e SOM assegura que a síntese de AG seja suficientemente alta para reverter o bloqueio à germinação imposto pelas proteínas DELLA (p. ex., GAI, RGL2 e RGA). O vermelho-extremo inibe a germinação por meio do estímulo, via DELLA e NCED1, da biossíntese de ABA e do fator de resposta ao ABA, ABI3. No escuro, o fitocromo B permanece na forma inativa (Fv) no citosol, de modo que o ABA endospermico (estimulado por PIL5) se opõe à sinalização pelo phyA por intermédio do fator de transcrição ABI5 que, com o PIL5, atua sobre vários genes do embrião que regulam negativamente a germinação (ver Figuras 20.11 e 20.12).

A luz azul é absorvida principalmente por *criptocromo* (CRY1) e fototropinas (PHOT). CRY1 reprime o fator ABA8'OH-1, que regula negativamente a síntese de ABA, e estimula NCED1, participante da via biossintética desse hormônio, causando assim o bloqueio da germinação dependente do ABA.

Temperatura

As flutuações térmicas às quais as sementes são continuamente expostas constituem sinal importante do ambiente no controle das diferentes etapas do desenvolvimento das plantas. Na semente, a temperatura atua tanto na indução e quebra da dormência quanto no crescimento embrionário. A ação da temperatura pode ocorrer já na fase de desenvolvimento, como em *Amaranthus retroflexus* (caruru), quando temperaturas mais elevadas na maturação da semente na planta-mãe podem promover aumento na capacidade de germinação. Em algumas espécies de climas temperados, temperaturas elevadas na maturação também podem induzir dormência na semente.

A germinação da semente não dormente é balizada pelas chamadas *temperaturas cardeais*, ou seja, as temperaturas máxima (T_{max}), mínima (T_{min}) e ótima (T_{opt}) para que a germinação ocorra. As temperaturas cardeais são parâmetros fisiológicos característicos de cada semente ou população. A temperatura (ou faixa térmica) ótima é aquela que resulta no maior número de sementes germinadas em menor tempo, ou seja, a que produz maior germinabilidade (capacidade de germinação, expressa em porcentagem) e velocidade de germinação (Figura 20.14).

Em geral, a velocidade de germinação é mais sensível às variações de temperatura que a germinabilidade, sendo assim usada para a definição do intervalo infraótimo entre T_{min} e T_{opt} , no qual a velocidade aumenta com a temperatura, e do intervalo supraótimo entre T_{opt} e T_{max} , no qual a velocidade diminui

(Figura 20.14). Em estudos sobre a dependência térmica da germinação, também são consideradas as temperaturas mínima (T_b) e máxima (T_c) teóricas de germinação, cujos valores são estimados a partir de técnicas estatísticas. Em geral, usa-se o ajuste linear que melhor descreve a relação entre velocidade de germinação ($1/t$, sendo t o tempo necessário para a germinação) e temperatura, tanto nos intervalos infra quanto supraótimo. A partir das equações geradas por tais ajustes, pode-se estimar T_b e T_c , de modo que, para fins práticos, T_b (temperatura mínima teórica) pode ser considerada equivalente a T_{min} (temperatura mínima experimental de germinação), assim como T_c pode ser equivalente a T_{max} (Figura 20.14). Os parâmetros T_b e T_c são utilizados em modelos que descrevem a resposta da semente em relação à temperatura, os quais buscam prever o comportamento germinativo de espécies e/ou lotes de sementes em diferentes cenários de temperatura ambiental. Por exemplo, a diferença entre T_b e a temperatura real de germinação (T) permite a determinação do chamado “tempo térmico” de germinação (θ_G , medido em graus.dia ou graus.hora). A partir dos parâmetros T_b e θ_G , pode-se então estimar o tempo real de germinação (t_G) em uma temperatura infraótima qualquer (T), de acordo com a expressão:

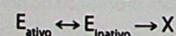
$$\theta_G = (T - T_b)t_G \Rightarrow t_G = \theta_G / (T - T_b)$$

Mais que simples ferramentas estatísticas, T_c e θ_G também podem refletir características fisiológicas individuais da semente, já que esses parâmetros variam dentro das sementes de uma população. Assim, T_b e T_c podem variar conforme a capacidade de germinação e/ou grau de dormência da semente, ou seja, o estado fisiológico da semente determinará o tamanho (amplitude) da “janela térmica” (diferença entre T_b e T_c de germinação de determinada população). Os histogramas pequenos no alto da Figura 20.14 mostram como as temperaturas mínima, ótima e máxima de germinação podem variar entre as espécies, exemplificadas por culturas agrícolas e árvores. Em geral, sob condições naturais, a semente está exposta a um ambiente no qual a temperatura exibe variação cíclica. Essa flutuação tem sido considerada, assim como a luz, importante fator ecológico para a percepção do microambiente pela semente. A amplitude térmica (diferença entre as temperaturas máxima e mínima), por exemplo, pode sinalizar à semente enterrada a distância dela em relação à superfície do solo, já que a amplitude térmica tende a diminuir com o aumento da profundidade.

Na germinação de sementes, os efeitos da temperatura estão relacionados principalmente com dois processos:

- Transconformação de macromoléculas, especialmente proteínas
- Regulação da expressão gênica.

A transconformação – mudança na configuração espacial da estrutura molecular – pode significar, em se tratando de uma enzima, uma alteração em sua capacidade de catálise e, portanto, na velocidade das reações químicas na célula. O modo como as enzimas respondem à temperatura pode ser quantitativamente descrito pela equação:



Em que:

- E_{ativo} = forma ativa da enzima
- $E_{inativa}$ = forma inativa da enzima
- X = estado totalmente desnaturado da enzima.

A transição entre E_{ativo} e $E_{inativo}$ apresenta energia de ativação (E_a = barreira energética a ser transposta para que a reação ocorra) menor que a transição $E_{inativo} \rightarrow X$, é termodependente e apresenta uma constante de equilíbrio (K_{eq}) determinada por mudanças no sítio ativo da enzima. Isso significa que a relação entre velocidade de germinação e temperatura pode ser explicada em termos da distribuição das formas ativa e inativa, bem como das taxas de desnaturação (transição $E_{inativo} \rightarrow X$), das enzimas envolvidas no processo global de germinação. Na faixa térmica infraótima – na qual a velocidade (V) aumenta com a temperatura (T) –, a elevação de T favorece o estado ativo de enzimas envolvidas em processos parciais promotores da germinação. No intervalo supraótimo, o aumento de T favorece a

desnaturação enzimática e, ao mesmo tempo, promove processos parciais antagonísticos à germinação, diminuindo V .

Mais que a natureza física dos efeitos da temperatura, busca-se atualmente compreender os mecanismos moleculares e fisiológicos associados à tolerância das sementes ao estresse térmico, visando-se a entender não só a distribuição das espécies no ambiente natural, mas também a criar variedades mais resistentes em um cenário de grandes mudanças climáticas. Flutuações térmicas acentuadas (temperaturas baixas ou altas) podem ativar ou reprimir genes específicos, alterando o programa morfogênico da semente. Assim, por exemplo, temperaturas altas ou baixas podem levar à expressão de proteínas específicas (HSP) provavelmente relacionadas com mecanismos de proteção da célula em condições térmicas desfavoráveis que envolvem, por exemplo, a estabilização da estrutura tridimensional de proteínas. No caso de arroz (*Oryza sativa*), além das HSP, genes relacionados com a produção de antioxidantes e proteínas LEA são expressos diferencialmente em plântulas mantidas em temperaturas elevadas. Em alface,

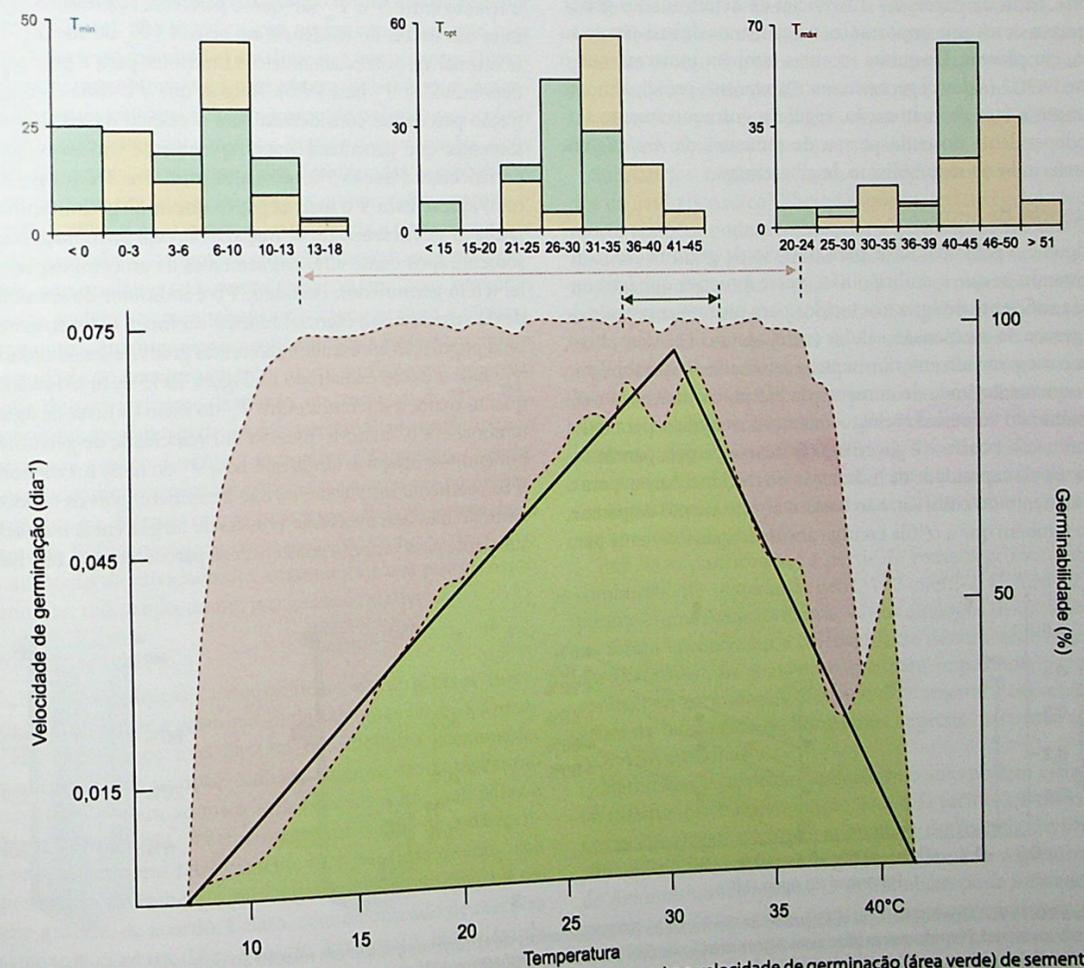


Figura 20.14 Efeitos da temperatura sobre a capacidade de germinação (área marrom) e a velocidade de germinação (área verde) de sementes de *Dolichos biflorus*. A relação entre velocidade e temperatura é descrita por retas, com as respectivas equações (Labouriau, 1983). Os histogramas no alto da figura mostram as frequências de distribuição das temperaturas cardeais (T_{min} , T_{opt} e T_{max}) em levantamentos feitos com sementes de espécies arbóreas (barras verdes) e culturas agrícolas (barras laranjas). Fonte: Durr et al. (2015).

o efeito inibitório de altas temperaturas (aprox. 35°C) sobre a germinação é mediado por complexas alterações no metabolismo e na sinalização hormonal. Observou-se, por exemplo, o aumento na expressão do gene *LsNCED4* (que codifica uma 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase envolvida na biossíntese de ABA) em genótipos mais sensíveis à temperatura alta, sugerindo que a expressão desse gene determine o limite térmico superior (T_{max}) da germinação de alface. Além disso, a expressão de *LsGA30x* (gene envolvido na produção de giberelinas ativas) é inibida em sementes termossensíveis e promovida em genótipos termotolerantes embebidos a 35°C, indicando a participação da giberelina. A expressão diferencial do gene *ERF1* (*ethylene response factor 1*) em linhagens termotolerantes de *Arabidopsis* tratadas em temperaturas elevadas (30°C) sugere que esse fator da via de transdução de sinais do etileno também aumente o limite térmico superior (T_{max}), estimulando a biossíntese de giberelinas, as quais antagonizam o efeito inibitório do ABA sobre a germinação. Quanto ao estresse provocado por temperaturas baixas, a presença de ácidos graxos insaturados e o aumento de atividade antioxidante, além da expressão diferencial de determinados genes, parecem constituir importantes mecanismos de resistência ao frio, em plantas. Pesquisas recentes também mostram que o gene *DOG1* (*delay of germination 1*), expresso principalmente durante a fase de maturação, regula o enfraquecimento termodependente do endosperma de sementes de *Arabidopsis*, interferindo no metabolismo de giberelinas.

Potencial da água

A água é o principal fator para o início da germinação, considerando-se que o embrião não cresce a menos que haja entrada suficiente de água nos tecidos para promover pressão de turgescência à expansão celular (ver Capítulo 1). Além disso, como mencionado anteriormente, a retomada do metabolismo na semente depende do aumento da hidratação dos tecidos. O aumento do volume da célula – condição necessária para que a germinação ocorra – é governado basicamente pela parede celular e pela capacidade de hidratação dos tecidos. Assim, para o crescimento do embrião, não basta o afrouxamento da parede, mas também que a célula consiga absorver água suficiente para

que a turgescência gerada pela embebição supere a resistência da parede e aconteça o alongamento celular.

A dependência da germinação em relação ao potencial da água (Ψ_w) é similar ao efeito da redução da temperatura na faixa infraótima. A embebição depende da diferença entre o Ψ_w do meio e o Ψ_w da semente, ou seja, quanto mais negativo o Ψ_w da semente em relação ao Ψ_w do meio, maior será a embebição. Portanto, assim como a temperatura, a diminuição do Ψ_w no meio provoca redução na velocidade de germinação ou mesmo na germinabilidade. A Figura 20.15 ilustra a relação entre velocidade de germinação (V) de sementes de *Eucalyptus grandis* (eucalipto) e o potencial de água. A velocidade é definida como o inverso do tempo (t) necessário para a germinação de determinado número de sementes, expresso em porcentagem. No exemplo, são mostrados os valores de V correspondentes às porcentagens de 5, 10, 20, 40, 60 e 80%. Observa-se que V diminui conforme o Ψ_w se torna mais negativo (círculos, na Figura 20.15 A), sendo as taxas de redução – determinadas a partir da inclinação das linhas de tendência – praticamente idênticas para as diferentes frações percentuais, ou seja, as retas que descrevem a relação entre V e Ψ_w são quase paralelas. A projeção de cada uma das linhas de tendência no eixo X (Ψ_w do meio) permite estimar os potenciais hídricos limítrofes para a germinação, denominados Ψ_w base (Ψ_b). Nota-se que Ψ_b varia conforme a fração percentual considerada para o cálculo da velocidade; as sementes que germinam mais rapidamente (no caso, aquelas pertencentes à fração 5%, ou seja, as primeiras 5% que germinaram) apresentam Ψ_b mais negativo que as de germinação mais tardia (p. ex., as sementes de fração 60%, cuja germinação ocorre somente após quase 60% das sementes da amostra experimental terem germinado). Portanto, Ψ_b é indicador da sensibilidade da semente ao potencial hídrico do meio, e as sementes de uma população apresentam diferentes graus de sensibilidade ao Ψ_w . Esse aspecto é ilustrado na Figura 20.15 B, mostrando que, quanto maior a diferença entre Ψ_w do meio (o nível de água no tanque) e Ψ_b , maior a “pressão” ou velocidade de germinação, podendo-se observar ainda que, se o Ψ_w do meio for menor que Ψ_b , a semente simplesmente não germinará, pois os tecidos do embrião não desenvolverão pressão de turgescência intracelular suficiente para vencer a resistência da parede, ou seja, não haverá

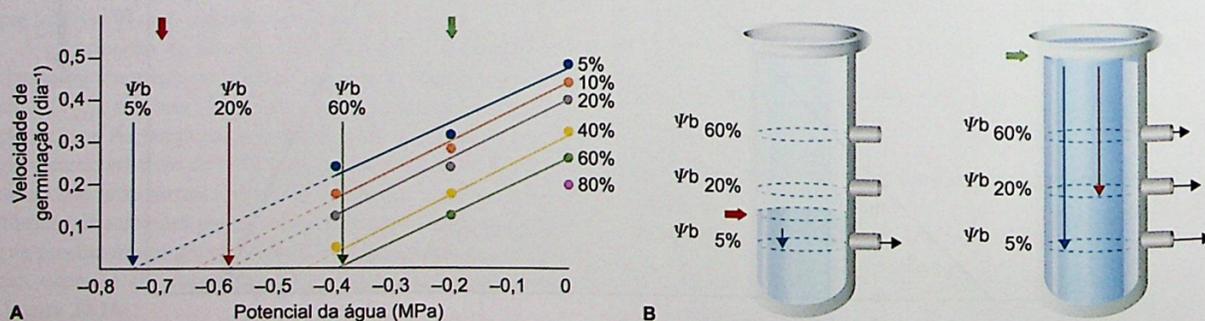


Figura 20.15 A. Dependência da velocidade de germinação (V) de sementes de *Eucalyptus grandis* em relação ao potencial de água. V calculada como o inverso do tempo necessário para a germinação de 5%, 10%, 20%, 40%, 60% e 80% das sementes. A título de ilustração, são apresentados os potenciais hídricos mínimos teóricos (Ψ_b) de germinação para as porcentagens 5, 20 e 60. B. Analogia hidráulica simulando o efeito dos potenciais hídricos mínimos teóricos (Ψ_b) de germinação para as porcentagens 5, 20 e 60. Quanto maior a diferença entre os níveis de água no tanque (Ψ_w do meio) e os canos de saída (os Ψ_b 5%, 20% e 60%), maior a intensidade ou pressão do fluxo de água (o que corresponderia à velocidade de germinação). Quando o nível de água é menor que Ψ_b , não há germinação. Adaptada de Bradford (2002).

crescimento. Por sua vez, quanto mais o Ψ_w do meio exceder o Ψ_b , mais rápida tenderá a ser a germinação.

Mais que indicar a sensibilidade da semente ao estresse hídrico, o parâmetro Ψ_b reflete a heterogeneidade fisiológica na população, bem como a capacidade de resposta de cada semente a fatores do ambiente físico. Assim, por exemplo, Ψ_b pode variar conforme a temperatura (tanto na maturação quanto na pós-dispersão e/ou germinação) e o grau de dormência. Nesse último caso, a redução da dormência está associada à diminuição de Ψ_b , ou seja, quanto menor o grau de dormência, menores (mais negativos) os valores de Ψ_b . Além disso, demonstrou-se também que Ψ_b se correlaciona com a variação das temperaturas limítrofes superiores (T_{max}) de germinação, sugerindo que a resposta da semente aos estresses hídrico e térmico envolve vias comuns de sinalização. Portanto, são múltiplos os determinantes fisiológicos do Ψ_b na semente, podendo-se destacar aqueles que influenciam a resistência dos envoltórios ao crescimento do embrião e o potencial de crescimento deste, como a atividade de hidrolases da parede celular.

O fato de o Ψ_w do meio estar abaixo do Ψ_b , ainda que impeça a conclusão do processo germinativo (protrusão da radícula através da testa), não significa que, nessas condições, não haja algum progresso metabólico em direção à germinação. Osmocondicionamento (*priming*) consiste em embeber previamente as sementes em uma solução (como de polietilenoglicol ou manitol) cujo potencial osmótico impeça a germinação. Após esse tratamento, as sementes são desidratadas e embebidas novamente em um potencial de água que permita a germinação ($\Psi_w > \Psi_b$), a qual ocorrerá mais rápida e uniformemente em comparação a sementes colocadas diretamente para germinar, sem qualquer tratamento prévio. Além disso, sementes tratadas podem ser menos sensíveis à temperatura e hipoxia. Por sua vez, sementes osmocondicionadas apresentam menor longevidade no armazenamento, o que representa o principal desafio desse tratamento. Portanto, mesmo quando $\Psi_w < \Psi_b$, as sementes são capazes de iniciar o metabolismo germinativo e reter esse avanço durante a secagem e reidratação. O efeito do osmocondicionamento é associado a alterações na expressão gênica e a diversos outros processos celulares, entre eles a síntese de RNA e proteínas, o aumento da produção de etileno e o aumento da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, reduzindo, assim, processos oxidativos.

Fatores químicos

Substâncias orgânicas (aleloquímicas) e inorgânicas (íons) podem influenciar a germinação de sementes no solo. Quando em excesso, os íons alteram ou inibem a germinação. Por exemplo, em soluções salinas, algumas sementes (como o rabanete) podem adquirir sensibilidade à luz, que passa a inibir a germinação. Normalmente, pelo fato de as sementes se apresentarem relativamente bem supridas de íons, sua dependência de minerais para a germinação não chega a ser muito grande, de acordo, é claro, com o conteúdo de reservas na semente madura. Uma exceção é o nitrato, que, além de largamente usado como promotor da germinação em inúmeras espécies, parece atuar, em conjunto com a luz e a temperatura, como sinal do ambiente. Além disso, com a temperatura, a sinalização pelo nitrato na planta-mãe durante a fase

desenvolvimento pode influenciar o desempenho germinativo da semente madura. Assim, a adição de nutrientes minerais (particularmente o nitrogênio) à planta-mãe pode resultar em uma progênie com menor grau de dormência. O nitrato indica a presença de clareiras em uma floresta, já que, nesses microambientes, a disponibilidade do íon tende a ser maior em virtude da menor absorção por sistemas radiculares. O nitrato não só promove a germinação propriamente dita, como também pode interromper a dormência, como observado em sementes de *Brachiaria brizantha* – gramínea de origem africana extensivamente usada como forrageira no Brasil – e de *Panicum maximum* (capim-colômbio). Em geral, a resposta da semente ao nitrato depende da luz e/ou da temperatura, sendo comum em sementes fotossensíveis de *Plantago lanceolata* e *Sinapis arvensis* (mostarda) a substituição da necessidade de luz pelo íon, enquanto em *Sisymbrium officinale* os efeitos da luz e do nitrato são sinérgicos. O aumento da sensibilidade das sementes ao fitocromo Fve pelo nitrato se dá por meio de um receptor proteico na membrana que aumenta a afinidade dessa proteína pelo fitocromo. A ligação receptor-fitocromo, por sua vez, desencadeará uma série de reações em cascata, levando ao crescimento do embrião. Em sementes de *Arabidopsis*, o nitrato promove a germinação e reduz a dormência, acelerando o decréscimo de ABA via indução do gene *CYP707A2*, relacionado com o catabolismo desse hormônio, e inibição de *NCED* (envolvido na biossíntese de ABA).

Substâncias orgânicas (como fenilpropanoides e derivados do ácido benzoico) liberadas por material vegetal vivo ou morto também podem influenciar a germinação no ambiente natural. A maior parte dessas substâncias (coletivamente denominadas alelopáticas) atua inibindo a germinação, embora outras possam promovê-la, como o *estrigol*, substância encontrada no exsudato de raízes de *Sorghum bicolor* e que induz a germinação de uma angiosperma parasita, *Striga asiatica*. São inúmeras as espécies que produzem substâncias potencialmente alelopáticas, como *Sorghum halepense* (capim-massambará), *Cyperus rotundus* (tiririca), *Brachiaria decumbens* e *Ocotea odorifera* (canela-sassafrás), entretanto ainda são poucas as evidências que demonstrem seu efeito sobre a germinação em condições naturais.

Em 2004, purificou-se, a partir da fumaça proveniente da combustão de material vegetal, o 3-metil-2 H-furo [2,3-c] pirano-2-um. Posteriormente, vários análogos dessa substância foram encontrados e coletivamente denominados carricinas (*karrikins*), os quais desempenham importante papel no controle da germinação, afetando diretamente a expressão de genes da biossíntese de hormônios vegetais, particularmente AG, ABA e auxinas.

Herbicidas e pesticidas aplicados ao solo podem estimular ou mesmo inibir a germinação. O 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), por exemplo, aumenta a dormência de *Chenopodium album*, enquanto o glifosato estimula a germinação de *Amaranthus retroflexus*. O pH também pode influenciar a germinação de sementes, principalmente em ensaios de laboratório, nos quais se recomenda o uso de pH na faixa de 6,0 a 7,5 – o que pode ser obtido por uso de tampões.

Relativamente poucos estudos tratam do efeito de atmosferas enriquecidas com CO₂ durante o desenvolvimento da

semente na planta-mãe, sobre o comportamento da progênie. Os dados disponíveis mostram que o aumento das concentrações de CO_2 afetam a germinação, embora esse efeito seja altamente espécie-específico. De modo geral, a germinação e a massa da semente respondem positivamente a atmosferas enriquecidas com CO_2 durante o desenvolvimento, indicando que um eventual efeito do CO_2 sobre a capacidade germinativa está associado ao aumento da massa da semente.

Fatores bióticos

No ambiente natural, as sementes sofrem a influência de outras plantas e animais, que interagem continuamente com os fatores físicos, modificando o microambiente em torno da semente. Como exemplos dessas ações, podem ser destacadas:

- Depleção de água e íons da rizosfera, pela ação do sistema radicial
- Liberação de substâncias voláteis (como o octiltiocianato) por fungos presentes no solo, que estimulam a germinação
- Ação de larvas de insetos que penetram na semente, podendo causar danos ao tegumento e/ou ao embrião, neste último caso inviabilizando a semente
- Deslocamento de frutos e sementes – como a mamona e a copaíba (*Copaifera langsdorffii*) – por formigas, que, ao transportarem o material vegetal para seus ninhos, podem levar a semente a microambientes mais propícios à sua germinação e/ou conservação
- Remoção do arilo (excrecência que se forma sobre a superfície do tegumento de algumas sementes) por formigas, por exemplo, promove a germinação de sementes, como em *Calathea* sp. (Marantaceae)
- Microrganismos do solo, como *Azotobacter chroococcum*, que inibem ou reduzem a germinação.

Interações entre sementes e fatores bióticos podem ser bastante complexas, como no caso de orquídeas e micorrizas. Nesse caso, a semente não apresenta praticamente nenhuma substância de reserva, e sua germinação depende da associação da semente com o fungo micorrízico. Tendo penetrado na semente ou no protocormo, o fungo absorve matéria orgânica (como a celulose) do meio externo, transformando-a em açúcares simples, os quais são transportados para o interior das células do embrião por meio das hifas da micorriza. Ao digerir enzimaticamente as hifas, o embrião da orquídea obtém os produtos que serão utilizados na sua germinação e crescimento, ao passo que o fungo vai invadindo novas células de seu hospedeiro.

Pode-se também considerar uma influência biótica o efeito, sobre a germinação, do posicionamento da semente no órgão ou em diferentes partes da planta-mãe, particularmente em relação à maior ou menor distância da fonte de nutrientes, o que afetaria a disponibilidade de energia para o embrião. Em *Bidens pilosa* (picão-preto), por exemplo, a disposição do aquênio no capítulo produz dimorfismo morfológico (os aquênios centrais são maiores que os periféricos) e fisiológico no fruto, enquanto em *Commelina virginica* (trapoeraba) o comportamento germinativo de sementes de flores casmogâmicas aéreas difere daquele de sementes de flores cleistogâmicas subterráneas. O heteromorfismo (literalmente, variação da forma) das sementes resulta do fato de que seu desenvolvimento é

afetado por fatores genéticos, fisiológicos e ambientais, não se processando de maneira uniforme dentro de uma população, ainda que as plantas cresçam no mesmo ambiente.

Quanto ao tamanho, em muitos casos são descritas correlações positivas entre a massa da semente e a capacidade de germinação, vigor e/ou sobrevivência das plântulas, mas isso está longe de constituir regra geral. Há espécies, como *Hyptis suaveolens*, nas quais sementes grandes apresentam germinabilidade mais elevada que sementes pequenas; espécies cuja germinação de sementes pequenas tende a ser maior (p. ex., *Rumex crispus*); e espécies cuja capacidade de germinação é independente do tamanho da semente (como o milho). Em sementes grandes de algumas espécies, um alto investimento metabólico na produção de envoltórios faz com que o desenvolvimento posterior da plântula ocorra em taxas menores, produzindo correlação negativa entre massa da semente e taxa de crescimento relativo.

Viabilidade

A capacidade de a semente reter seu potencial germinativo é denominada *viabilidade*, enquanto *longevidade* refere-se ao tempo durante o qual a viabilidade é mantida. Em termos ecológicos, a viabilidade tem papel extremamente importante em espécies colonizadoras ou pioneiras, dispersas em ambientes sujeitos a amplas oscilações em termos de umidade e temperatura. Associada a outros mecanismos, como a dormência, a viabilidade pode garantir o potencial germinativo (e, portanto, a sobrevivência da progênie) ao longo do tempo.

Condições ambientais durante o desenvolvimento da planta-mãe podem influenciar a longevidade da semente, mostrando que essa característica exibe alta plasticidade. Em um experimento (LePrince *et al.*, 2016), plantas parentais de *Plantago cunninghamii* cresceram em condições subótimas (frio-seco ou quente-úmido) e foram, então, transferidas para ambiente ótimo. Quando a transferência das plantas é feita após a floração, as previamente mantidas em ambiente quente-úmido produzem sementes com longevidade duas vezes menor em comparação àquelas mantidas em ambiente frio e seco. A longevidade também pode se correlacionar negativamente com o nível de dormência, como em *Arabidopsis*, ou com a presença de endosperma; nesse caso, sementes endospermicas (p. ex., milho) são menos longevas que as não endospermicas (p. ex., feijão). Outra questão refere-se à maquinaria molecular que transmite estímulos recebidos pela planta-mãe à progênie, regulando a expressão gênica e vias bioquímicas relacionadas com a longevidade de sementes secas. Um forte candidato a esse papel, em *Arabidopsis*, é o gene *DOG1* (*delay of germination 1*), que converte o sinal térmico durante a maturação da semente na planta-mãe em quantidade de proteína DOG1 na semente recém-amadurecida. Mutantes *dog1-1* exibem baixa longevidade e baixa expressão dos genes para as proteínas LEA e HSP.

Enquanto sementes de algumas espécies sofrem acentuada desidratação e adquirem tolerância ao dessecação na fase de maturação, outras não apresentam tais características (ou as apresentam em grau bem menor), sendo dispersas com conteúdos de água relativamente elevados. As primeiras são conhecidas como *ortodoxas*, por se comportarem de modo relativamente previsível durante o armazenamento, apresentando

maior longevidade quando armazenadas em ambientes com umidade e temperatura baixas. Seu período de viabilidade em condições controladas pode ser previsto, com maior ou menor precisão, de acordo com modelos matemáticos baseados em alguns poucos parâmetros característicos da espécie ou no lote de sementes. Incluem-se nesse grupo as sementes das principais culturas destinadas à produção de grãos, e sementes de espécies pioneiras em geral. Por sua vez, sementes que não passam pela fase de desidratação rápida durante o desenvolvimento são classificadas como *recalcitrantes*, por apresentarem comportamento imprevisível durante o armazenamento. São sensíveis à dessecação e conservam o metabolismo ativo após a dispersão e durante o armazenamento, diferentemente das sementes ortodoxas. Assim, enquanto sementes ortodoxas têm a longevidade prolongada com níveis de Ψ_w interno da ordem de -350 MPa, sementes recalcitrantes deixam de ser viáveis com Ψ_w na faixa de $-1,5$ a $-5,0$ MPa. De modo geral, sementes recalcitrantes mantêm níveis elevados de hidratação e atividade metabólica durante toda a fase de maturação e, após a dispersão, parecem comutar precocemente seu metabolismo para o “modo” germinação. Essa mobilização precoce de metabólitos e a ativação da maquinaria metabólica devem provocar uma demanda crescente por água, levando eventualmente o embrião à condição de estresse hídrico.

O padrão recalcitrante é relativamente comum em espécies não pioneiras de florestas tropicais. Tem-se observado também que espécies recalcitrantes parecem investir mais no acúmulo de energia potencial (reservas) que nos envoltórios, de modo a produzir sementes de maior tamanho e tegumentos permeáveis à água. Entre os métodos pesquisados visando à conservação *ex situ* de sementes recalcitrantes, estão a cultura de embriões *in vitro* e a criopreservação (p. ex., armazenamento em nitrogênio líquido). Nem todas as espécies são tipicamente recalcitrantes ou ortodoxas, verificando-se a existência de comportamentos intermediários, com variados graus de sensibilidade ao dessecação, resposta à armazenagem “úmida” e tolerância ao resfriamento. Existem, por exemplo, sementes que toleram desidratação (-90 a -250 nMPa), mas se tornam sensíveis ao frio nessas condições.

Entre os fatores que contribuem para a redução da longevidade de uma semente, incluem-se: aumento na peroxidação de lipídios (oxidação de ácidos graxos pela enzima peroxidase, às custas de peróxido de hidrogênio) e acúmulo de radicais livres, como O^- e OH^- ; deterioração da membrana e redução na atividade de enzimas responsáveis pela detoxificação. Em sementes como girassol e arroz, por exemplo, observa-se redução na atividade da enzima transferase da glutatona, que cataliza a conjugação da glutatona com inúmeros substratos citotóxicos, como os produtos de processos oxidativos causados por radicais hidroxílicos. Um exemplo desses produtos são os peróxidos de lipídios de membranas.

Dormência

Uma semente não dormente é aquela capaz de germinar na maior amplitude possível de fatores do ambiente físico, considerando-se os limites impostos pelo seu genótipo. Algumas sementes, porém, não germinam mesmo quando colocadas em

meio com disponibilidade de água, temperatura adequada e condições atmosféricas normais, sendo chamadas de sementes *dormentes*. Uma definição proposta por Baskin e Baskin (2004) considera dormente a semente incapaz de germinar em determinado intervalo de tempo, quando exposta a condições ambientais que normalmente permitiriam a germinação se essa semente não estivesse dormente. Uma definição bastante abrangente de dormência foi proposta por Labouriau (1983), segundo a qual se trata de uma alteração restritiva das condições exigidas para a germinação, induzida na semente após exposição a determinadas condições ambientais durante a maturação ou após a dispersão, alteração esta que só pode ser removida por tratamentos específicos, chamados de pós-maturação ou quebra de dormência, também de caráter indutivo. Em suma, dormência poderia ser definida como uma característica da semente que determina as condições requeridas para a germinação.

Portanto, a diferença básica entre semente dormente e não dormente é que na primeira existe algum tipo de bloqueio interno à germinação que limita a capacidade da semente em responder com plena potencialidade às condições ambientais, enquanto na segunda a germinação é limitada pela ausência ou insuficiência de um ou mais fatores externos necessários para que esse processo ocorra.

Um modelo das relações entre indução e quebra de dormência fisiológica (ver adiante), baseado em estudos realizados com *Arabidopsis*, é apresentado na Figura 20.16. A indução da dormência ocorre durante a maturação da semente, quando é influenciada pelos fatores ambientais experimentados pela planta-mãe (principalmente luz, temperatura e nitro). A dormência é basicamente um mecanismo repressivo, impedindo não apenas a germinação precoce (antes da dispersão), mas também evitando que sementes dispersas germinem rápido demais no ambiente natural. Essa maior distribuição dos tempos de germinação tem sentido ecológico, não apenas evitando eventual competição dentro da progênie, mas também reduzindo a mortalidade das plântulas causada por flutuações ambientais (estiagens ou mudanças de temperatura), considerando-se que a plântula é muito mais sensível a estresses que a semente. Como mencionado anteriormente, a indução da dormência tem a participação do ácido abscísico (ABA) e de genes específicos, como *DOG1* e *ABI3*, este último pertencente à via de sinalização do ABA. A expressão desses genes é controlada por mecanismos *epigenéticos*, que envolvem remodelagem da cromatina por meio de mecanismos como a *metilação* de histonas (proteínas associadas ao DNA) e do próprio DNA. Os efeitos inibitórios da metilação resultam da ligação de grupos metila (CH_3) ao material genético. A Figura 20.16 ilustra o caso de uma semente colhida ou dispersa com nível relativamente alto de dormência, que diminui gradualmente durante o armazenamento a seco, em um processo conhecido como pós-maturação. Essa diminuição da dormência é acompanhada do aumento do intervalo térmico dentro do qual a germinação é permitida (ou seja, aumento do intervalo entre T_{\min} e T_{\max}), bem como de maior capacidade de resposta da semente ao potencial hídrico do meio (Ψ_b se torna mais negativo).

Água e temperatura são fatores críticos que determinam a natureza das reações que ocorrem durante a pós-maturação.

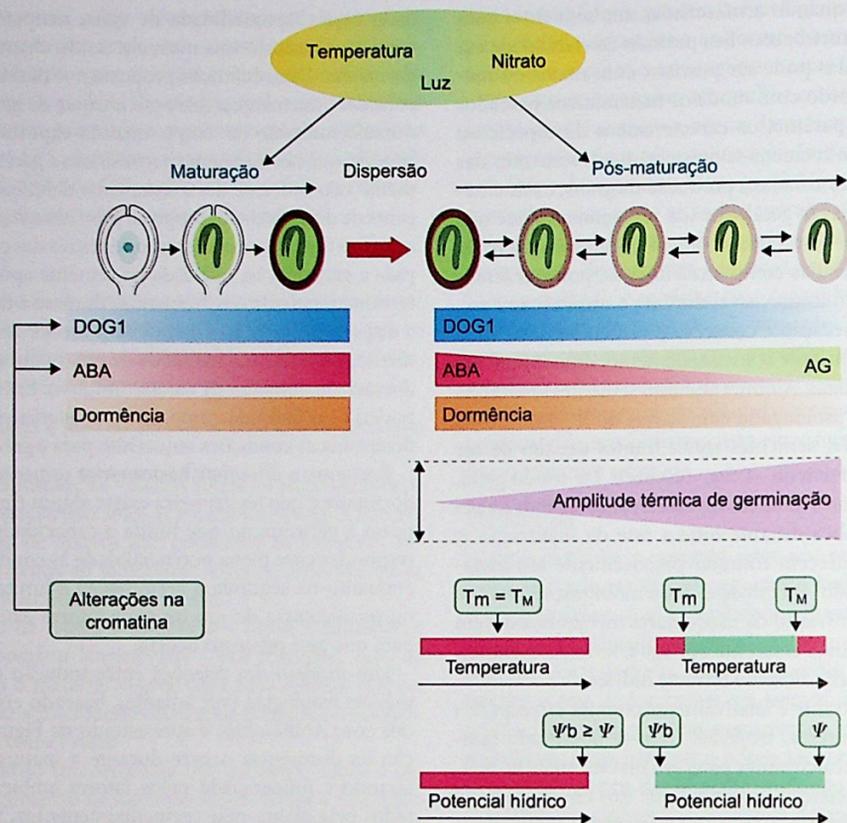


Figura 20.16 Modelo mostrando a variação do grau de dormência durante a maturação e a pós-maturação de sementes de *Arabidopsis*, em função da variação da sensibilidade à giberelina (GA) e ao ácido abscísico (ABA), da expressão da proteína DOG1. A intensidade de coloração e/ou altura das barras relaciona-se com a quantidade/intensidade do fator ou evento. Fatores ambientais, atuando por intermédio de alterações na expressão gênica e na síntese e/ou sensibilidade a hormônios, modificam parâmetros fisiológicos da semente, representados por Ψ_b (potencial hídrico mínimo de germinação), $T_{m\min}$ (temperatura mínima de germinação) e $T_{m\max}$ (temperatura máxima de germinação), alterando a capacidade de a semente responder à temperatura indicada pela amplitude (triângulo roxo) ou ao intervalo térmico (barras verdes) de germinação. Adaptada de Née *et al.* (2017).

Em sementes de *Arabidopsis*, por exemplo, as reações catalíticas só ocorrem a partir de 0,06 g H₂O por grama de matéria seca. Abaixo desse limiar (p. ex., armazenamento em laboratório), as reações são de natureza não enzimática (como processos oxidativos). Espécies reativas de oxigênio são produzidas durante o armazenamento a seco de sementes ortodoxas, causando reações oxidativas envolvendo moléculas de lipídios, proteínas e RNAm. Embora “passivas”, tais reações oxidativas parecem direcionadas a grupos específicos de macromoléculas relacionadas com o controle da dormência; essa oxidação seletiva de proteínas e RNA que ocorre durante o armazenamento surtirá efeito a partir do início da embebição, ativando ou mantendo reprimido o programa metabólico de germinação. Nas primeiras horas de embebição, observa-se, por exemplo, que a identidade das moléculas de RNAm que formam polissomos apresenta diferenças entre sementes dormentes e não dormentes. Além disso, proteínas sintetizadas nesse período estão relacionadas com a fase de maturação, sendo o programa germinativo propriamente dito ativado posteriormente, entre 8 e 24 h de embebição, sugerindo que, mesmo com o início da entrada de água na semente, ainda há tempo

de a semente “se arrepender” e manter-se no modo dormência. Decorridas as primeiras horas de embebição, a “opção” da semente por um ou outro programa de desenvolvimento (germinação ou dormência) desencadeará a tradução seletiva de RNAm, dando continuidade ao processo.

Condições ambientais específicas – como temperatura, luz e nitrato – podem induzir tanto o estabelecimento quanto a quebra (interrupção) da dormência, interferindo na expressão gênica e nas reações mediadas por hormônios vegetais. Enquanto o ABA é necessário para a indução da dormência durante a fase de maturação da semente, a giberelina é imprescindível para a inicialização do programa metabólico de germinação, sendo o balanço entre esses dois hormônios determinante da capacidade germinativa da semente. Assim, a pós-maturação é relacionada com a diminuição da sensibilidade ao ABA e com o aumento da sensibilidade ao AG, o que significa alterações nas vias de sinalização desses hormônios. No caso, um maior valor da relação AG:ABA favorecerá a cadeia de transdução de sinais disparada pela giberelina, causando ampliação da janela térmica e/ou redução do Ψ_b . Por sua vez, no caso da indução da dormência, um aumento da

síntese e na sensibilidade do tecido ao ABA, associado a uma maior degradação do AG, potencializaria as reações de transdução de sinais pelo ABA que elevariam os valores de Ψ_b e reduziriam a amplitude térmica de germinação, permitindo, desse modo, que a germinação ocorra apenas em condições ambientais muito restritas ou simplesmente impossibilitando a germinação em qualquer condição (ver Figura 20.16). A proteína DOG1, cuja quantidade se correlaciona com os níveis de dormência em sementes de *Arabidopsis*, deve perder sua atividade durante o armazenamento. A reestruturação da cromatina associada à ação de agentes modificadores que influenciam a acetilação, a metilação ou a ubiquitinação (ligação de molécula de ubiquitina) de histonas (proteínas associadas aos ácidos nucleicos, na cromatina) pode reprimir ou ativar a transcrição de genes relacionados com a dormência de sementes, como *DOG1*, sugerindo que a transcrição desses genes seja regulada por alterações na cromatina.

Diferentemente do armazenamento em laboratório, as sementes incorporadas ao chamado banco de sementes do solo (sementes dispersas no ambiente natural e que se acumulam no solo) sujeitam-se às variações de umidade no ambiente, alternando assim estados de maior ou menor hidratação. Portanto, nessas sementes ocorrem reações metabólicas, incluindo transcrição e tradução de RNAm, que não acontecem em sementes armazenadas a seco. A dormência e a expressão de genes relacionados com a dormência são altamente sensíveis ao ambiente, e alterações na percepção e capacidade de resposta a temperatura, luz e nitrato podem redundar em mudanças moleculares e fisiológicas (como sensibilidade a hormônios), as quais determinarão a capacidade germinativa da semente. Desse modo, a semente incorporada ao solo percebe, por exemplo, a variação térmica e ajusta seu nível de dormência, tornando-se mais ou menos apta a germinar em determinado intervalo térmico e/ou condição de luz. Em muitos casos, esse ajuste está relacionado com variações sazonais, ou seja, dependendo da estação do ano, a semente apresentará maior ou menor grau de dormência, respectivamente, no inverno e no verão. Na fase de dormência mais profunda, a semente mostra baixa sensibilidade a fatores ambientais, sendo incapaz de germinar. Na fase de menor dormência, a semente torna-se mais sensível a luz, temperatura e nitrato, podendo germinar se os níveis desses fatores forem favoráveis. Contudo, se as condições ambientais não forem favoráveis na fase de baixa dormência, então o programa de desenvolvimento volta ao modo “dormência profunda”, em um processo conhecido como *dormência cíclica* (Figura 20.17). Esse tipo de dormência induzido após a dispersão é denominado *dormência secundária*, em oposição à *dormência primária*, estabelecida ao final da maturação da semente.

A Figura 20.17 ilustra algumas variáveis relacionadas com a dormência cíclica em um banco de sementes de *Arabidopsis* no solo, em clima de região temperada. A dormência aumenta com o decréscimo da temperatura, coincidindo com o aumento dos níveis de ABA e a expressão de genes como *DOG1* e *ABI3* (regulador positivo da sinalização do ABA), e decresce na primavera/verão, quando as temperaturas ficam mais elevadas. Essa fase de dormência reduzida é acompanhada de decréscimo do ABA, aumento da síntese de AG (indicado pela



Figura 20.17 Padrões de variação sazonal da dormência, de variáveis fisiológicas e da expressão gênica em sementes de *Arabidopsis* no solo, em local de clima temperado. A espessura ou a intensidade de coloração das barras relacionam-se com a quantidade do fator. ABI3/4: reguladores positivos da via de sinalização do ABA; DELLA: regulador negativo da via de sinalização da giberelina; ABI2: regulador negativo da via de sinalização do ABA; CYP707A2: regulador positivo do catabolismo do ABA; GA3ox2: regulador positivo da síntese de giberelina ativa. Adaptada de Finch-Savage e Footitt (2017).

expressão de *GA3ox2*), maior sensibilidade ao nitrato e à luz, e expressão de genes relacionados com a repressão da via de sinalização (*ABI2*) e catabolismo (*CYP707A2*) do ABA. Por sua vez, no verão há também aumento da presença de DELLA (regulador negativo da via de sinalização de AG) e *ABI4* (regulador positivo do ABA). Assim, enquanto a dormência profunda (no inverno) é promovida pelo ABA, a dormência não profunda (primavera/verão) é determinada pela repressão da via de sinalização de AG, facilmente revertida por exposição à luz, por exemplo. Se nesse período em que a semente apresenta maior capacidade de germinação (germinabilidade) as condições ambientais forem insuficientes, a dormência residual (indicada pela expressão de *ABI4*) reverterá em dormência profunda, iniciando um novo ciclo.

Classificação da dormência

Além da classificação quanto à origem (primária ou secundária), a dormência pode ser dividida nas classes a seguir, com base nos mecanismos envolvidos.

Dormência fisiológica

Trata-se da modalidade mais estudada de dormência, graças, principalmente, à sua ocorrência em sementes da planta modelo *Arabidopsis thaliana*. É causada por mecanismos inibitórios envolvendo processos metabólicos e o controle do desenvolvimento na semente. Na dormência fisiológica (DF), operam diversos mecanismos localizados não só no embrião propriamente dito, como também nos tecidos e nas estruturas adjacentes, especialmente o endosperma. Pesquisas recentes

sugerem que diversas modalidades de DF resultam da interação entre o potencial de crescimento do embrião e as restrições impostas pelos tecidos que o envolvem. Alterações nesse potencial podem envolver mudanças na sensibilidade de tecidos do embrião a substâncias inibidoras e/ou a atividade de enzimas capazes de hidrolisar as paredes celulares do endosperma.

Na DF, costuma-se distinguir dois níveis principais: *não profundo* ou de curta duração e *profundo*. No primeiro, o embrião cresce e produz plântulas normais quando isolado do restante da semente, enquanto no segundo embrião não se desenvolve, mesmo quando isolado. A dormência profunda, frequentemente encontrada em espécies arbóreas de regiões temperadas, não responde a tratamento com AG e pode ser quebrada por longos períodos de estratificação (exposição a temperaturas baixas). No nível não profundo, a semente responde ao AG e a tratamentos de escarificação, armazenamento a seco e estratificação.

Muitas vezes, a dormência relacionada com a luz é tratada como um tipo particular, já que a não germinação resulta inicialmente de uma condição ambiental inadequada ao crescimento do embrião. Entretanto, como a luz, através do fitocromo, pode causar alterações no requerimento de condições ambientais específicas pela semente, esse fator pode ser responsável por um tipo de dormência fisiológica. Um exemplo do controle da dormência pela luz é verificado em sementes de algumas plantas daninhas que, uma vez enterradas, permanecem dormentes até receberem um breve estímulo luminoso, quando então perdem a dormência e germinam em condições adequadas de água e temperatura. Sementes de *Datura ferox*, uma daninha de climas temperados e subtropicais da América do Sul, são produzidas no verão e no outono e permanecem dormentes quando deixadas sobre a superfície ou enterradas, mas adquirem a capacidade de germinar quando sementes enterradas são expostas à luz, o que normalmente ocorre no cultivo do solo. Assim, o soterramento induz na semente uma maior sensibilidade a irradiâncias muito baixas, percebidas pelo fitocromo A. Em espécies tropicais pioneiras, é comum a ocorrência de dormência causada pela luz, como em *Cecropia glaziovii*, *Piper arietinum* e *Miconia cinnamomifolia*, em virtude de baixas razões V:VE no meio.

Dormência morfológica

Refere-se à semente dispersa com o embrião não diferenciado (estágio de pré-embrião) ou não completamente desenvolvido (estágio de "torpedo" ou linear). Desse modo, o embrião deverá passar por um período de maturação pós-dispersão, até a semente estar apta a germinar. Em espécies tropicais, esse crescimento do embrião é praticamente contínuo no ambiente natural, ficando muitas vezes difícil separar os processos de quebra da dormência e de germinação propriamente dita. Esse desenvolvimento pós-dispersão é afetado pelas condições ambientais, principalmente temperatura, umidade e luz.

Heraclium sphondylium (uma espécie europeia), por exemplo, requer um período de baixas temperaturas, enquanto *Elaeis guineenses* (dendezeiro, palmeira originária da África) necessita de temperaturas na faixa de 35 a 40°C. Outros

exemplos de espécies com esse tipo de dormência são *Virola surinamensis* (árvore da região tropical das Américas) e *Ilex paraguariensis* (erva-mate da região Sul do Brasil).

Dormência morfofisiológica

Nessa modalidade, a semente apresenta ambas as classes de dormência mencionadas anteriormente. O embrião deve alcançar determinado tamanho crítico, e a DF deve ser quebrada por estratificação ou outro tratamento. Em algumas espécies, a DF precisa ser quebrada antes de o embrião retomar seu desenvolvimento, enquanto em outras ambos os processos (quebra de dormência fisiológica e crescimento do embrião) ocorrem ao mesmo tempo. Sementes de *Annona crassiflora* (Rizzini, 1973) provavelmente se enquadram nessa categoria.

Dormência física

Este tipo de dormência é causado pela impermeabilidade dos envoltórios da semente e/ou do fruto, restringindo total ou parcialmente a difusão de água ao embrião. É possível que tegumentos e envoltórios da semente também possam restringir a difusão de oxigênio para o interior da semente, como deve ser o caso de sementes de *Serenoa repens* (uma palmeira) e *Brachiaria brizantha* (capim-braquiário). Em Fabaceae, a resistência à entrada de água é conferida pela testa, que apresenta uma camada de células paliçádicas com paredes secundárias grossas e lignificadas (esclereídeos), impregnadas com substâncias de natureza hidrofóbica, como lipídios, suberina, cutina, substâncias pécticas e lignina. O tegumento pode também conter uma mucilagem que se expande na presença de água, formando uma barreira à difusão de oxigênio e diminuindo a velocidade de germinação.

Trata-se de uma das modalidades de dormência mais comumente citadas em espécies tropicais, como *Schizolobium parahyba* (guapuruvu), *Erithrina speciosa*, *Mimosa scabrella* (bracatinga) e *Senna multijuga* (canafistula).

Dormência química

Inicialmente, enquadrava-se nessa classe a dormência causada por inibidores de crescimento presentes no pericarpo. A definição foi posteriormente estendida para substâncias produzidas tanto no fruto quanto na própria semente e que, translocadas para o embrião, inibem seu crescimento. Aquênios de *Bidens pilosa* (picão-preto), por exemplo, germinam melhor quando submetidos a lavagem com água corrente, sugerindo a presença de inibidores no aquênio. No caso do picão, entretanto, é possível que tais inibidores atuem reduzindo, via oxidação, a disponibilidade de oxigênio ao embrião. Inibidores têm sido detectados – principalmente por intermédio de bioensaios – tanto no fruto quanto na semente, embora seu papel no controle endógeno da germinação raramente fique estabelecido. Em *Rosa rugosa*, a lixívia de aquênios dormentes inibe a germinação de embriões isolados de sementes dormentes (dormência fisiológica) dessa espécie, mas não é capaz de inibir a germinação de embriões não dormentes, ou seja, nesse caso a dormência química manifesta-se apenas na presença de dormência fisiológica. Portanto, a expressão "dormência química" deve ser aplicada apenas às espécies cujas sementes não apresentam dormência fisiológica.

Inibidores químicos (especialmente compostos fenólicos) no pericarpo, na testa ou no próprio embrião foram detectados, entre outras, em *Chorisia speciosa* (paineira), *Copaifera langsdorffii* (copaiba), *Myroxylum peruiferum* (cabreúva) e *Amburana cearenses* (amburana).

Quebra artificial da dormência

Diferentes procedimentos controlados podem ser utilizados para interromper a dormência das sementes em ensaios de laboratório, destacando-se que cada espécie apresenta necessidades específicas conferidas por suas características morfológicas e/ou fisiológicas.

Alguns dos procedimentos comumente usados são mencionados brevemente a seguir.

- Estratificação: consiste no tratamento da semente hidratada com temperatura baixa (entre 4 e 6°C). Em geral, a semente é mantida em um substrato úmido que permita bom arejamento. Tem sido usada para casos de dormência fisiológica (DF) ou morfológica (DM)
- Alternância de temperatura: sementes hidratadas são submetidas a regime de trocas de temperatura, em geral alterando-se uma temperatura na faixa de 30°C com outra, 10 ou 15 graus abaixo, por exemplo, 8 h a 30°C e 16 h a 20°C. O número de ciclos necessários depende da semente
- Pós-maturação a seco: armazenam-se sementes não hidratadas, por período variável (de alguns dias a vários meses) em temperaturas relativamente elevadas, na faixa de 40 a 60°C. Algumas espécies requerem tratamento curto, de poucas horas, em temperaturas elevadas (50 a 70°C)
- Tratamento químico: consiste na embebição da semente em solução de nitrato ou fitorreguladores, principalmente giberelinas
- Escarificação: usado principalmente nos casos de dormência física, consiste em submeter a semente a algum tratamento que facilite a difusão de água ou gases para o seu interior. A escarificação pode ser feita por abrasão (p. ex., lixamento do tegumento duro), perfuração, imersão em substâncias corrosivas (como o ácido sulfúrico concentrado), imersão em solventes orgânicos e imersão em água fervente, entre outros
- Lixíviação: consiste em manter as sementes imersas em recipiente com água ou, o que é mais comum, em água corrente, durante determinado tempo, variável de acordo com o material. É um método recomendado para casos de dormência química.

Na natureza, diversos fatores, tanto bióticos quanto abióticos, podem contribuir para a quebra de dormência em sementes. Alterações na cobertura vegetal, por exemplo, podem modificar a qualidade da luz, eventualmente levando à quebra de dormência causada pela luz em sementes depositadas sobre a superfície do solo. A amplitude das flutuações térmica, especialmente na superfície do solo, pode interferir tanto em casos de dormência fisiológica quanto nas propriedades físicas do tegumento de algumas sementes, diminuindo sua resistência à difusão de fluidos. Escarificação natural também pode ser realizada por insetos e microrganismos presentes no solo, bem

como por aves e mamíferos por intermédio da ingestão e passagem da semente pelo trato digestivo do animal. A chuva, por sua vez, pode ajudar a remover substâncias inibidoras presentes nos envoltórios da semente, contribuindo assim para a quebra de dormência química.

Temperaturas elevadas também podem quebrar a dormência em ambientes sujeitos a queimadas periódicas. O fogo pode constituir-se em um importante fator de interrupção da dormência causada por tegumentos rígidos, mas seu efeito dependerá da intensidade e da duração do estímulo térmico, pois em geral o contato direto com a chama causa a morte da semente. Um exemplo sobre a ação do fogo sobre a germinação é encontrado em sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella*).

Referências bibliográficas

- Bassel GW. To grow or not to grow? Trends in Plant Science. 2016;21(6):498-505.
- Bewley JD. Seed germination and dormancy. The Plant Cell. 1997;9:1055-66.
- Bradford KJ. Applications of hydrothermal time to quantifying and modeling seed germination and dormancy. Weed Science. 2002;50:248-60.
- Bradford KJ. Water stress and the water relations of seed development: a critical review. Crop Science. 1994;34:1-11.
- Chahtane H, Kim W, Lopez-Molina L. Primary seed dormancy: a temporally multilayered riddle waiting to be unlocked. Journal of Experimental Botany. 2017;68(4):857-69.
- da Silva EA, Toorop PE, van Aest AC, Hilhorst HW. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica*) seed germination. Planta. 2004;220:251-61.
- Dewitt M, Galvão VC, Fankhauser C. Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. Annual Review Plant Biology. 2016;67:513-37.
- Donohue K. Seeds and seasons: interpreting germination timing in the field. Seed Science and Research. 2005;15:175-87.
- Durr C, Dickie JB, Yang XY, Pritchard HW. Ranges of critical temperature and water potential values for the germination of species worldwide: contribution to a seed trait database. Agricultural and Forest Meteorology. 2015;200:222-32.
- Finch-Savage W, Footitt S. Seed dormancy cycling and the regulation of dormancymechanisms to time germination in variable field environments. Journal of Experimental Botany. 2017;68:843-56.
- Galland M, Huguet R, Arc E, Cuff G, Job D, Rajjou L. Dynamic proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during Arabidopsis seed germination. Molecular & Cellular Proteomics. 2014;13(1):252-68.
- Jones RL, Oughan H, Thomas H, Waaland S. The molecular life of plants. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2013.
- Kermode AR. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. In: Kigel J, Galili G, editors. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker; 1995.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Science Research. 2005;15:281-307.
- Labouriau LG. A germinação das sementes. Secretaria Geral da OEA, Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Washington: OEA; 1983.
- Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S, Buitink J. Late seed maturation: drying without dying. Journal of Experimental Botany. 2016;6:1-15.
- Née G, Xiang Y, Soppe WJJ. The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate. Current Opinion in Plant Biology. 2017;35:8-14.

Oliver AE, Crowe LM, Crowe JH. Methods for dehydration-tolerance: depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification. *Seed Science Research*. 1998;8:211-21.

Rizzini CT. Dormancy in seed of *Annona crassiflora*. *Journal of Experimental Botany*. 1973;24:117-23.

Vieira AH, Martins EP, Pequeno PLL, Locatelli M, Souza MG. Técnicas de produção de sementes florestais. *Boletim Embrapa/CPAFRO*. 2001;205:1-4.

Vieira BC, Bicalho EM, Munné-Bosch S, Garcia S. Abscisic acid regulates seed germination of *Vellozia* species in response to temperature. *Plant Biol J*. 2017;19:211-6.

Weber H, Borisjuk L, Wobus U. Molecular physiology of legume seed development. *Annual Review of Plant Biology*. 2005;56:253-79.

Bibliografia

Baskin CC, Baskin JM. *Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. San Diego: Academic Press; 1998.

Black M, Bradford KJ, Vazquez-Ramos J, editors. *Seed biology: advances and applications*. Wallingford: CABI; 2000.

Ferreira AG, Borghetti F, organizadores. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Kigel J, Galili G, editors. *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker; 1995.