

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal

CAMILA RIBEIRO MAGALHÃES

**ESTRUTURA DA TESTA DE LEGUMINOSAE E SUA INFLUÊNCIA NA
AQUISIÇÃO DE DORMÊNCIA FÍSICA PRÉ E PÓS-DISPERSÃO**

BELO HORIZONTE – MG
2021

Camila Ribeiro Magalhães

**ESTRUTURA DA TESTA DE LEGUMINOSAE E SUA INFLUÊNCIA NA
AQUISIÇÃO DE DORMÊNCIA FÍSICA PRÉ E PÓS-DISPERSÃO**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Queila de Souza Garcia

**BELO HORIZONTE – MG
2021**

043 Magalhães, Camila Ribeiro
Estrutura da testa de Leguminosae e sua influência na aquisição de
dormência física pré e pós-dispersão [manuscrito] / Camila Ribeiro Magalhães.
- 2021.
89 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira. Coorientadora:
Profa. Dra. Queila de Souza Garcia.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

1. Dormência. 2. Leguminosa. 3. Sementes. 4. Germinação. I. Oliveira, Denise
Maria Trombert de. II. Garcia, Queila de Souza. III. Universidade Federal de
Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAMILA RIBEIRO MAGALHÃES
Matrícula 2017661575

Tese intitulada "**Estrutura da testa de Leguminosae e sua influência na aquisição de dormência física pré e pós-dispersão**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Vegetal, área de concentração **Morfologia, Sistemática e Diversidade Vegetal**.

Tese aprovada em 26/11/2021 pela comissão designada pelo Colegiado:

Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais), Dr. Cláudio Jose Barbedo (Instituto de Pesquisas Ambientais - IPA, Núcleo de Conservação da Biodiversidade), Dr. Orlando Cavalari De Paula (Universidade Federal de Uberlândia), Dr. Fernando Henrique Aguiar Vale (Universidade Federal de Minas Gerais) e Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro (Universidade Estadual de Campinas).

Assinatura dos membros da comissão



Documento assinado eletronicamente por **Denise Maria Trombert de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 26/11/2021, às 18:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Orlando Cavalari de Paula, Usuário Externo**, em 26/11/2021, às 18:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Henrique Aguiar Vale, Professor do Magistério Superior**, em 26/11/2021, às 19:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudio José Barbedo, Usuário Externo**, em 27/11/2021, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Maria Carmello Guerreiro, Usuário Externo**, em 29/11/2021, às 12:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1109462** e o código CRC **64731E10**.

À classe trabalhadora do Brasil e do mundo, que
luta e resiste à desumanização imposta por um
sistema duro e injusto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Universidade Federal de Minas Gerais e ao Instituto de Ciências Biológicas, não apenas pela estrutura, mas também por ser meu grande lar nos últimos 12 anos.

À CAPES, pela bolsa concedida. Às agências de fomento CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, por proporcionar a experiência de cursar a pós-graduação.

Aos funcionários administrativos do Instituto de Ciência Biológicas e do Departamento de Botânica, especialmente à Denise (secretária) e ao Wagner (técnico do Laboratório de Anatomia Vegetal), por direta ou indiretamente propiciarem as atividades acadêmicas.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal por todo ensinamento teórico e prático e pela convivência nos últimos sete anos. Em especial, aos professores Fernando Vale e Rosy Isaias, pelo convívio e aprendizados nos anos iniciais no Laboratório de Anatomia Vegetal, e ao professor Elder Paiva, pela convivência e ensinamentos diários no PlantSeR.

À Profa. Denise Oliveira, pela orientação e por todos os ensinamentos que me ajudaram em minha formação profissional e pessoal.

À minha coorientadora, Profa. Queila Garcia, por aceitar a parceria e cooperar de maneira excepcional com o desenvolvimento do meu projeto de doutorado.

A Ailton Rodrigues, Leilane Barreto e Rafaella Ribeiro, pela disponibilidade e pelas contribuições fundamentais em meu trabalho de qualificação.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e disposição em colaborar com o presente trabalho.

Ao Centro de Microscopia, por possibilitar nossas análises em microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, mesmo com atendimento excepcional durante a pandemia.

À Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte e ao Parque Municipal Américo Renné Giannetti, pela autorização das coletas.

Ao Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos que, gentilmente, cedeu as sementes de *Vigna unguiculata*. A Clébio Pereira Ferreira, que ajudou na obtenção das mesmas.

À EMBRAPA Milho e Sorgo, pela estrutura e apoio técnico nos experimentos de cultivo. Ao Dr. Décio Karam, a Fábio Souza e a Melina Navarro Dabéss, pela viabilização e desenvolvimento dos experimentos de cultivo.

A Alison Meneses, Humberto de Almeida, Marcelo Kubo e Stéphan Bonifácio, pela companhia e auxílio nas coletas.

A Leilane Barreto e Marcelo Gomes, pelo auxílio com as análises estatísticas.

A Igor Ballego, pela ajuda com a interpretação das imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao corpo discentes do PPG, pela convivência e lutas enfrentadas nos últimos anos com as tentativas de desmonte da Universidade. Destaco agradecimento aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal, pelos anos de convivência.

Às amigas e companheiras da representação discente, Mariana Augsten, Thamyris Bragioni e Vera Ferreira, por dividirem a experiência e pela paciência e amizade.

Aos amigos e amigas do PlantSeR, Adriano, Andrea, Aryanna, Carol, Gabriel, Igor, Mariana, Victor, pelos cafés, almoços e festas, sempre muito fartos em comidas e risadas. Também, pelo apoio nas técnicas, interpretações e nas crises que apareceram algumas vezes durante a caminhada. Em especial à Stéphanie, com quem dividi todas as alegrias e angústias da pós-graduação e da vida pessoal.

Às companheiras e companheiros do Cursinho Popular Podemos Mais e do Levante Popular da Juventude, que no último ano trouxeram um novo sentido à minha vida. Muito obrigada por me ensinarem o que significa esperar. Um agradecimento mais que especial à Lorhana Lopes, por extrapolar as barreiras da militância e se tornar uma verdadeira amiga da vida.

A Alison, Bruna, Carol, Geórgia, Juliana, Lorrana, Mariana e Paula, pelo suporte nos momentos mais difíceis e pela amizade de sempre. À Uiara, pelo apoio essencial para o desenvolvimento deste trabalho no momento mais difícil de me manter firme.

A Ariel, Nina e Thayse, por nunca me deixarem esquecer do que é mais importante na vida. Pela presença mesmo nos momentos de isolamento. Pelo amor, carinho e, sempre que necessários, puxões de orelha.

A toda a minha enorme família, por serem a minha base.

Às minhas primas Janayna, Joana e Renata, pela amizade que vai muito além do sangue.

À Cris, minha cunhada-irmã e meu irmão Nandinho, pelo carinho e companheirismo diários. Às minhas sobrinhas Maria e Sofia, por serem luz nos dias mais escuros.

Ao meu pai Fernando e à minha mãe Tânia, por todo apoio e por confiarem e acreditarem em mim, muitas vezes mais que eu mesma. Sem sua estrutura e amor eu não conseguiria percorrer metade do caminho que percorri até aqui.

Ao meu filho Gabriel, por me ajudar a ser uma pessoa melhor a cada dia. Pelo amor e dedicação. Pela existência!

*“A alegria não chega apenas no encontro do
achado, mas faz parte do processo da busca. E
ensinar e aprender não podem dar-se fora da
procura, fora da boniteza e da alegria.”*

(Paulo Freire)

RESUMO

O envoltório seminal reveste externamente a semente e tem como função principal a proteção do embrião. Na semente madura, testa e tégmem, se este estiver diferenciado, podem impedir a germinação caso haja impermeabilidade. Envoltórios seminais impermeáveis promovem a dormência física, que está, normalmente, relacionada a uma ou mais camadas de células em paliçada que, frequentemente, ocorrem na testa, e a substâncias hidrofóbicas impregnadas nas paredes dessas células. Entre as espécies de Leguminosae, a dormência física é muito comum. Um aspecto importante de se investigar é o estrutural, já que, apesar de ser bastante conhecida, ainda há lacunas na caracterização estrutural da testa típica das Leguminosae em diversos trabalhos. Outro elemento interessante é a influência que o ambiente, tanto maternal quanto de armazenamento, tem sobre a aquisição da dormência física entre as leguminosas. Sabe-se que as condições ambientais influenciam o teor de água da semente que, por sua vez, está relacionado com o percentual de sementes com dormência física. Há registros de espécies em que a impermeabilidade é mais pronunciada quando o conteúdo hídrico das sementes é mais baixo, porém até o momento, há poucas referências a aspectos estruturais que evidenciem a influência desses aspectos sobre a presença ou ausência de dormência física dependente do teor de água. Diante disso, os objetivos do presente trabalho são: caracterizar, detalhadamente, as camadas da testa de espécies de Leguminosae, averiguando a natureza química das paredes celulares; caracterizar a ontogênese da testa de *Erythrina speciosa*, com foco principal no estrato mucilaginoso; verificar a influência do ambiente sobre a dormência física antes e depois da dispersão; e avaliar a influência da estrutura do tegumento seminal na aquisição de dormência física pré e pós-dispersão. Os termos macroesclereídes e osteoesclereídes são frequentemente usados de forma inadequada quando se trata de envoltórios seminais; para evitar disseminação de dados incorretos, a composição química das camadas celulares que compõe a testa deve ser investigada. A cutícula *sensu lato* em sementes de Leguminosae pode não conter lipídios em sua composição e, por vezes, a camada mais externa da semente é constituída apenas por compostos pécticos; por isso, o termo estrato mucilaginoso é o termo mais adequado para ser adotado. O estrato mucilaginoso é essencial para aquisição e manutenção da dormência física em espécies de Leguminosae, como evidenciamos experimentalmente.

Palavras-chave: Dormência física; estrutura; envoltório seminal; Leguminosae; testa.

ABSTRACT

The seed coat externally covers the seed, and its primary function is to protect the embryo. In mature seed, testa, and tegmen, if differentiated, can prevent germination if there is impermeability. Impermeable seed coats promote physical dormancy, which is usually related to one or more layers of palisade cells that often occur in the testa and to hydrophobic substances embedded in the walls of these cells. Among Leguminosae species, physical dormancy is very common. An important aspect to investigate is the structural since, despite being well known, there are still gaps in the structural characterization of the typical testa of Leguminosae in several works. Another interesting element is the environment's influence, maternal and storage, on the acquisition of physical dormancy among legumes. It is known that environmental conditions influence the seed moisture content, which, in turn, is related to the percentage of seeds with physical dormancy. There are records of species in which the impermeability is more pronounced when the water content of the seeds is lower. However, there are few references to structural aspects that show the influence of these aspects on the presence or absence of physical dormancy depending on the water content. Therefore, the objectives of the present work are: to characterize, in detail, the testa layers of Leguminosae species, investigating the chemical nature of the cell walls; characterize the ontogenesis of the testa of *Erythrina speciosa*, with a main focus on the mucilaginous stratum; verify the influence of the environment on physical dormancy before and after dispersal; and evaluate the influence of the seed coat structure on the acquisition of pre- and post-dispersion physical dormancy. The terms macrosclereids and osteosclereids are often misused when they come to seed coats; to avoid the dissemination of incorrect data, the chemical composition of the cell layers that make up the testa must be investigated. The *sensu lato* cuticle in Leguminosae seeds may not contain lipids in its composition, and, sometimes, the outermost layer of the seed is made up only of pectic compounds; therefore, the term mucilaginous stratum is the most appropriate term to adopt. The mucilaginous stratum is essential for the acquisition and maintenance of physical dormancy in species of Leguminosae, as we have shown experimentally.

Key words: Leguminosae; physical dormancy; seed coat; structure; testa.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
OBJETIVOS	13
REFERÊNCIAS GERAIS	15
CAPÍTULO I - Osteoesclereídes, macroesclereídes e cutícula: o que sabemos sobre a testa das Leguminosae?	17
Resumo	19
Introdução	20
Material e métodos	22
Resultados e discussão	24
Agradecimentos	25
Referências	25
Tabelas	35
Figuras	42
CAPÍTULO II - Desenvolvimento e ultraestrutura da testa de <i>Erythrina speciosa</i> Andrews (Papilionoideae - Leguminosae)	45
Resumo	47
Introdução	48
Material e métodos	49
Resultados	51
Discussão	52
Agradecimentos	55
Referências	55
Figuras	58
CAPÍTULO III - A disponibilidade hídrica pré e pós-dispersão influencia – ou interfere - na dormência física de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.?	64
Resumo	66
Agradecimentos	75
Referências	75
Tabelas	79
Figuras	80
CAPÍTULO IV - Post-dispersion humidity condition alters the surface of the testa and the proportion of seeds with physical dormancy in <i>Erythrina speciosa</i>	85
Resumo	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88

INTRODUÇÃO GERAL

O envoltório seminal reveste externamente a semente e tem como função principal a proteção do embrião. Além disso, pode desempenhar vários outros papéis, dependendo do estágio de desenvolvimento da semente (Werker, 1997). Nos estágios iniciais de desenvolvimento, pode participar tanto do transporte de substâncias importantes para o desenvolvimento seminal, quanto como tecido de reserva temporária dessas substâncias. Pode desenvolver estruturas, como arilo e sarcotesta, que na semente madura participam do processo de dispersão da semente (Werker, 1997). Pode influenciar, também, o processo de germinação, seja por atuar como tecido de reserva de substâncias que serão utilizadas durante o processo (Werker, 1997) ou impedindo que ele se inicie devido a sua impermeabilidade, no processo que conhecemos como dormência física (DF) (Werker, 1997).

A impermeabilidade do envoltório seminal (ou do pericarpo, no caso de frutos indeiscentes), que impede a absorção de água necessária para iniciar a germinação, está, normalmente, relacionada a uma ou mais camadas de células paliçádicas presentes no envoltório seminal ou no pericarpo, mais especificamente a substâncias hidrofóbicas impregnadas nessas células (Baskin et al., 2000; Baskin e Baskin, 2014). A DF é adquirida durante o processo de perda de água que ocorre na última etapa do desenvolvimento das sementes (Werker, 1997; Baskin e Baskin, 2014).

Dormência física é muito comum entre as espécies de Leguminosae (Baskin e Baskin, 2014), ocorrendo em diversos gêneros, como *Bauhinia* (Alves et al., 2000; Ilkiu-Borges e Mendonça, 2009), *Piptadenia* (Benedito et al., 2008; Azeredo et al., 2010; Santos et al., 2014), *Samanea* (Lopes, 1998; Oliveira et al., 2012) e *Schizolobium* (Shimizu et al., 2011). Na família, a impermeabilidade do tegumento seminal é atribuída não somente à paliçada, mas a toda estrutura da testa, que tem um padrão anatômico característico, já descrito para muitas de suas espécies (Corner, 1951; 1976; Gunn, 1981).

O envoltório seminal típico de Leguminosae é constituído pela exotesta, composta por uma camada paliçádica e coberta externamente pelo estrato mucilaginoso, pela mesotesta, formada por células hipodérmicas em ampulheta e algumas camadas de células parenquimáticas, e pela endotesta, que pode estar diferenciada em células em ampulheta ou ser indiferenciada (Corner, 1951; 1976; Gunn, 1981); a vascularização pode ser restrita ao feixe rafeal e, em certas espécies, também ocorre uma extensão pós-calazal, indo do hilo até a micrópila na rafe e antirrafe (Corner, 1976).

De forma geral, o que torna essas sementes duras e hidrofóbicas são mudanças químicas que ocorrem nas pectinas insolúveis que compõem as paredes celulares e o estrato mucilaginoso do tegumento seminal (Werker, 1997). Ma et al. (2004), por exemplo, relacionaram a quebra de dormência em sementes de soja a rachaduras na superfície do tegumento seminal, ocorridas na estrutura indicada pelos autores como cutícula, apesar dos resultados negativos nos testes histoquímicos realizados no trabalho para a detecção de cutina.

Estudos estruturais referentes a dormência física são, em sua maioria, relacionados à quebra da dormência, sendo sua aquisição, principalmente após a dispersão, ainda pouco compreendida. Sabe-se, por exemplo que o percentual de sementes impermeáveis à água desenvolvido por um indivíduo é geneticamente controlado (Baskin et al., 2000; Baskin e Baskin, 2014), mas pode ser influenciado, também, por características do ambiente em que a planta-mãe está presente, como temperatura, umidade relativa do ar e disponibilidade hídrica (Baskin et al., 2000; Baskin e Baskin, 2014; Jaganathan, 2016). Em Leguminosae há evidências de que a quantidade de chuva que a planta-mãe recebe desempenhe um papel vital no desenvolvimento de envoltórios impermeáveis. Estudando *Sophora alopecuroides*, Hu et al. (2009) observaram que, nessa espécie, o estresse hídrico resultante da baixa precipitação, em anos mais secos, leva ao desenvolvimento de uma alta proporção de sementes impermeáveis à água, enquanto em anos com alta pluviosidade a proporção de sementes impermeáveis é menor.

Nas leguminosas, mais especificamente nas Papilionoideae, as condições ambientais também podem interferir nas características seminais após a dispersão. Nesse grupo o hilo apresenta-se como uma válvula higroscópica (Hyde, 1954); ocorre, no hilo, uma camada extra de paliçada (a contrapaliçada), externa à exotesta, cujas células têm parede densamente espessada. Quando a umidade relativa do ar diminui, tornando-se mais baixa que qualquer outra experimentada antes pela semente, as células da contrapaliçada desidratam levando à abertura da fissura hilar. Com a fissura hilar aberta, ocorre difusão de vapor de água do interior da semente para o exterior. À medida em que a umidade relativa do ar volta a aumentar, a contrapaliçada absorve água e se torna mais túrgida, fechando a fissura hilar. Toda vez que a umidade relativa do ar cai, o percentual de água da semente também diminui, mas nunca aumenta (Baskin e Baskin, 2014). É provável que esse evento possa influenciar a aquisição de dormência física pós-dispersão, visto que, segundo Baskin e Baskin (2014), há espécies em que a dormência física é mais intensa quando o teor de água é mais baixo e as sementes são permeáveis quando é ainda elevado. Até o momento, não se encontram referências a aspectos

estruturais que influenciem a presença ou ausência de dormência física dependente do teor de água.

Até o momento, há poucas evidências de como os aspectos estruturais influenciam a presença ou a ausência de dormência física dependente do teor de água. Magalhães e Oliveira (2020) observaram que sementes de *E. speciosa*, analisadas imediatamente após a dispersão, podem eventualmente embeber e, após 12 meses de armazenamento, o tegumento seminal torna-se completamente impermeável. As autoras não observaram variação na anatomia do tegumento, mas, em análise de micromorfologia de superfície, as regiões laterais e calazal das sementes recém-coletadas têm o estrato mucilaginoso descontínuo, formando uma malha através da qual é possível observar a face periclinal externa das células paliçádicas da exotesta; nas sementes armazenadas, contudo, o estrato mucilaginoso é contínuo em toda extensão da semente. Segundo Magalhães e Oliveira (2020), a entrada de água ocorre exatamente nas regiões em que o estrato mucilaginoso é descontínuo. As autoras não verificaram se havia diferenças entre o percentual de água das sementes frescas e armazenadas. Dessa forma, estudos que relacionem aspectos fisiológicos e morfológicos de espécies que apresentam dormência física são necessários para compreender os processos que nela culminam, principalmente após a dispersão.

OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi debater sobre aspectos estruturais da testa de Leguminosae e forma a ampliar os conhecimentos, já bem consolidados, da anatomia típica da testa na família. Além disso, pretendeu-se avaliar a influência da estrutura do tegumento seminal de *Erythrina speciosa* e *Vigna unguiculata* na aquisição de dormência física pré e pós-dispersão, com atenção especial ao estrato mucilaginoso, já que há evidências de sua participação nesse processo. Verificou-se ainda a influência do ambiente, antes e depois da dispersão, sobre a dormência física.

Para tanto, a tese está dividida nos seguintes capítulos e objetivos específicos:

Capítulo I. Osteoesclereídes, macrosclereídes e cutícula: o que sabemos sobre a testa das Leguminosae?

Objetivo específico: Caracterizar as camadas da testa de espécies de Leguminosae, incluindo a natureza química das paredes celulares e da camada amorfa que recobre as células mais externas e realizar extenso levantamento de dados da literatura.

Capítulo II. Desenvolvimento e ultraestrutura da testa de *Erythrina speciosa* Andrews (Papilionoideae - Leguminosae)

Objetivo específico: Caracterizar a ontogênese da testa de *E. speciosa*, com especial ênfase na exotesta.

Capítulo III. A disponibilidade hídrica pré e pós-dispersão influencia – ou interfere - na dormência física de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.?

Objetivo específico: Investigar se a estrutura do tegumento seminal de *Vigna unguiculata* (Papilionoideae, Leguminosae) responde a um estresse hídrico que ocorre durante o desenvolvimento das sementes levando a produção de maior proporção de sementes com dormência física. Além disso, buscou identificar de como a variação da umidade relativa do ar no período pós-dispersão pode afetar o grau de dormência física das sementes de *V. unguiculata*.

Capítulo IV. Post-dispersion humidity condition alters the surface of the testa and the proportion of seeds with physical dormancy in *Erythrina speciosa* (capítulo já publicado no periódico *Seed Science Research*)

Objetivo específico: Esclarecer as bases da relação entre teor de umidade e grau de dormência física em Leguminosae a partir da investigação de como a variação da umidade relativa do ar no período pós-dispersão pode afetar o grau de dormência física das sementes de *E. speciosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ALVES, M.C.S., MEDEIROS-FILHO, S., ANDRADE-NETO, M., TEÓFILO, E.M. Superação da dormência em sementes de *Bauhinia monandra* Britt. e *Bauhinia unguolata* L. – Caesalpinioideae. Revista Brasileira de Sementes 22, 139-144, 2000.
- AZEREDO, G.A., PAULA, R.C., VALERI, S.V., MORO, F.V. Superação de dormência de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. Revista Brasileira de Sementes 32, 49-58, 2010.
- BASKIN, C.C., BASKIN, J.M. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. 2. San Diego: Academic Press, 2014.
- BASKIN, J.M., BASKIN, C.C., LI, X. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. Plant Species Biology 15, 139-152, 2000.
- BENEDITO, C.P., TORRES, S.H., RIBEIRO, M.C.C., NUNES, T.A. Superação da dormência de sementes de catanduva (*Piptadenia moniliformis* Benth.). Revista Ciência Agronômica 39, 90-93, 2008.
- CORNER, E.J.H. The leguminous seed. Phytomorphology 1, 117-150, 1951.
- CORNER, E.J.H. The seeds of dicotyledons. Cambridge, Cambridge University Press, 1976.
- GUNN, C.R. Seeds of the Leguminosae. In: Polhill, R.M., Raven, P.H. (Eds.). Advances in legume systematics. Part 2. Kew, Crown Copyright. 913-926, 1981.
- HU, X.W., W.U., Y.P., WANG, Y.R. Different requirements for physical dormancy release in two populations of *Sophora alopecuroides* relation to burial depth. Ecological Research 24, 1051-1056, 2009.
- HYDE, E.O.C. The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to the ripening of the seed and the permeability of the testa. Annals of Botany 18, 241-256, 1954.
- ILKIU-BORGES, F., MENDONÇA, M.S. Morfo-anatomia da semente de *Bauhinia monandra* Kurz. (Leguminosae-Caesalpinioideae). Revista Brasileira de Sementes 31, 168-174, 2009.
- JAGANATHAN, G.K. Influence of maternal environment in developing different levels of physical dormancy and its ecological significance. Plant Ecology 217, 71-79, 2016.

- LOPES, J.C. Germinação de sementes de espécies florestais de *Caesalpineia ferrea* Mart. ex Tul. var. *leiostachya* Benth., *Cassia grandis* L. e *Samanea saman* Merrill, após tratamento para superar a dormência. *Revista Brasileira de Sementes* 20, 80-86, 1998.
- MA, F., CHOLEWA, E.W.A., MOHAMED, T., PETERSON, C.A., GIJZEN, M. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coat with their permeability to water. *Annals of Botany* 94, 213-228, 2004.
- MAGALHÃES, C.R., OLIVEIRA, D.M.T. Testa structure in *Erythrina speciosa* (Leguminosae): the role of the mucilaginous stratum in the acquisition of physical dormancy. *Acta Botanica Brasilica* 34(3), 592-598, 2020.
- OLIVEIRA, L.M., BRUNO, R.L.A., ALVES, E.U., SOUSA, D.M.M., ANDRADE, A.P. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Samanea tubulosa* Bentham - (Leguminosae-Mimosoideae). *Revista Árvore* 36, 433-440, 2012.
- SANTOS, J.L., LUZ, I.S., MATSUMOTO, S.N., D'ARÊDE, L.O., VIANA, A.E.S. Superação da dormência tegumentar de sementes de *Piptadenia viridiflora* (Kunth) Benth pela escarificação química. *Bioscience Journal* 30, 1642-1651, 2014.
- SHIMIZU, E. S. C., PINHEIRO, H. A., COSTA, M. A, FILHO, B. G. S. Aspectos fisiológicos da germinação e da qualidade de plântulas de *Schizolobium amazonicum* em resposta à escarificação das sementes em lixa e água quente. *Revista Árvore* 35, 791-800, 2011.
- WERKER, E. *Seed anatomy*. Berlin, Gebrüder Borntraeger, 1997.

CAPÍTULO I

Osteoesclereídes, macroesclereídes e cutícula: nós realmente sabemos tudo sobre a testa das Leguminosae?

Manuscrito apresentado segundo as normas do periódico *Acta Botanica Brasilica*

Original Article

Osteoesclereídes, macroesclereídes e cutícula: nós realmente sabemos tudo sobre a testa das Leguminosae?

Camila Ribeiro Magalhães*¹; Stéphani Karoline Vasconcelos Bonifácio¹; Denise Maria Trombert de Oliveira¹

¹ Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, PlantSeR Lab, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

*Autor para correspondência: magalhaesribeiroc@gmail.com

ORCID: CRMagalhães: 0000-0003-2100-672X; SKVBonifácio: 0000-0002-5821-6993;

DMTOliveira: 0000-0003-1918-2433

RESUMO

A estrutura da testa das Leguminosae é bastante conhecida e esse conhecimento tem sido aplicado em estudos nas mais diversas áreas. Naturalmente, é necessário que não existam equívocos na caracterização seminal. Entretanto, temos observado que muitos trabalhos não investigam a histoquímica da testa das sementes e chamam células que não contêm lignina em sua parede de macroesclereídes e osteoesclereídes, ou de cutícula o estrato amorfo que não possui cutina em sua composição. Diante disso, o presente trabalho caracterizou, detalhadamente, as camadas da testa de espécies de Leguminosae, distribuídas entre as quatro maiores subfamílias. A natureza química da testa das sementes foi averiguada por meio de testes histoquímicos para detecção de compostos pécicos, lignina e lipídios. Nossos resultados demonstram que nenhuma das espécies estudadas apresentou lignina nas paredes celulares da testa, exceto nos elementos traqueais do xilema. Portanto, a referência como qualquer tipo de esclereíde é errônea. Além disso, a composição do estrato amorfo varia de espécie para espécie, de modo que nem sempre se trata de cutícula. Esses resultados destacam a importância da verificação da composição química em células da testa de Leguminosae para a correta identificação das camadas. Esses dados não invalidam as descrições clássicas encontradas na literatura sobre a família, mas alertam para a necessidade de avaliação anatômica e histoquímica criteriosa antes da caracterização da testa.

Palavras-chave: Camada paliádica, células em ampulheta, envoltório seminal, estrato mucilaginoso

Introdução

A semente é, na visão de Corner (1976), a estrutura mais elaborada das angiospermas. Embora a afirmativa seja passional e possa ser questionada por especialistas em várias outras estruturas, é inegável o grande avanço evolutivo que a formação das sementes, a partir da dupla fecundação, proveu para as angiospermas. Considerando ainda que a semente tem pouca plasticidade fenotípica (Oliveira, 1999; Silva & Môro, 2008), torna-se primordial o conhecimento de sua estrutura e sua adequada caracterização. O conhecimento das estruturas seminais pode embasar estudos nas mais variadas áreas, como nas relações filogenéticas (Corner, 1976; Boesewinkel & Bouman, 1984), germinação (Ribeiro *et al.*, 2016), técnicas de armazenamento (Jaganathan *et al.*, 2019) e ecologia das espécies (Barroso *et al.*, 1999; Oliveira, 1999; Silva & Môro, 2008; Jaganathan *et al.*, 2018).

Dentre os trabalhos mais marcantes e clássicos sobre sementes, destaca-se Corner (1976), que caracterizou detalhadamente a estrutura das sementes das, até então, chamadas dicotiledôneas, trazendo contribuições importantíssimas ao conhecimento sobre a morfologia e a anatomia das sementes desse grupo. No entanto, mesmo com a descrição detalhada presente no referido trabalho, ainda hoje encontramos estudos em que estruturas das sementes, como o tegumento seminal, são denominadas equivocadamente.

Esclereídes, células com parede celular tipicamente lignificada (Evert, 2013), são comuns em tegumentos de muitas sementes e a dureza seminal pode ser, erroneamente, associada a isso. Sementes de leguminosas típicas, por exemplo, são duras. Ou seja, são impermeáveis e, dessa característica, deriva a dormência física comum a várias de suas espécies (Baskin & Baskin, 2014). A estrutura do tegumento das sementes típicas de Leguminosae é facilmente reconhecível, integrada de exotesta formada por células em paliçada, mesotesta constituída de uma camada de células em ampulheta e várias camadas de células parenquimáticas, e endotesta,

que pode ser diferenciada ou não, composta de uma camada de células em ampulheta (Corner, 1951; 1976; Gunn, 1981). As células paliçádicas e em ampulheta das leguminosas, em geral, não são lignificadas (Corner, 1951; 1976), apesar disso são comumente denominadas macroesclereídes e osteoesclereídes respectivamente.

Outra generalização problemática em Leguminosae é a presença de cutícula sobre a superfície das sementes. Não é difícil compreender a fonte de possíveis equívocos, considerando a impermeabilidade seminal comum em espécies da família (Baskin & Baskin, 2014), é lógico esperar a existência de cutícula nesse caso. A cutícula é uma camada amorfa presente na superfície de células epidérmicas que é quimicamente formada por cutina, ceras e polissacarídeos (Samuels *et al.*, 2008; Evert, 2013; Yeats & Rose, 2013; Fich *et al.*, 2016). Trabalhos clássicos como Corner (1951; 1976) e Gunn (1981) indicam a presença de cutícula na superfície dessas sementes. Possivelmente por isso, muitos estudos assumem que o estrato amorfo que recobre a superfície das sementes de Leguminosae é cutícula sem que seja averiguada sua composição química. Há trabalhos em que, mesmo comprovada a ausência de lipídios, o estrato amorfo ainda é chamado de cutícula (Ma *et al.*, 2004).

A correta classificação das camadas celulares que compõem o tegumento seminal garante que os dados divulgados sejam fidedignos. Além disso, permite que os trabalhos sejam comparáveis, pois denominam, com precisão, cada estrutura. Características morfoanatômicas são de extrema necessidade em estudos experimentais que utilizem esses dados para interpretação de seus resultados e a qualidade desta interpretação depende diretamente da confiabilidade dos dados dos trabalhos de base. Pesquisas que busquem investigar certos tipos de dormência seminal e formas de germinação (natural ou artificial), por exemplo, dependem diretamente da correta compreensão da estrutura da semente.

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar as camadas da testa de espécies de Leguminosae, incluindo a natureza química das paredes celulares e da camada amorfa que recobre as células mais externas, bem como realizar extenso levantamento de dados da literatura. E, assim, responder: nós realmente sabemos tudo sobre a testa das sementes de Leguminosae?

Material e métodos

Análises anatômica e histoquímica

Foram analisadas sementes maduras das seguintes espécies: *Acacia mangium* Willd., *Caesalpinia ferrea* C.Mart. e *Samanea inopinata* (Harms) Barneby & J.W.Grimes (Caesalpinioideae); *Bauhinia variegata* L. (Cercidoideae); *Copaifera langsdorffii* Desf. (Detarioideae); e *Centrosema pascuorum* Benth., *Glycine max* (L.) Merr. e *Ormosia arborea* (Vell) Harms (Papilionoideae) (LPWG, 2017). As espécies selecionadas abrangem as quatro maiores subfamílias de Leguminosae, de acordo com a classificação filogenética mais recente (LPWG, 2017). A procedência das sementes utilizadas no presente estudo consta na Tabela 1.

Para iniciar o processamento, as sementes foram fragmentadas transversalmente na região mediana. Por serem muito rígidas, as sementes de *Acacia mangium*, *Caesalpinia ferrea*, *Samanea inopinata*, *Copaifera langsdorffii* e *Ormosia arborea* foram fragmentadas com auxílio de microrretífica Dremel. Sementes de *Bauhinia variegata*, *Centrosema pascuorum* e *Glycine max* foram seccionadas com auxílio de lâmina de aço descartável. Para permitir comparações, padronizou-se a análise das regiões laterais.

Embora sejam procedimentos usuais nos trabalhos anatômicos, a fixação e desidratação prévias à inclusão foram dispensadas para não alterar a estrutura do envoltório seminal pela absorção de água, componente das misturas fixadoras e dos agentes desidratantes. Como as

sementes maduras das leguminosas em estudo têm teor de água muito baixo, procedeu-se a infiltração direta, permitindo a análise da estrutura tegumentar seminal. Assim, todos os fragmentos foram embebidos em resina sintética (2-hidroxietil)-metacrilato Leica acrescida com endurecedor. Para otimizar a infiltração, o material foi mantido em freezer por 15 a 30 dias de modo a retardar a polimerização da resina (Paiva *et al.*, 2011, modificado). Após polimerização em temperatura ambiente, as amostras foram, então, seccionadas em micrótomo rotativo Zeiss Hyrax M40, com espessuras entre 15 e 20 μ m.

As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato, pH 4,7 (O'Brien *et al.*, 1964, modificado). Para detecção da natureza química das paredes celulares, foram realizados os seguintes testes histoquímicos: floroglucinol acrescido de HCl para identificar paredes lignificadas (Sass, 1951), vermelho de rutênio para destacar compostos pécnicos (Jensen, 1962) e sudan red B para identificar lipídios (Brundrett *et al.*, 1991). No caso dos testes com floroglucinol acrescido de HCl, para controle positivo foi analisada, também, a região de rafe. A análise e fotodocumentação foram feitas em do fotomicroscópio Olympus CX41 com câmara LC20 acoplada e as figuras foram elaboradas utilizando o programa CorelDraw Graphics Suite 2018.

Levantamento de dados da literatura

Para fundamentar a discussão dos resultados obtidos neste trabalho, procedeu-se à verificação das informações disponíveis na literatura. Foram realizadas buscas no Google Scholar (<https://scholar.google.com.br>) e nas bases de dados Clarivate e Scopus. Foram pesquisadas as seguintes palavras-chave em associação: "*seed + anatomy + Leguminosae*", "*seed coat + Leguminosae*" e "*seed + structure + Leguminosae*". Dentre os trabalhos encontrados, foram selecionados aqueles em que a estrutura do tegumento seminal foi descrita a partir de análises em microscopia de luz.

A partir dos trabalhos, coletamos informações da denominação utilizada para as camadas de células paliçádicas e em ampulheta, bem como para a camada amorfa que recobre a semente. Além disso, foi observada a utilização ou não de testes histoquímicos para identificação de cutina e compostos pécnicos e lignina.

Resultados e discussão

A testa das sementes maduras de espécies das subfamílias Caesalpinioideae (Fig. 1A-C), Detarioideae (Fig. 1E) e Papilionoideae (Fig. 1F-H) é composta por: exotesta, constituída por camada uniestratificada de células paliçádicas com paredes espessas; e mesotesta, formada externamente por uma camada de células em ampulheta e, internamente, por várias camadas de células parenquimáticas.

Em *Centrosema pascuorum* (Fig. 1F), a exotesta é a camada mais espessa da testa; em *Acacia mangium* (Fig. 1A) e *Caesalpinia ferrea* (Fig. 1B) a linha lúcida está localizada no terço apical da exotesta, em *Samanea inopinata* (Fig. 1C) e *Copaifera langsdorffii* (Fig. 1E) a linha lúcida é mediana e em *Centrosema pascuorum* (Fig. 1F) e *Ormosia arborea* (Fig. 1H) observa-se a linha lúcida bem próxima da superfície.

Em *Acacia mangium* (Fig. 1A), *Caesalpinia ferrea* (Fig. 1B), *Samanea inopinata* (Fig. 1C), *Copaifera langsdorffii* (Fig. 1E) e *Glycine max* (Fig. 1G) a mesotesta é a camada mais espessa da testa e em *Ormosia arborea* (Fig. 1H) a mesotesta tem aproximadamente a mesma espessura que a exotesta. As células em ampulheta de *Samanea inopinata* (Fig. 1C) são bem pequenas, quando comparadas a espessura da mesotesta. Já as de *Glycine max* (Fig. 1G) são bem grandes, ocupando quase toda espessura da mesotesta, e muito espaçadas entre si. Há pouco espaço entre as células em ampulheta de *Acacia mangium* (Fig. 1A), *Copaifera langsdorffii* (Fig. 1E) e *Centrosema pascuorum* (Fig. 1F). Em *Ormosia arborea* (Fig. 1H) as

células em ampulheta são difíceis de ser observadas. *Acacia mangium* (Fig. 1A), *Centrosema pascuorum* (Fig. 1F) e *Glycine max* (Fig. 1G) apresentam o parênquima da mesotesta com células muito comprimidas de forma que as células não podem ser individualizadas. Em *Caesalpinia ferrea* (Fig. 1B) e *Samanea inopinata* (Fig. 1C) as células parenquimáticas são individualizadas e tem paredes bem espessas, sendo que em *Caesalpinia ferrea* (Fig. 1B) o lume é visível e em *Samanea inopinata* (Fig. 1C) as células têm conteúdo fenólico. *Copaifera langsdorffii* (Fig. 1E) e *Ormosia arborea* (Fig. 1H) tem as células parenquimáticas da mesotesta com paredes espessas e comprimidas entre si, nos dois casos há espaços entre as células. Além da estrutura descrita, *Acacia mangium* (Fig. 1A) e *Glycine max* (Fig. 1G) apresentam endotesta diferenciada composta por uma camada de células em ampulheta. Em todas as espécies a paliçada tem paredes bastante espessas.

Bauhinia variegata (Fig. 1D), da subfamília Cercidoideae, é a única espécie com anatomia distinta. A testa é constituída por uma camada externa de células epidérmicas de formato cúbico e conteúdo fenólico e por algumas camadas de células parenquimáticas.

As análises histoquímicas revelaram que nenhuma das espécies aqui analisadas apresentou lignina impregnada nas paredes celulares das células paliçádicas e em ampulheta (Tab. 2). Não havendo lignificação, é necessário usar a forma das células para sua denominação, de modo que as células da exotesta são chamadas células em paliçada (ou células paliçádicas) e a camada mais externa da mesotesta e a endotesta, quando presente, são células em ampulheta.

Em *Acacia mangium* (Fig. 2A), *Caesalpinia ferrea* (Fig. 2C) e *Samanea inopinata* (Fig. 2E) e em *Copaifera langsdorffii* (Fig. 2I), as paredes celulares tanto das células paliçádicas quanto das células em ampulheta têm natureza péctica, evidenciada pela coloração rósea ao teste aplicado. Em *Centrosema pascuorum* (Fig. 2K), *Glycine max* (Fig. 2M) e *Ormosia* sp.

(Fig. 2O), apenas as células da mesotesta têm as paredes celulares impregnadas por compostos pécicos.

As camadas celulares são comumente classificadas sem que a composição das paredes celulares seja investigada (Tab. 3). Melo-Pinna *et al.* (1999) e Teixeira *et al.* (2004) denominaram como macroesclereídes e osteoesclereídes as células de parede espessa que compõem a testa de *Caesalpinia ferrea*, bem como Ma *et al.* (2004) o fizeram para *Glycine max*, sem que a natureza química de suas paredes fosse determinada. Ambas as espécies também foram estudadas no presente trabalho e não foi detectada lignina em nenhuma das células da testa, exceto nos elementos traqueais dos feixes vasculares. Este tipo de inconsistência pode ser observada até mesmo em trabalhos cuja composição química da parede celular é averiguada.

Souza *et al.* (2012), por exemplo, ao estudarem sementes de *Schizolobium parahyba* (Caesalpinioideae), obtiveram resultado negativo no teste para detecção de lignina e, ainda assim, denominaram as células da paliçada como macroesclereídes. Esse resultado mostra quão arraigada é a percepção de que há esclereídes em envoltórios seminais duros, como o de *S. parahyba*, que nem mesmo a evidência empírica, coletada pelos próprios autores, pôde remover. Este tipo equívoco ocorre porque a dureza das sementes ortodoxas, típicas das leguminosas, que resulta de sua impermeabilidade, é geralmente associada à presença de lignina. Infelizmente, bons livros de Anatomia Vegetal têm contribuído para perpetuar esse problema de interpretação, como Evert (2013), que generaliza que a rigidez das sementes de Leguminosae está relacionada à presença de macroesclereídes e osteoesclereídes na testa. Mais recentemente, Crang *et al.* (2018), registraram que macroesclereídes e osteoesclereídes formam a camada impermeável e espessa de certos envoltórios seminais de leguminosas. Werker (1997), porém, destaca que, na família, a rigidez da testa ocorre por conta de compostos pécicos

impregnados na face periclinal externa da exotesta. Segundo a autora, estes compostos mudam sua conformação química no último estágio de desenvolvimento da semente, quando ocorre sua dessecação. É essa alteração química que torna os compostos pécticos rígidos e hidrofóbicos (Werker, 1997).

Outra inconsistência, muito encontrada em trabalhos que analisam a estrutura de sementes de Leguminosae, está relacionada à denominação do estrato amorfo que recobre a testa, que comumente é chamado de cutícula (Tab. 2). No entanto, nossos resultados mostram que das oitos espécies analisadas, apenas em *Samanea inopinata* (Fig. 2F) e *Ormosia arborea* (Fig. 2P) foi possível detectar compostos lipídicos. Esta camada compõe cutícula em seu senso estrito e, interno a ela, registramos que há uma camada mais espessa, de natureza péctica, que compõe o estrato mucilaginoso. Estrutura semelhante foi descrita por Magalhães & Oliveira (2020) para *Erythrina speciosa*. Corner (1951) descreve que essa organização estrutural incluindo o estrato mucilaginoso recoberto por cutícula é comum nas espécies da família. Em *Acacia mangium* (Fig. 2A), *Caesalpinia ferrea* (Fig. 2C) e *Centrosema pascuorum* (Fig. 2K) o estrato amorfo é representado apenas pelo estrato mucilaginoso, visto que, nas três espécies, há apenas compostos pécticos. *Bauhinia variegata* (Fig. 2G-H) e *Copaifera langsdorffii* (Fig. 2I-J), não apresentam estrato amorfo. Em *Glycine max*, não foram identificadas nem substâncias pécticas, nem cutina nesta região (Fig. 2M-N).

É possível que essa incongruência ocorre porque, quando observado em microscopia de luz sem aplicação de testes histoquímicos específicos para detecção de compostos lipídicos, este estrato é muito semelhante à cutícula encontrada em outros órgãos vegetais, já que é amorfo e está depositado externamente à face periclinal externa das células. No entanto, a cutícula é constituída basicamente por dois componentes lipídicos: cutina insolúvel e ceras solúveis, além de polissacarídeos presentes entre a camada lipídica e a parede celular (Samuels *et al.*, 2008;

Evert, 2013; Yeats & Rose, 2013; Fich *et al.*, 2016). Sendo assim, para uma denominação adequada, a camada amorfa só deve ser chamada de cutícula quando compostos lipídicos estiverem presentes e forem identificados.

No estudo já mencionado anterior realizado por Souza *et al.* (2012), sementes de *Schizolobium parahyba* foram submetidas a testes com sudan IV, que revelaram a presença de compostos lipídicos na referida região e que, portanto, foi corretamente denominada como cutícula. De maneira distinta, há estudos com sementes de *Caesalpinia ferrea* que descreveram que elas são recobertas por cutícula, sem que a presença de compostos lipídicos fosse averiguada (Melo-Pinna *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2004). Aqui, no entanto, observamos que a natureza química do estrato amorfo das sementes de *Caesalpinia ferrea* é péctica e que não há presença de compostos lipídicos nessa região (Tab. 3), sendo equivocada a referência à cutícula adotada pelos referidos trabalhos.

Podemos destacar, também, os trabalhos com sementes de *Glycine max* (Idu & Omoruyi 2002; Ma *et al.* 2004), que também denominam o estrato amorfo como cutícula. Nossos resultados demonstram que o estrato amorfo presente nas sementes desta espécie não pode ser classificado como cutícula, visto que, assim como também observado por Ma *et al.* (2004), o resultado para investigação de compostos lipídicos é negativo. É importante ressaltar que os testes histoquímicos conduzidos no presente trabalho não permitiram identificar a natureza química do estrato amorfo de *Glycine max*, apenas reconhecer que não há lipídios.

Mesmo com poucas espécies estudadas até agora, se considerada a diversidade de Leguminosae, nossos resultados demonstram que não sabemos tudo sobre a testa de suas famosas sementes. A verificação da natureza química das paredes celulares das células que compõem a testa das leguminosas e do estrato amorfo é necessária para que estas camadas não sejam denominadas equivocadamente. A correta denominação das camadas garante que as

informações contidas nos trabalhos sejam fidedignas e permitem análises comparativas entre espécies, relacionadas filogeneticamente ou não, que são diretamente aplicáveis a diversas pesquisas, especialmente considerando a elevada importância econômica das sementes das leguminosas. As informações podem, *e.g.*, serem utilizadas como base para estudos de quebra de dormência física ou, ainda, para ajudar na elucidação dos mecanismos de superação da impermeabilidade seminal na natureza.

Agradecimentos

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES, Código Financeiro 001). Agradecemos, também, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa do DMT Oliveira (processo 305686/2018-6).

Referências bibliográficas

- Acosta Y, Pérez L, Escalante D, *et al.* 2020. Dormancy breaking in *Teramnus labialis* (L.f.) Spreng seeds through liquid nitrogen exposure is based on the modification of the hilar region, cuticle, and macrosclereid. *Acta Physiologiae Plantarum* 42:144.
- Barroso GM, Morin MP, Peixoto AL, Ichaso CLF. 1999. Frutos e sementes – morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Editora da Universidade Federal de Viçosa.
- Baskin CC, Baskin, JM. 2014. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego, Academic Press.
- Boesewinkel FD, Bouman F. 1984. The seed: structure. In: Johri BM. (ed.) *Embryology of angiosperms*. Berlin, Springer Verlag. p. 567-610.

- Bonaldo A, Baldan B, Rascio N, Gastaldo P, Profumo P, Bevilacqua LR. 1994. Ultrastructural characterization of seed coat maturation in *Cercis siliquastrum* L. *Phyton* 33:257-265.
- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991. Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7b or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry* 66: 111-116.
- Corner EJH. 1951. The leguminous seed. *Phytomorphology* 1: 117-150.
- Corner EJH. 1976. The seeds of dicotyledons. Cambridge, Cambridge University Press.
- Crang R, Lyons-Sobaski S, Wise R. 2018. Plant anatomy: a concept-based approach to the structure of seed plants. Cham, Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-77315-5>.
- Evert RF. 2013. Anatomia das plantas de Esau, meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento. São Paulo, Blucher.
- Fich EA, Segerson NA, Rose JKC. 2016. The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological roles. *Annual Reviews Plant Biology* 67: 207-33.
- Geisler GE, Pinto TT, Santos M, Paulilo MTS. 2017. Seed structures in water uptake, dormancy release, and germination of two tropical forest Fabaceae species with physically dormant seeds. *Brazilian Journal of Botany* 40: 67-77.
- Gunn CR. 1981. Seeds of the Leguminosae. In: Polhill RM, Raven PH. (eds.) *Advances in legume systematics. Part 2*. London, UK, Royal Botanical Gardens Kew, Crown Copyright. p. 913-926.
- Harris WM. 1983. On the development of macrosclereids in seed coats of *Pisum sativum* L. *American Journal of Botany* 70: 1528-1535.

- Idu M, Omoruyi OM. 2002. Seed-coat structure and anatomy of some nigerian pulses. *Journal of Plant Biology* 45: 189-195.
- Izaguirre P, Mérola S, Beyhaut R. 1994. Seed ontogeny in *Adesmia securigerifolia* (Fabaceae-Adesmieae). *Nordic Journal of Botany* 14: 547-556.
- Jaganathan GK, Jiajin Li J, Yang Y *et al.* 2019. Complexities in identifying seed storage behavior of hard seed-coated species: a special focus on Lauraceae. *Botany Letters* 166: 70-79.
- Jensen WA. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco, W.H. Freeman and Company.
- Lersten NR. 1979. A distinctive seed coat pattern in the Viciae (Papilionoideae; Leguminosae). *Proceedings of the Iowa Academy of Science* 6: 102-104.
- LPWG 2017. Phylogeny and classification of the Leguminosae: a new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66: 44-77.
- Ma F, Cholewa E, Mohamed T, Peterson CA, Gijzen M. 2004. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coat with their permeability to water. *Annals of Botany* 94: 213-228.
- Magalhães CR, Oliveira DMT. 2020. Testa structure in *Erythrina speciosa* (Leguminosae): the role of the mucilaginous stratum in the acquisition of physical dormancy. *Acta Botanica Brasilica* 34: 592-598.
- Maumont S. 1993. Seed-coat anatomy of the non-pleurogrammic seeds in the tribe Ingeae (Leguminosae, Mimosoideae). *Brittonia*, 45: 249-259.

- Melo-Pinna GFA, Neiva MSM, Barbosa DCA. 1999. Estrutura do tegumento seminal de quatro espécies de Leguminosae (Caesalpinioideae), ocorrentes numa área de caatinga (PE Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 22: 375-379.
- Molizane DM, Julio PGS, Carmello-Guerreiro SM, Barbedo CJ. 2018. Physical, physiological and anatomical changes in *Erythrina speciosa* Andrews seeds from different seasons related to the dormancy degree. *Journal of Seed Science* 40: 331-341.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Oliveira DMT. 1999. Morfologia de plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de Leguminosae. *Acta Botanica Brasilica* 13: 263-269.
- Özbek F, Büyükkartal HN, Ekici M, Özbek UM. 2016. Seed coat ultrastructure of the genus *Astragalus* L. section *Uliginosi* Gray (Fabaceae). *Gazi University Journal of Science* 29: 279-283.
- Paiva EAS, Pinho SZ, Oliveira DMT. 2011. Large plant samples: how to process for GMA embedding? *Methods in Molecular Biology* 689: 37-49.
- Pal N. 1960. Development of the seed of *Millettia ovalifolia*. *Botanical Gazette* 122: 130-137.
- Pandey AK, Jha SS. 1988. Development and structure of seeds in some Genisteeae (Papilionoideae-Leguminosae). *Flora* 181: 415-424.
- Pandey AK, Jha SS. 1990. Development and structure of seeds in Phaseoleae (Papilionoideae-Fabaceae). *Flora* 184: 369-379.

- Ribeiro RC, Figueiredo MLN, Picorelli A, Oliveira DM and Silveira FA. 2016. Does seed coat structure modulate gut-passage effects on seed germination? Examples from Miconieae DC. (Melastomataceae). *Seed Science Resesearch* 26: 139-147.
- Ribeiro MI, Rodrigues GAG, Mathias GL, Silva SM, Corsato JM, Fortes AMT. 2020. Effect of seed coat rupture on the germination of *Mimosa flocculosa* Burkart (Leguminosae) seeds. *Hoehnea* 47.
- Rodriguez-Pontes M. 2007. Development of megagametophyte, embryo, and seed in *Senna corymbosa* (Lam.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae – Caesalpinioideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 169-179.
- Rodriguez-Pontes M. 2008. Seed formation in two species of *Adesmia* (Fabaceae): co-occurrence of micropylar and lateral endosperm haustoria in legumes and its taxonomic value. *Botanical Journal of the Linnean Society* 158: 602-612.
- Samuels L, Kunst L, Jetter R. 2008. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology* 59: 683-707.
- Sass JE. 1951. *Botanical microtechnique*. Ames, Iowa State University Press.
- Serrato-Valenti G, Cornara L, Ferrando M, Modenesi P. 1993. Structural and histochemical features of *Stylosanthes scabra* (Leguminosae; Papilionoideae) seed coat as related to water entry. *Canadian Journal of Botany* 71: 834-840.
- Silva BMS, Môro FV. 2008. Aspectos morfológicos do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal de faveira (*Clitoria fairchildiana* R. A. Howard. - Leguminosae). *Revista Brasileira de Sementes* 30: 195-201

- Souza TV, Voltolini CH, Santo M, Paulilo MTS. 2012. Water absorption and dormancy-breaking requirements of physically dormant seeds of *Schizolobium parahyba* (Fabaceae – Caesalpinioideae). *Seed Science Research* 22: 169-176.
- Teixeira SP, Carmello-Guerreiro SM, Machado SR. 2004. Fruit and seed ontogeny related to the seed behaviour of two tropical species of *Caesalpinia* (Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 146: 57-70.
- Wang HL, Grusak MA. 2005. Structure and development of *Medicago truncatula* Pod wall and seed coat. *Annals of Botany* 95: 737-747.
- Werker E, Dafni A, Negbi M. 1973. Variability in *Prosopis farcata* in Israel: anatomical features of the seed. *Botanical Journal of the Linnean Society* 66: 223-232.
- Werker E. 1997. *Seed anatomy*. Berlin, Gebrüder Borntraeger.
- Yeats TH, Rose JKC. 2013. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology* 163: 5-20.

Tabela 1. Procedência das sementes das espécies amostradas neste trabalho, agrupadas por subfamília (local de coleta e coordenadas geográficas, exceto se obtidas por via comercial).

Subfamília	Espécie	Procedência das sementes
Caesalpinioideae	<i>Acacia mangium</i> Willd.	Botucatu, SP, Brasil / 22°50'56" S, 48°25'43" W
	<i>Caesalpinia ferrea</i> C.Mart.	Belo Horizonte, MG, Brasil / 19°52'11" S, 43°58'6" W
	<i>Samanea inopinata</i> (Harms) Barneby & J.W.Grimes	Belo Horizonte, MG, Brasil / 19°52'11" S, 43°58'6" W
Cercidoideae	<i>Bauhinia variegata</i> L.	Belo Horizonte, MG, Brasil / 19°51'39" S, 43°56'51" W
Detarioideae	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Comercial
Papilionoideae	<i>Centrosema pascuorum</i> Benth	São João do Cariri, PB, Brasil / 7°23'30.2" S, 36°26'38" W
	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Comercial
	<i>Ormosia arborea</i> (Vell.) Harms	Mogi Guaçu, SP, Brasil / 22°17'19" S, 49°9'5" W

Tabela 2. Resultados dos testes histoquímicos realizados com floroglucinol + HCl, vermelho de rutênio e Sudan red B, aplicados à testa das sementes das espécies de Leguminosae estudadas. na: não se aplica; +: resultado positivo; e -: resultado negativo

Subfamília	Espécie	Testes histoquímicos						
		Floroglucinol + HCl				Vermelho de rutênio		Sudan red B
		EXOTESTA	CAMADA EXTERNA DA MESOTESTA	FEIXE VASCULAR	ESTRATO AMORFO	EXOTESTA	CAMADA EXTERNA DA MESOTESTA	ESTRATO AMORFO
Caesalpinioideae	<i>Acacia mangium</i> Willd.	-	-	+	+	+	+	-
	<i>Caesalpinia ferrea</i> C.Mart.	-	-	+	+	+	+	-
	<i>Samanea inopinata</i> (Harms) Barneby &	-	-	+	+	+	+	+
Cercidoideae	<i>Bauhinia variegata</i> L.	-	na	+	na	-	na	na
Detarioideae	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	-	-	+	na	+	+	na
Papilionoideae	<i>Centrosema pascuorum</i> Benth	-	-	+	+	-	+	-
	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	-	-	+	-	-	+	na
	<i>Ormosia arborea</i> (Vell.) Harms	-	-	+	+	-	+	+

Tabela 3: Denominações do estrato amorfo e das células da exotesta e da mesotesta em Leguminosae. (-): camada não citada no trabalho.

SUBFAMÍLIA	ESPÉCIE	REFERÊNCIA	ESTRATO AMORFO		EXOTESTA		CAMADA EXTENA DA MESOTESTA	
			DENOMINAÇÃO	TESTE HISTOQUÍMICO	DENOMINAÇÃO	TESTE HISTOQUÍMICO	DENOMINAÇÃO	TESTE HISTOQUÍMICO
Caesalpinioideae	<i>Abarema</i> Pittier	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	Células paliçádicas	Não	-	-
	<i>Affonsea</i> A.St.-Hil.	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	Células paliçádicas	Não	-	-
	<i>Archidendron</i> F.Muell.	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	-	Não	-	-
	<i>Archidendropsis</i> I.C.Nielsen	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	-	Não	-	-
	<i>Caesalpinia echinata</i> Lam.	Teixeira <i>et al.</i> , 2004	Cutícula	Não	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes	Não
	<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. ex Tul.	Teixeira <i>et al.</i> , 2004	Cutícula	Não	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes	Não
	<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. ex Tul.	Mello-Pinna <i>et al.</i> , 1999	Cutícula	Sim, resultado não apresentado diretamente	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes	Não
	<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul.	Mello-Pinna <i>et al.</i> , 1999	Cutícula	Sim, resultado não apresentado diretamente	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes	Não
	<i>Calliandra</i> Benth.	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	Células paliçádicas	Não	-	-
	<i>Cercis siliquastrum</i> L.	Bonaldo <i>et al.</i> , 1994	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Sim, PAS positivo para compostos celulósicos	-	-
	<i>Cojoba</i> Britton & Rose	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	-	Não	-	-
	<i>Inga</i> Mill.	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	Células paliçádicas	Não	-	-
	<i>Macrosamanea</i> Britton & Rose	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	-	Não	-	-
<i>Mimosa bimucronata</i> (DC.) Kuntze	Geisler <i>et al.</i> , 2017	Cutícula	Sim, resultado não apresentado diretamente	Macroesclereídes	Sim/resultado não apresentado diretamente	Osteoesclereídes	Sim/resultado não apresentado diretamente	

	<i>Mimosa flocculosa</i> Burkart	Ribeiro <i>et al.</i> , 2020	Cutícula	Não	Macroesclereídes ou células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
	<i>Obolonga Barneby</i>	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	-	Não	-	-
	<i>Peltophorum dubium</i> (Spreng.) Taub.	Geisler <i>et al.</i> , 2017	Cutícula	Sim, resultado não apresentado diretamente	Macroesclereídes	Sim/resultado não apresentado diretamente	Osteoesclereídes	Sim/resultado não apresentado diretamente
	<i>Pithecellobium Mart.</i>	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	-	Não	-	-
	<i>Prosopis farcta</i> (Banks & Sol.) J.F.Macbr.	Werker <i>et al.</i> , 1973	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
	<i>Punjuba Britton & Rose</i>	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	Células paliçádicas	Não	-	-
	<i>Schizolobium parahyba</i> (Vell.) S.F.Blake	Souza <i>et al.</i> , 2012	Cutícula	Sim, sudan IV com resultado positivo	Macroesclereídes	Sim, floroglucina ácida e azul de toluidina com resultados negativos	-	-
	<i>Senna corymbosa</i> (Lam.) H.S.Irwin & Barneby	Rodriguez-Pontes, 2007	Cutícula	Não	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes ou células em ampulheta	Não
	<i>Senna martiana</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	Mello-Pinna <i>et al.</i> , 1999	Cutícula	Sim, resultado não apresentado diretamente	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes	Não
	<i>Senna spectabilis</i> (DC.) H.S.Irwin & Barneby	Mello-Pinna <i>et al.</i> , 1999	Cutícula	Sim, resultado não apresentado diretamente	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes	Não
	<i>Zygia Benth. & Hook.f.</i>	Maumont, 1993	Estrato mucilaginoso	Não	-	Não	-	-
Papilionoideae	<i>Adesmia bicolor</i> DC.	Rodriguez-Pontes, 2008	Cutícula	Não	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes ou células em ampulheta	Não
	<i>Adesmia latifolia</i> (Spreng.) Vogel	Rodriguez-Pontes, 2008	Cutícula	Não	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes ou células em ampulheta	Não

<i>Adesmia securigerifolia</i> Herter	Izaguirre <i>et al.</i> , 1994	Cutícula	Não	Macroesclereídes	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Astragalus falcatus</i> Desf.	Özbek <i>et al.</i> , 2016	Cutícula	Não	Macroesclereídes ou células paliçádicas	Não	Osteoesclereídes	Não
<i>Astragalus odoratus</i> Lam.	Özbek <i>et al.</i> , 2016	Cutícula	Não	Macroesclereídes ou células paliçádicas	Não	Osteoesclereídes	Não
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC.	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Canavalia gladiata</i> (Savi) DC.	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Crotalaria verrucosa</i> L.	Pandey & Jha, 1988	Cutícula	Não	Macroesclereídes em paliçada	Não	Osteoesclereídes em formato de célula em ampulheta	Não
<i>Erythrina speciosa</i> Andrews	Magalhães & Oliveira, 2020	Estrato mucilaginoso e cutícula	Sim, vermelho de rutênio positivo para pectinas e sudan red positivo para lipídios	Células paliçádicas	Sim, vermelho de rutênio positivo para pectinas e floroglucina ácida com resultado negativo para lignina na paliçada	Células em ampulheta	Sim, floroglucina ácida com resultado negativo para lignina na célula em ampulheta
<i>Erythrina speciosa</i> Andrews	Molizane <i>et al.</i> , 2018	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Ma <i>et al.</i> , 2004	Cutícula	Sim, sudan red 7B com resultado negativo	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes ou células em ampulheta	Não

<i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Lathyrus</i> L. (19 espécies)	Lersten, 1979	Cutícula	Não	Células epidérmicas alongadas	Não	-	-
<i>Lens culinaris</i> Medik.	Lersten, 1979	Cutícula	Não	Células epidérmicas alongadas	Não	-	-
<i>Macrotyloma geocarpum</i> (Harms) Maréchal & Baudet	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	Wang & Grusak, 2005	Cutícula	Não	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes ou células em ampulheta	Não
<i>Millettia ovalifolia</i> Kurz	Pal, 1960	Cutícula	Não	-	-	-	-
<i>Mucuna pruriens</i> (L.) DC.	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Phaseolus lunatus</i> Haberle	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Physocarpus tetragonolobus</i> (M.E.Jones) J.T.Howell	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Pisum sativum</i> L. cv. Alask	Harris, 1983	Cutícula	Não	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes ou células em ampulheta	Não
<i>Pisum sativum</i> L.	Lersten, 1979	Cutícula	Não	Células epidérmicas alongadas	Não	-	-
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	Pandey & Jha, 1990	Cutícula	Não	Macroesclereídes em paliçada	Não	Osteoesclereídes em formato de célula em ampulheta	Não

<i>Pueraria tuberosa</i> (Roxb. ex Willd.) DC.	Pandey & Jha, 1990	Cutícula	Não	Macroesclereídes em paliçada	Não	Osteoesclereídes em formato de célula em ampulheta	Não
<i>Spartium junceum</i> L.	Pandey & Jha, 1988	Cutícula	Não	Macroesclereídes em paliçada	Não	Osteoesclereídes em formato de célula em ampulheta	Não
<i>Sphenostylis stenocarpa</i> (A.Rich.) Harms	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Stylosanthes scabra</i> Vogel	Serrato-Valenti <i>et al.</i> , 1993	-	-	Células paliçádicas	Sim, floroglucina ácida com resultado positivo para lignina na paliçada	Osteoesclereídes ou células em ampulheta	Não
<i>Teramnus labialis</i> (L.f.)	Acosta <i>et al.</i> , 2020	Cutícula	Não	Macroesclereídes	Não	Osteoesclereídes	Não
<i>Teramnus labialis</i> Spreng.	Pandey & Jha, 1990	Cutícula	Não	Macroesclereídes em paliçada	Não	Osteoesclereídes em formato de célula em ampulheta	Não
<i>Ulex europaeus</i> L.	Pandey & Jha, 1988	Cutícula	Não	Macroesclereídes em paliçada	Não	Osteoesclereídes em formato de célula em ampulheta	Não
<i>Vicia</i> L. (26 espécies)	Lersten, 1979	Cutícula	Não	Células epidérmicas alongadas	Não	-	-
<i>Vigna subterrânea</i> (L.) Verdc	Idu & Omoruyi, 2002	Cutícula	Não	Células paliçádicas	Não	Células em ampulheta	Não
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	Pandey & Jha, 1990	Cutícula	Não	Macroesclereídes em paliçada	Não	Osteoesclereídes em formato de célula em ampulheta	Não

Figura 1: Testa de sementes de Leguminosae em secções transversais. **A-C.** Caesalpinioideae. **A.** *Acacia mangium*; **B.** *Caesalpinia ferrea*; **C.** *Samanea inopinata*; **D.** Cercidoideae, *Bauhinia variegata*; **E.** Detarioideae, *Copaifera langsdorffii*; **F-H.** Papilionoideae; **F.** *Centrosema pascuorum*; **G.** *Glycine max*; **H.** *Ormosia arborea*. ex: exotesta.

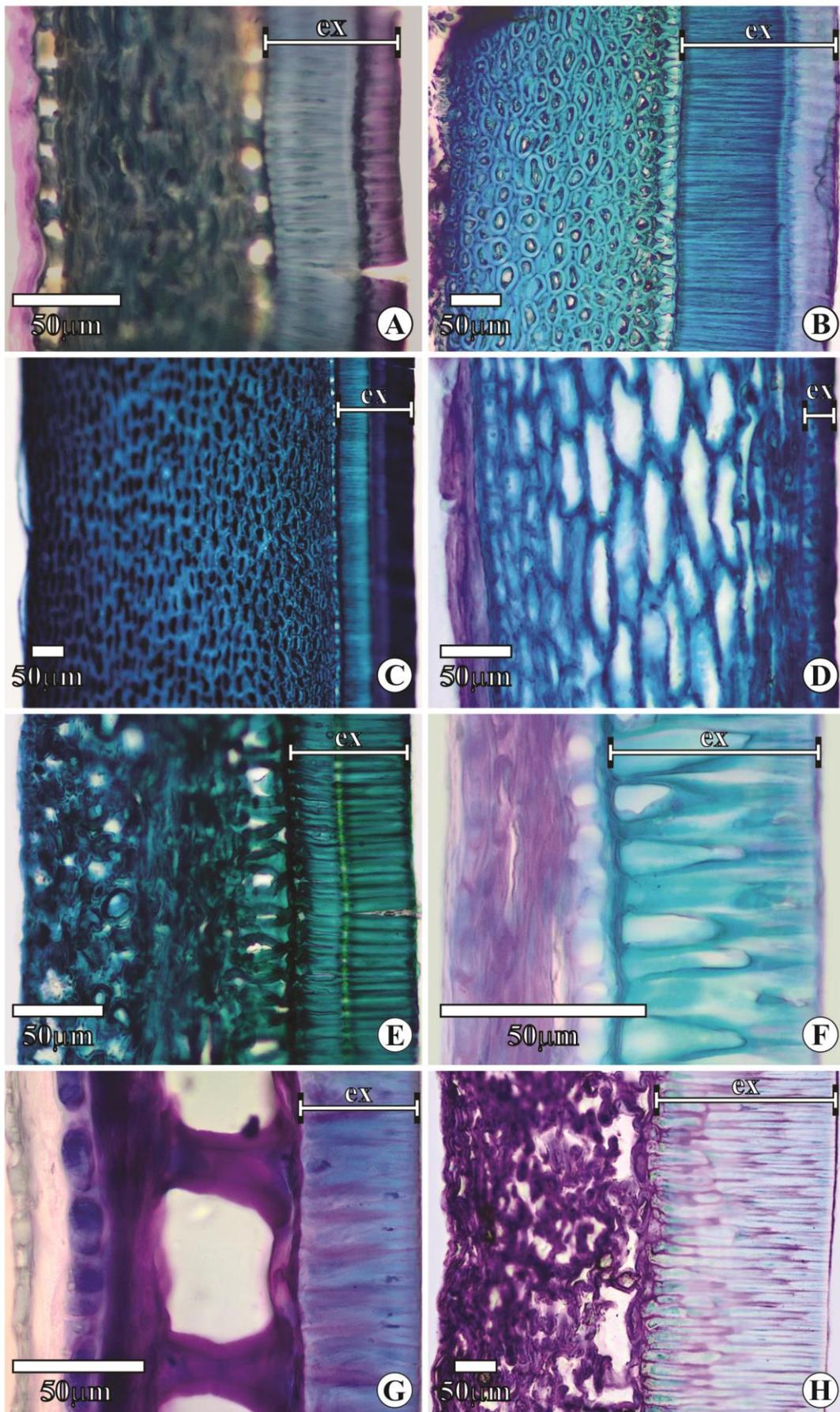
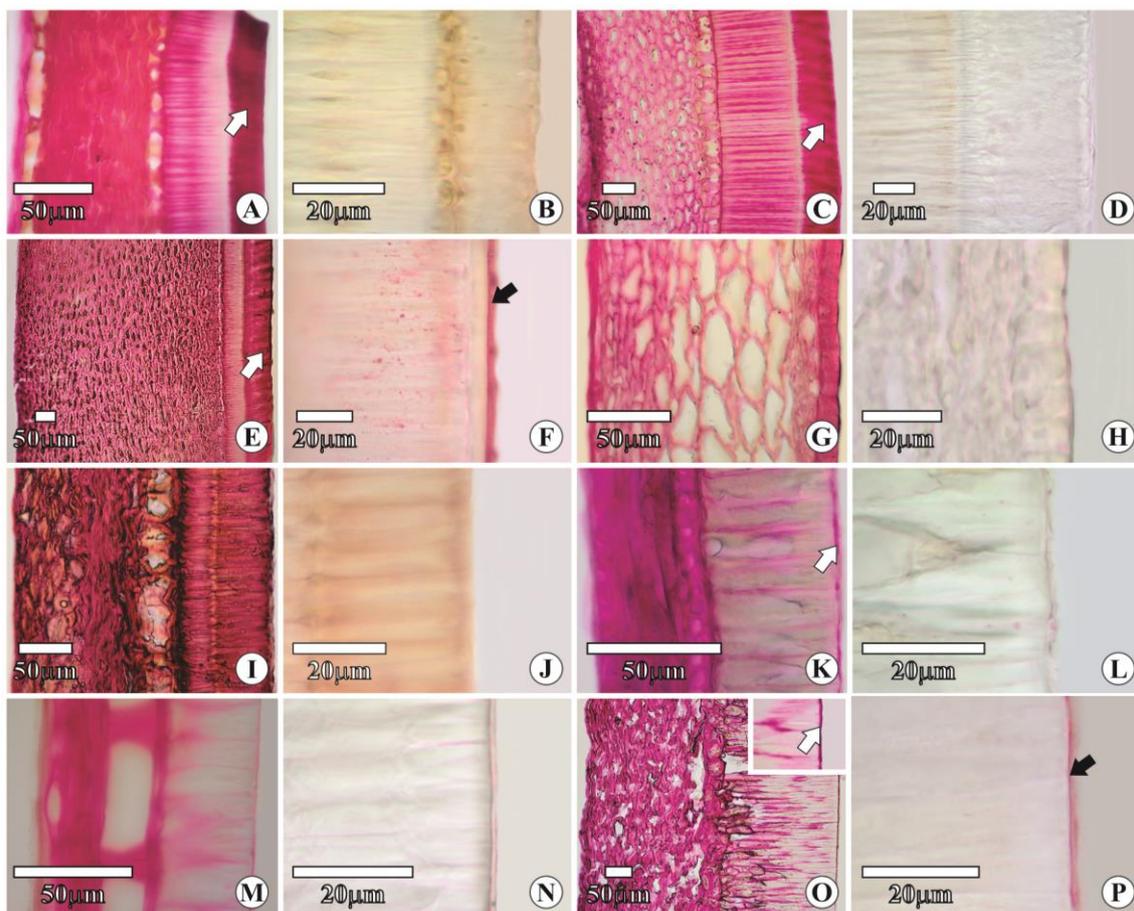


Figura 2: Região lateral da testa de sementes de Leguminosae em secções transversais, em reação com vermelho de rutênio (A, C, E, G, I, K, M, O) e com sudan red B (B, D, F, H, J, L, N, P). (A-F) Caesalpinioideae. **A-B.** *Acacia mangium*. **C-D.** *Caesalpinia ferrea*. **E-F.** *Samanea inopinata*. **G-H.** Cercidoideae. *Bauhinia variegata*. **I-J.** Detarioideae. *Copaifera langsdorffii*. **K-P.** Papilionoideae. **K-L.** *Centrosema pascuorum*. **M-N.** *Glycine max*. **O-P.** *Ormosia arborea*; em O, o destaque mostra o estrato amorfo. seta branca: estrato mucilaginoso; seta preta: cutícula.



CAPÍTULO II

Desenvolvimento da testa de *Erythrina speciosa* Andrews, uma leguminosa com cutícula e estrato mucilaginoso

Manuscrito apresentado segundo as normas do periódico *Brazilian Journal of Botany*

Desenvolvimento da testa de *Erythrina speciosa* Andrews, uma leguminosa com cutícula e estrato mucilaginoso

Camila Ribeiro Magalhães¹ e Denise Maria Trombert de Oliveira¹

1 PlantSeR Lab, Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil

Autor correspondente: E-mail: magalhaesribeiroc@gmail.com

Telefone: 55 31 3409-3059

ORCID: CRMagalhães: 0000-0003-2100-672X; DMToliveira: 0000-0003-1918-2433

Resumo

Sementes com dormência física são comuns em Leguminosae e têm o tegumento seminal impermeável. Conhecer a estrutura do tegumento seminal é, portanto, essencial para a compreensão de como a dormência física se desenvolve. Em geral, a impermeabilidade é devida a células paliçádicas impregnadas por substâncias hidrofóbicas. No entanto, há espécies de Leguminosae em que a paliçada pode não garantir, sozinha, a dormência física, e as camadas amorfas superficiais da testa, como estrato mucilaginoso e cutícula, parecem ter um papel importante. Essas informações, porém, são pouco compreendidas. Diante disso, o presente trabalho caracteriza a ontogênese da testa de *Erythrina speciosa* Andrews, espécie com dormência física na qual a ocorrência de cutícula e estrato mucilaginoso já foi registrada. Demos atenção especial à exotesta, camada superficial na qual estrato mucilaginoso e cutícula ocorrem. Para tal, sementes em diferentes estádios de desenvolvimento foram analisadas em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando protocolos usuais. A testa de *E. speciosa* tem o desenvolvimento típico das leguminosas. As análises em MET mostraram que a face periclinal externa da exotesta é recoberta pelo estrato mucilaginoso e uma delgada cutícula. A partir de nossos resultados concluímos que nas sementes das Leguminosae com dormência física, a camada péctica da cutícula *sensu lato* é mais espessa que em outros órgãos da planta e é ela quem dá origem ao estrato mucilaginoso.

Palavras-chave: Envoltório seminal, exotesta, Leguminosae, ontogênese.

Introdução

O envoltório seminal, estrutura mais externa da semente, além de proporcionar proteção ao embrião contra danos físicos e biológicos, pode desempenhar diversas funções como prover reservas, auxiliar no processo de dispersão e conferir dormência física à semente (Werker 1997). Sementes com dormência física são impermeáveis à água e, por isso, incapazes de germinar mesmo estando sob todas as condições ideais para a germinação. Essas sementes ostentam, no tegumento seminal (ou no pericarpo no caso de frutos indeiscentes) células em paliçada cujas paredes são impregnadas por substâncias hidrofóbicas (Baskin et al. 2000; Baskin e Baskin 2014).

Conhecer profundamente a estrutura do tegumento seminal é, portanto, essencial para a compreensão de como a dormência física se desenvolve (Corner 1951, 1976; Gunn 1981; Baskin et al. 2000; Baskin e Baskin 2014). No entanto, os estudos que tratam desse tipo de dormência são, em sua maioria, voltados para a superação da impermeabilidade, sendo ainda muito negligenciados os aspectos morfoanatômicos de sua aquisição. Com isso, equívocos de interpretação de dados estruturais têm sido muito difundidos (Magalhães et al. Capítulo I neste volume).

Leguminosae, por exemplo, é uma família em que a dormência física é bastante comum (Baskin e Baskin 2014). Na família, a impermeabilidade da semente é creditada à anatomia da testa, que é formada pela exotesta, composta por células em paliçada, e pela mesotesta, constituída de células em ampulheta e parenquimáticas (Corner 1951, 1976; Gunn 1981). Ao se analisar a anatomia de uma leguminosa cujas sementes apresentem dormência física, é provável que se conclua que a impermeabilidade se deve à paliçada, dado o espessamento das paredes celulares que é típico dessa camada. No entanto, esta pode ser uma conclusão equivocada, visto que há estudos que mostram que a paliçada, sozinha, pode não garantir que a semente seja impermeável. Arechavaleta-Medina e Snyder (1981) revelaram que a completa remoção da cutícula, sem qualquer comprometimento das células paliçádicas, é suficiente para tornar as sementes de *Glycine max* (Papilionoideae) permeáveis. Ma et al. (2004), em estudo com essa mesma espécie, demonstraram que pequenas rachaduras superficiais são suficientes para superação da dormência física.

Em *Erythrina speciosa*, o estrato mucilaginoso tem mostrado ser o protagonista na impermeabilidade da semente. Estudos recentes demonstram que diminutas aberturas nesse estrato expõem pequenas extensões da face periclinal externa da célula da paliçada. Essas aberturas são suficientes para que o tegumento seminal se torne permeável à água (Magalhães e Oliveira 2020; Magalhães et al. 2021). Dessa maneira, a paliçada pode não ser a principal responsável pela impermeabilidade das sementes de certas leguminosas e o estrato mucilaginoso (ou a cutícula, quando diferenciada) pode desempenhar papel importante na aquisição de dormência física.

Além do estrato mucilaginoso, *E. speciosa* apresenta delgada cutícula, a qual Magalhães e Oliveira (2020) não consideraram essencial para aquisição de dormência física. A cutícula é, frequentemente, descrita em sementes de Leguminosae; no entanto, sua presença não parece ser uma constante na família (Magalhães et al. Capítulo I neste volume). A associação direta entre cutícula e impermeabilidade se deve ao pequeno conhecimento existente a respeito da porção externa da paliçada seminal das leguminosas.

Levando em conta os dados prévios registrados na literatura, *E. speciosa* se mostra um excelente objeto de estudo, visto que suas sementes apresentam tanto estrato mucilaginoso quanto cutícula. Dessa maneira, considerando a escassez de dados estruturais sobre as camadas mais externas das sementes de Leguminosae e sua importância para aquisição e manutenção da dormência física, o presente trabalho caracteriza a ontogênese da testa de *E. speciosa*, com especial ênfase na exotesta, camada onde ocorrem estrato mucilaginoso e cutícula.

Material e métodos

Flores e frutos de *Erythrina speciosa* Andrews em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletados a partir de 20 indivíduos cultivados no Parque Municipal Américo Renné Giannetti, em Belo Horizonte, MG (19°55'12"S, 43°56'05,9"W), de agosto a novembro de 2020.

O material coletado foi dividido em amostras de acordo com o tamanho e coloração dos óvulos e sementes da seguinte maneira: amostra I (óvulos de flores em antese): 0,7 x 0,3 mm, coloração verde; amostra II: 1 x 0,6 mm, coloração verde; amostra III: 6 x 1,3

mm, coloração verde; amostra IV: 9 x 3 mm, coloração verde; amostra V: 17 x 6 mm, coloração verde rajada em marrom; amostra VI: 14 x 5 mm, coloração marrom escura.

Para análise em microscopia de luz, o material foi fixado na solução de Karnovsky em tampão de fosfato 0,1 M (Karnovsky 1965) e, em seguida, desidratado em série etílica. Posteriormente, as amostras foram infiltradas e incluídas em (2-hidroxietil)-metacrilato Leica, sendo o processamento feito com passagem em freezer por 15 dias de forma a retardar a polimerização e otimizar o processo de infiltração (Paiva et al. 2011, modificado). O material foi, então, seccionado em micrótomo rotativo Zeiss Hyrax M40, obtendo-se secções longitudinais e transversais com espessura de, aproximadamente, 10 μ m. As secções foram coradas com azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato, pH 4,7 (O'Brien et al. 1964, modificado) que, em função da metacromasia, foi utilizada também para o reconhecimento de compostos fenólicos (Briggs et al. 2005). As lâminas foram montadas com Erymoun, analisadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio Olympus CX41 com câmera LC20 acoplada e as figuras foram elaboradas utilizando o programa CorelDraw Graphics Suite 2018.

Para análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET), amostras de sementes no estádio III foram fixadas em solução de Karnovsky em tampão de fosfato 0,1 M (Karnovsky 1965). Em seguida, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em tampão de fosfato de 0,1 M. As amostras foram, então, incluídas em resina epóxi Spurr (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) (Roland 1978). Foram obtidas, em ultramicrótomo UC6 (Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA), secções ultrafinas de 60 nm que foram contrastadas com acetato de uranila (Watson 1958) e citrato de chumbo (Reynolds 1963). A análise foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 – Spirit (Philips/FEI Company, Eindhoven, Holanda).

Para a descrição das camadas celulares da testa, adotamos terminologia de Corner para Leguminosae (1951; 1976), considerando exotesta a camada mais externa, composta por células em paliçada, e mesotesta a camada adjacente à paliçada e formada por células

em ampulheta e parenquimáticas, e a endotesta diferenciada ou não em células em ampulheta.

Resultados

A partir das observações iniciais, o desenvolvimento tegumentar foi descrito considerando: Estádio I: estrutura inicial (amostra D); estágio II: atividade meristemática (amostras II e III); estágio III: diferenciação celular (amostras IV e V); estágio IV: maturação (amostra VI).

Estádio I (Fig. 1A): O óvulo maduro é bitegmentado e o tegumento externo tem 5-10 camadas de células. As células da epiderme externa são cuboídes regulares em tamanho e forma. São mais volumosas e mais densas quando comparadas às demais células do tegumento externo, com núcleos volumosos e evidentes. A face periclinal externa da parede é mais espessa que as demais faces. O tegumento interno tem duas a três camadas de células cuboídes regulares em tamanho e forma, com núcleo volumoso e menores que as células da epiderme externa.

Estádio II (Fig. 1B-E): Logo após a fecundação, a semente em desenvolvimento mantém os dois tegumentos (Fig. 1B). A exotesta mantém-se uniestratificada e suas células tornam-se mais volumosas, ocorrendo acúmulo de compostos fenólicos; a parede celular é pectocelulósica e ocorre deposição de compostos pécticos na face periclinal externa. A mesotesta é composta por células fundamentais entre as quais são observadas divisões celulares periclinais e anticlinais. Nessa fase, a epiderme interna é indistinta. O tégmen não mostra diferenciação e se mantém semelhante ao estágio anterior (Fig. 1B). Posteriormente, as células da exotesta se alongam anticlinalmente, começando a formar a paliçada, e têm a face periclinal externa da parede mais espessa e com impregnação de compostos pécticos (Fig. 1D). A mesotesta tem mais de 20 camadas de células e é possível notar divisões tanto no sentido periclinal quanto no anticlinal (Fig. 1C). Observa-se, ainda, a endotesta bastante distinta, formada por uma camada de células com núcleo volumoso e que, em comparação às outras células da testa, são bem pequenas (Fig. 1C, E). O tégmen, em contato com a testa, é composto por uma camada de células cúbicas, com núcleo volumoso (Fig. 1E).

Estádio III (Fig. 1F-K): As células da exotesta são bastante alongadas anticlinalmente, têm as faces periclinais externas da parede espessadas e impregnadas por substâncias pécnicas e o protoplasto é mais denso de todas as camadas tegumentares (Fig. 1F-G). Na mesotesta, as células hipodérmicas apresentam alongamento no sentido anticlinal e vacúolo volumoso, ocupando a maior parte do protoplasto (Fig. 1G). As células parenquimáticas são mais ou menos isodiamétricas e variam em tamanho de acordo com a região que ocupam na mesotesta (Fig. 1F), sendo as mais internas menos volumosas (Fig. 1F, H). Nesse estágio as células da exotesta atingem o alongamento anticlinal máximo (Fig. 1J). Na mesotesta, as células da hipoderme adquirem forma de ampulheta, delimitando evidentes espaços intercelulares em sua porção mediana; são células nucleadas, com protoplasto pouco evidente devido à presença de grandes vacúolos (Fig. 1J); compostos fenólicos são reconhecidos, embora menos nítidos que na exotesta. Na mesotesta, as células parenquimáticas mais internas mantêm menor volume e observam-se muitos espaços intercelulares (Fig. 1K). Nessa fase, não se observa mais o tégmem que foi reabsorvido.

Estádio IV (Fig. 1L): A exotesta paliçada atinge a máxima espessura na parede celular; a linha lúcida é evidente, próxima à face periclinal externa. Na mesotesta, as células são bastante compactadas, de forma é possível diferenciar apenas a hipoderme, formada pelas células em ampulheta. Em toda a testa, compostos fenólicos são reconhecíveis.

As análises em MET revelam que, na porção apical das células em paliçada de sementes no estágio III, o lume está comprimido, ocupando o lume exíguo, delimitado pelas faces anticlinais longas e espessadas da parede celular, onde o protoplasto está comprimido (Fig. 2A). Na face periclinal externa da célula, observa-se a cutícula delgada (Fig. 2B). O citoplasma é denso e rico em dictiossomas, plastídios e segmentos de retículo endoplasmático (Fig. 2C). Observam-se inúmeras vesículas dispersas na matriz citoplasmática (Fig. 2C). O vacuoma é constituído por pequenos vacúolos dispersos, alguns com conteúdo hialino e outros com conteúdo eletrondenso (Fig. 2C); vacúolos eletrondensos prevalecem na porção mais interna da célula paliçada.

Discussão

As sementes de *Erythrina speciosa* são caracterizadas como exotestais, visto que a camada mecânica do tegumento seminal está precisamente na exotesta. Durante o desenvolvimento seminal, o tegumento interno do óvulo vai sendo reabsorvido e, ao chegar no estágio III, já não pode ser observado. Este tipo de desenvolvimento é típico das Leguminosae (Corner 1951, 1976) e recorrentemente referido, embora Oliveira e Paiva (2005) tenham registrado, em *Pterodon emarginatus* (Papilionoideae), o coalescimento do tegumento interno ao externo, sem reabsorção.

Manning e van Staden (1985), em seu trabalho com sementes de *E. lysistemon*, descreveram sequência de diferenciação celular semelhante ao aqui observado para *E. speciosa*. Os autores relataram atividade meristemática, seguida de alongamento e diferenciação das células da epiderme externa para formar a paliçada típica da semente madura, e posterior alongamento anticlinal das células da hipoderme, que se diferenciam em células em ampulheta. Todavia, os referidos autores utilizaram apenas o tamanho das sementes para determinar os estádios de desenvolvimento. Por isso, os estádios de desenvolvimento por eles descritos diferem do proposto no presente trabalho. A testa de sementes maduras, aqui descrita no estágio IV para *E. speciosa*, apresenta o padrão típico das leguminosas descrito por Corner (1951, 1976) e Gunn (1981).

À primeira vista, a formação do estrato mucilaginoso, cuja presença na espécie já foi descrita por Magalhães e Oliveira (2020), já pode ser observada a partir do estágio II. No entanto, é relevante que seja analisada a ultraestrutura da semente também em fases anteriores do desenvolvimento, para entender as possíveis variações subcelulares. Chamamos a atenção para uma dificuldade técnica que pode explicar, ao menos em parte, a grande escassez de trabalhos ultraestruturais com envoltórios seminais. Próxima à maturação fisiológica da semente, mesmo antes de se estabelecer o processo de dessecação, o frequente conteúdo fenólico e a ocorrência de camadas rígidas impedem a preparação de boas amostras. Após a dessecação, quando as células tegumentares estão mortas, o grau de dificuldade é ainda mais impeditivo. Como nossos dados possibilitam descrever a ultraestrutura da testa próximo da maturidade e associando as observações de fases posteriores, realizadas em microscopia de luz, acreditamos ser possível extrapolar o que seria encontrado na semente após a dispersão.

Magalhães e Oliveira (2020) descrevem que, em *E. speciosa*, a exotesta é recoberta pelo estrato mucilaginoso e uma delgada cutícula, o que foi corroborado, no presente trabalho, pelas análises em MET. Trabalhos clássicos citam a presença de cutícula acompanhada por uma camada péctica localizada na região subcuticular da testa de sementes de Leguminosae. Corner (1951) diz que as sementes da família apresentam um estrato de mucilagem subcuticular que, frequentemente, tem espessamentos sucessivos. Boesewinkel e Bouman (1984) descrevem que as sementes de algumas leguminosas possuem um estrato mucilaginoso subcuticular. Corner (1976), por sua vez, relata que a porção da parede interna à cutícula seminal é mucilaginoso. Werker (1997) explica que, nas leguminosas, a “camada mucilaginoso” subcuticular da face periclinal externa da paliçada seminal é de natureza péctica. Todavia, há espécies em que a presença de cutina não pode ser determinada por testes histoquímicos, de modo que, nesses casos, a semente é recoberta apenas pelo estrato mucilaginoso (Magalhães et al. Capítulo I neste volume).

A cutícula é um estrato amorfo de estrutura complexa, constituído predominantemente de cutina e ceras, além de cutano, que pode estar ausente em algumas espécies (Evert 2013; Yeats e Rose 2013; Crang et al. 2018); cutano, todavia, é o principal polímero encontrado em plantas fossilizadas (Evert 2013; Crang et al. 2018) e em plantas adaptadas à seca (Crang et al. 2018). A cutícula pode ser dividida estruturalmente em duas regiões: a cutícula propriamente dita (CPD), composta majoritariamente de cutina e ceras; e a camada cuticular (CC), camada intermediária entre a CPD e a parede celular, constituída de cutina com polissacarídeos incorporados, onde também podem ocorrer cera, pectina e hemicelulose (Evert 2013; Yeats e Rose 2013). Geralmente, internamente à CC, encontra-se a camada péctica (CP), composta apenas por compostos pécticos, que é contínua com a lamela mediana (Evert 2013), portanto externa à parede primária (Fahn 1990). Yeats e Rose (2013) afirmam que a cutícula pode ser considerada uma modificação lipídica especializada da parede celular, não se tratando, portanto, de uma camada individualizada.

A partir disso e considerando as características já descritas para a família, podemos inferir que, nas sementes das leguminosas, a cutícula *sensu lato* difere da cutícula presente em outros órgãos vegetais e a Fig. 3 sintetiza uma hipótese interpretativa das variações que conhecemos até o momento. Na Fig. 3A, ilustramos uma síntese das possibilidades descritas na literatura (Fahn 1990; Evert 2013; Yeats e Rose 2013 Crang et al. 2018) para,

por exemplo, lâminas foliares, que podem ter ou não ceras epicuticulares, estas com ou sem a formação de cristais. Na superfície de sementes de leguminosas, não encontramos registro, na literatura, da ocorrência de ceras epicuticulares, logo propomos duas possibilidades de variação. Na Fig. 3B, CPD e CC, as duas porções de natureza lipídica da cutícula *sensu lato*, tornam-se muito delgadas, quando comparadas à CP, camada de natureza exclusivamente péctica, que compõem amplo estrato mucilaginoso; a Fig. 3C ilustra a face periclinal externa da semente de *E. speciosa*, em MET, à qual ligamos o padrão descrito, que ocorre também em outras espécies (ver Magalhães et al. Capítulo I neste volume). Já na Fig. 3D, encontra-se representada a condição em que não há camadas lipídicas e apenas o estrato mucilaginoso, que entendemos derivar da CP, é diferenciado e espesso, como registrado por Magalhães et al. (Capítulo I neste volume) em *Acacia mangium* Willd., *Caesalpinia ferrea* C.Mart. e *Centrosema pascuorum* Benth., todas espécies de Leguminosae.

Em síntese, concluímos que a camada péctica, nas sementes de leguminosas com dormência física, é a porção da cutícula *sensu lato* que mais se amplia, tornando-se mais espessa que em outros órgãos da planta e originando o característico estrato mucilaginoso. A camada cuticular e a cutícula propriamente dita são delgadas ou estar ausentes nas sementes de Leguminosae.

Agradecimentos

As autoras agradecem a Alison Pelri Menezes e Stéphanie Karoline de Vasconcelos Bonifácio, pelo auxílio na coleta de sementes, e ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (<http://www.microscopia.ufmg.br>) pelo fornecimento de equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica.

Referências

- Arechavaleta-Medina F, Snyder HE (1981) Water imbibition by normal and hard soybeans. *Journal of the American Oil Chemists Society* 58:976-979
- Baskin CC, Baskin JM (2014) *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, Academic Press

- Baskin JM, Baskin CC, Li X (2000) Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology* 15:139-152
- Boesewinkel FD, Bouman F (1984) The seed: structure. In: BM Johri, ed. Embryology of angiosperms. Berlin: Springer Verlag, 567- 610
- Briggs CL, Morris EC, Ashford AE (2005) Investigations into seed dormancy in *Grevillea linearifolia*, *G. buxifolia* and *G. Sericea*: Anatomy and histochemistry of the seed coat. *Annals of Botany* 96: 965-980
- Corner EJH (1951) The leguminous seed. *Phytomorphology* 1:117-150
- Corner EJH (1976) The seeds of dicotyledons. Cambridge University Press, Cambridge
- Crang R, Lyons-Sobaski S, Wise R (2018) Plant anatomy: a concept-based approach to the structure of seed plants. Cham: Springer, Switzerland
- Evert R.F (2013) Anatomia das plantas de Esau: meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento. Blucher, São Paulo
- Fahn A (1990) Plant anatomy. 4th edn, Pergamon Press, Oxford
- Gunn CR (1981) Seeds of the Leguminosae. In Polhill RM, Raven PH (Ed.) Advances in legume systematics. Part 2. Kew, Crown Copyright, pp 913-926
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138
- Ma F, Cholewa E, Mohamed T, Peterson CA, Gijzen M (2004) Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coat with their permeability to water. *Annals of Botany* 94:213-228
- Magalhães CR, Oliveira DMT (2020) Testa structure in *Erythrina speciosa* (Leguminosae): the role of the mucilaginous stratum in the acquisition of physical dormancy. *Acta Botanica Brasilica* 34:592-598
- Magalhães CR, Garcia QS, Oliveira DMT (2021). Post-dispersion humidity condition alters the surface of the testa and the proportion of seeds with physical dormancy in *Erythrina speciosa*. *Seed Science Research* 31:149-156

- Manning JC, van Staden J (1985) The development and ultrastructure of the testa and tracheid bar in *Erythrina lysistemon* Hutch. (Leguminosae: Papilionoideae). *Protoplasma* 129:157-167
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59:368-373
- Oliveira DMT, Paiva EAS (2005) Anatomy and Ontogeny of *Pterodon emarginatus* (FABACEAE: FABOIDEAE) Seed. *Brazilian Journal of Biology* 65: 483-494
- Paiva EAS, Pinho SZ, Oliveira DMT (2011) Large plant samples: how to process for GMA embedding? In: Chiarini-Garcia H, Melo RCN (Eds.) *Light microscopy: methods and protocols*. *Methods in molecular biology* 689, NJ, Humana Press., Totowa, pp 37-49
- Reynolds ES (1963) The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy *Journal of Cell Biology* 17: 208-212
- Roland JC (1978) General preparations and staining of thin sections In: Hall JL (Ed.), *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*, Elsevier, New York
- Watson ML (1958) Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 4:475-478
- Werker E (1997) *Seed anatomy*. Gebrüder Borntraeger, Berlin
- Yeats TH, Rose JKC (2013) The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology* 163:5-20.

Figura 1: Tegumentos do óvulo e da semente de *Erythrina speciosa*, nos vários estádios de desenvolvimento (secções transversais em microscopia de luz). (A) Estádio I, com tegumento externo contíguo ao tegumento interno. (B-E) Estádio II. (B) Amostra II, vista geral. (C-E) Amostra III. (C) Vista geral. (D) Detalhe da exotesta e das camadas adjacentes da mesotesta. (E) Detalhe das camadas internas da mesotesta e da endotesta, justapostas ao tégmen. (F-K) Estádio III. (F-H) Amostra IV. (F) Vista geral. (G) Detalhe da exotesta paliçádica uniestratificada e da camada hipodérmica da mesotesta em alongamento. (H) Detalhe da porção interna da testa e do tégmen. (I-K) Amostra V. (I) Vista geral. (J) Detalhe da exotesta paliçádica e da camada hipodérmica da mesotesta, que já constituiu células em ampulheta. (K) Detalhe da região interna da testa, mostrando apenas resíduos do tegumento interno. (L) Estádio V, mostrando a testa da semente madura. Ponta de seta, linha lúcida; seta, compostos fenólicos; ed, endotesta; et, exotesta; mt, mesotesta; te, tegumento externo; tg, tégmen; ti, tegumento interno; tt, testa

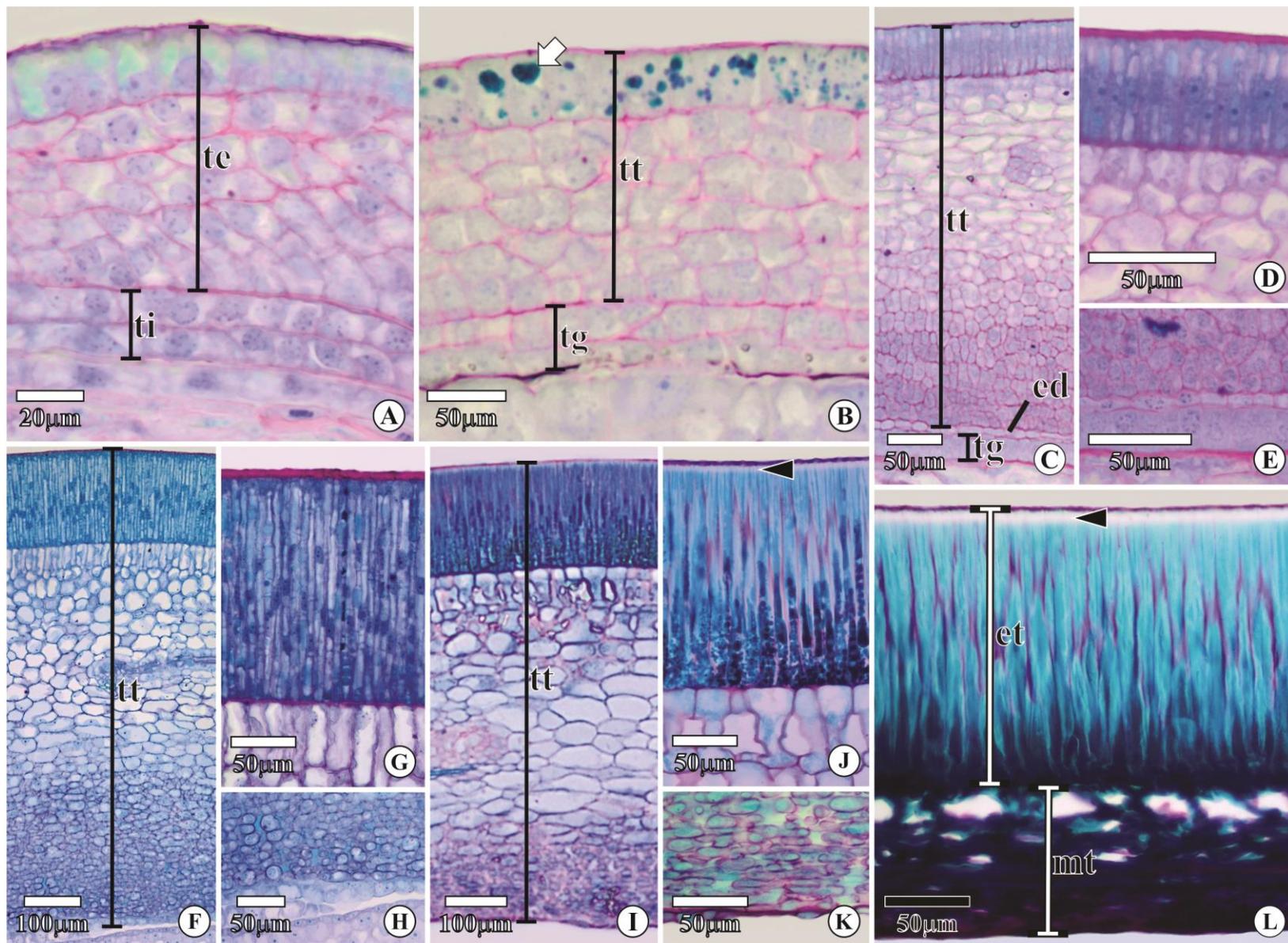


Figura 2: Paliçada de sementes de *Erythrina speciosa* no estágio IV (secções transversais em microscopia eletrônica de transmissão). (A) Quarto apical das células paliçádicas. (B) Detalhe da face periclinal externa da paliçada, mostrando a cutícula propriamente dita e o estrato mucilaginoso. (C) Detalhe no protoplasto da célula paliçádica. Ponta de seta, vacúolo com conteúdo eletrondenso; cu, cutícula propriamente dita; di, dictiossomas; em, estrato mucilaginoso; pp, parede primária; pl, plastídio; seta branca, protoplastos; seta preta, lamela mediana; va, vacúolo; ve, vesículas.

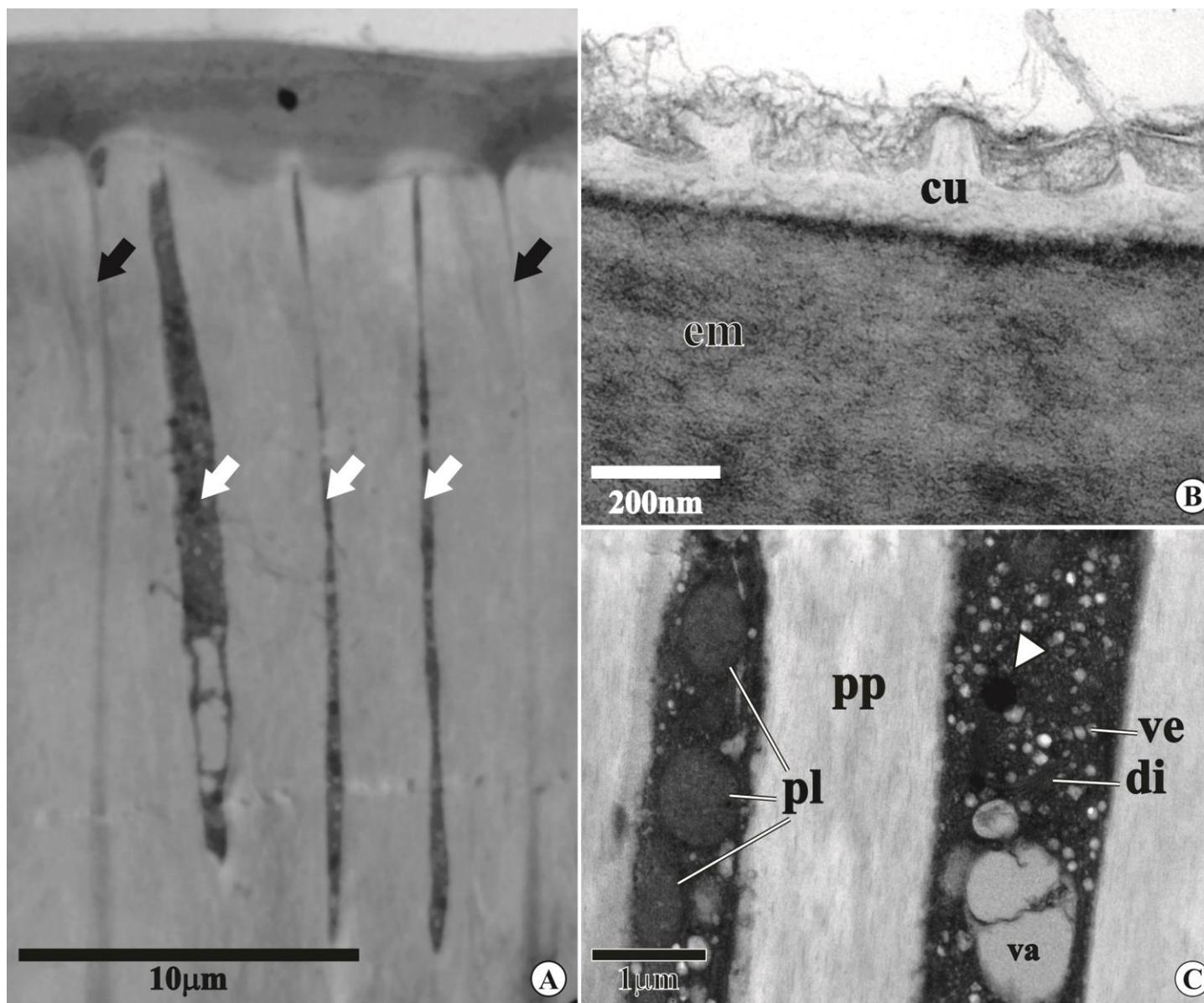
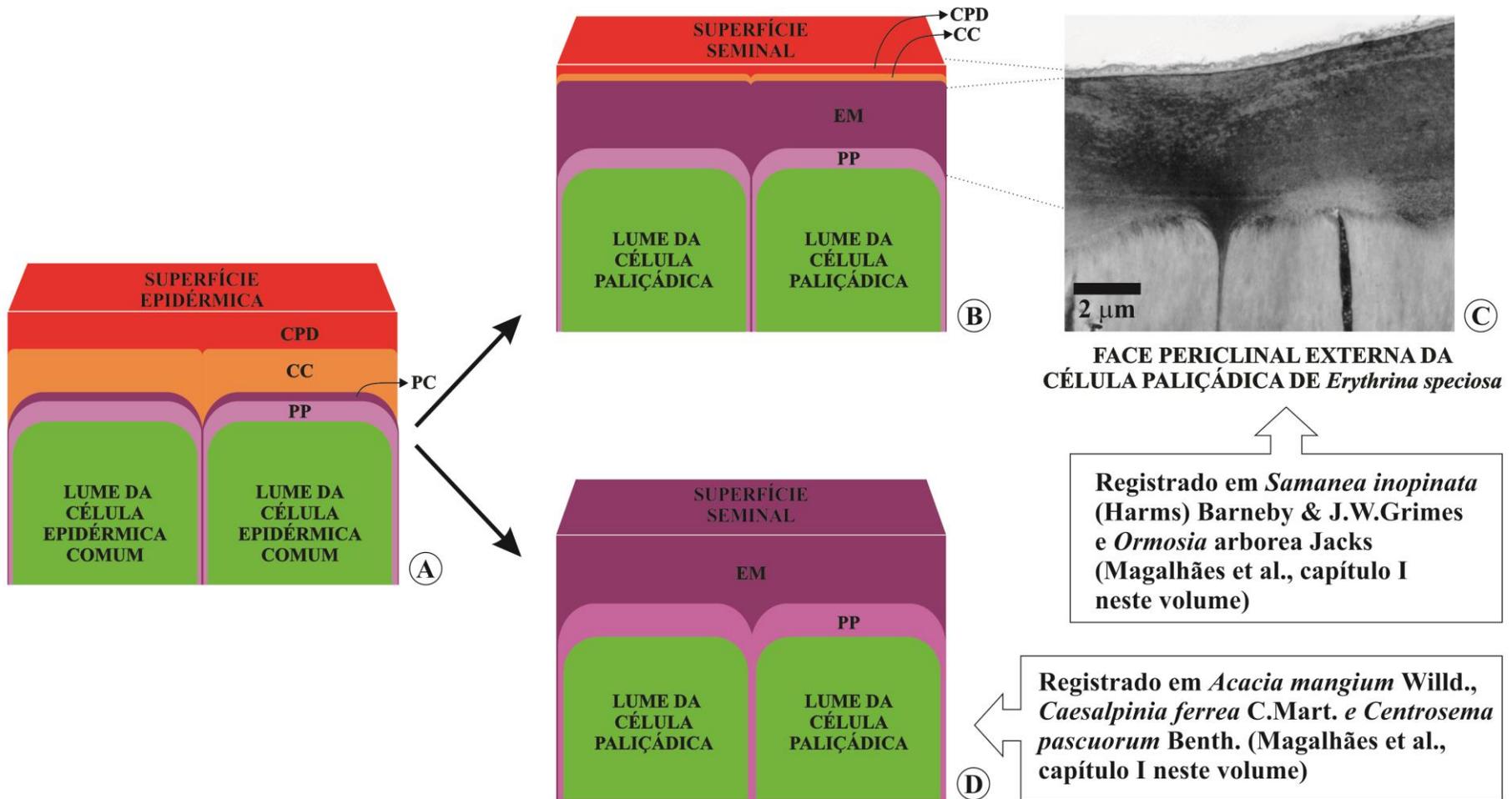


Figura 3: Hipótese interpretativa de variações da estrutura cuticular. (A) Diagrama da estrutura da cutícula *sensu lato*, como encontrada em órgãos como lâminas foliares (escala não considerada). (B) Diagrama da estrutura da cutícula propriamente dita e estrato mucilaginoso encontrados em sementes de *Erythrina speciosa* (escala não considerada). (C) Região apical de células paliçádicas da testa de *E. speciosa*, vista em microscopia eletrônica de transmissão. (D) Diagrama da estrutura do estrato mucilaginoso, como observados em sementes de Leguminosae por Magalhães et al. (Capítulo I neste volume).



CAPÍTULO III

A disponibilidade hídrica pré e pós-dispersão influencia – ou interfere - na dormência física de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.?

Manuscrito apresentado segundo as normas do periódico *Acta Botanica Brasilica*

Short communications

A disponibilidade hídrica pré e pós-dispersão influencia – ou interfere - na dormência física de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.?

Camila Ribeiro Magalhães¹; Queila de Souza Garcia¹; Décio Karam²; Denise Maria Trombert de Oliveira¹

1 Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

2 Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil

Autor correspondente: E-mail: magalhaesribeiroc@gmail.com

Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

Telefone: 55 31 3409-3059

RESUMO

Sementes com dormência física são impermeáveis à água devido a estruturas diferenciadas no tegumento seminal. A ocorrência e o percentual de sementes com dormência física são influenciados pelo ambiente, sendo a disponibilidade hídrica um fator importante. Em espécies de Papilionoideae (Leguminosae), por exemplo, tem sido documentado que sementes desenvolvidas em ambiente seco têm maior percentual de sementes impermeáveis que as desenvolvidas em ambiente úmido. Além disso, a disponibilidade hídrica do ambiente de armazenamento pode influenciar na aquisição ou quebra da dormência física após a dispersão. A relação do ambiente de desenvolvimento das sementes e a aquisição de dormência física pré-dispersão é conhecida, mas a influência desse fator na aquisição de dormência física pós-dispersão ainda não é bem compreendida. Diante disso, no presente trabalho buscamos entender essa relação, utilizando sementes de *Vigna unguiculata*, espécie herbácea de Papilionoideae. Para tal, indivíduos foram cultivados com e sem estresse hídrico e avaliados quanto ao teor de umidade, percentuais de germinação e de dormência; foram também realizadas análises estruturais da testa. As avaliações foram realizadas em sementes recém-colhidas e armazenadas. Não houve diferenças entre os tratamentos de cultivo, o que indica que o estresse aqui experimentado não foi suficiente para indução da dormência física. O armazenamento seco induziu aumento do percentual de dormência física. Não foram observadas diferenças anatômicas tegumentares entre sementes dormentes e não dormentes. Análises de micromorfologia de superfície demonstraram que as sementes permeáveis apresentaram pequenas rachaduras superficiais, não observadas nas sementes impermeáveis, o que já foi relatado para outras espécies da subfamília.

Palavras-chave: Estrato mucilaginoso, estresse hídrico, impermeabilidade, Leguminosae, Papilionoideae, testa

Sementes com dormência física são impermeáveis à água, como resultado da estrutura do tegumento seminal ou do pericarpo, no caso de espécies com fruto indeiscente (Baskin e Baskin, 2014). Em geral, sementes impermeáveis têm no envoltório seminal uma ou duas camadas de células paliçádicas com as paredes celulares impregnadas por substâncias hidrofóbicas (Werker, 1997; Baskin e Baskin, 2014). A ocorrência e o percentual de sementes impermeáveis que um indivíduo produz são controlados geneticamente, mas também podem ser influenciados por fatores ambientais como temperatura, disponibilidade hídrica e umidade relativa do ar durante o desenvolvimento das sementes (Baskin et al., 2000; Baskin e Baskin, 2014; Jaganathan, 2016, Magalhães et al. 2021).

As sementes das espécies da família Leguminosae têm estrutura tegumentar peculiar, formada externamente pela exotesta, constituída de uma camada de células em paliçada, e pela mesotesta, composta por células em ampulheta e parenquimáticas; a endotesta pode ser indistinta ou também diferenciada em células em ampulheta (Corner, 1951; 1976; Gunn, 1981). Essa anatomia da testa é típica da família e é considerada a responsável pela dormência física de suas sementes (Werker, 1997; Baskin e Baskin, 2014). Todavia, comparações entre sementes dormentes e não dormentes não têm revelado variações anatômicas da testa (Ma et al., 2004; Smýkal et al., 2014; Magalhães e Oliveira, 2020; Magalhães et al., 2021). Por outro lado, há relatos de que, nas regiões identificadas como *water gap*, a camada mais superficial da testa das sementes dormentes apresenta pequenas aberturas por onde a água entra durante a embebição (Ma et al., 2004; Smýkal et al., 2014; Magalhães e Oliveira, 2020; Magalhães et al., 2021).

A influência da disponibilidade hídrica durante o desenvolvimento seminal na dormência física é documentada em Leguminosae. Em *Sophora alopecuroides* (Hu et al., 2008) e *Erythrina speciosa* (Molizane et al., 2018; Magalhães et al., 2021), espécies da subfamília Papilionoideae, a produção de sementes impermeáveis ocorreu, em maior proporção, quando expostas a ambientes mais secos que aquelas desenvolvidas em ambientes mais úmidos. Isso tem sido relacionado a estrutura do hilo das Papilionoideae (Hyde, 1954). Há, nessa região, uma camada extra de paliçada, a contrapaliçada, cujas paredes celulares são bastante espessadas. A dupla paliçada é interrompida pela fissura hilar, localizada externamente à barra de traqueídes, que é formada por traqueídes curtas e tem seção transversal obovada (Corner, 1951; Hyde, 1954; Gunn, 1981).

Segundo Hyde (1954), o hilo das Papilionoideae funciona como uma válvula higroscópica. Com a diminuição da umidade relativa do ar, ocorre a desidratação das paredes celulares da dupla paliçada, o que leva à abertura da fissura hilar. Com isso, água em forma de vapor passa de dentro para fora da semente, através da barra de traqueídes e da fissura hilar, o que resulta em diminuição do teor de umidade da semente (Hyde, 1954). Dessa forma, o desenvolvimento seminal em ambientes mais secos aumenta o percentual de sementes impermeáveis porque, quanto mais baixo é o teor de umidade, maior é a proporção de sementes com dormência física (Baskin e Baskin, 2014).

O processo de abertura hilar pode ocorrer também após a dispersão, o que possibilita a variação no percentual de sementes com dormência física após o armazenamento como registrado por Magalhães et al. (2021). As autoras demonstraram que o armazenamento de sementes de *Erythrina speciosa* em ambiente seco leva ao aumento na proporção de sementes impermeáveis e o armazenamento em ambiente úmido leva à diminuição. Em *E. speciosa*, aberturas superficiais podem se formar quando

as sementes são armazenadas em ambiente seco e se fechar quando armazenadas em ambiente úmido (Magalhães et al., 2021).

Apesar da relação do ambiente de desenvolvimento das sementes e a aquisição de dormência física pré-dispersão ser conhecida, a influência desse fator na aquisição de dormência física pós-dispersão ainda não é bem compreendida, principalmente no que diz respeito a alterações estruturais que podem influenciar a impermeabilidade das sementes. Diante disso, utilizando como objeto de estudo *Vigna unguiculata*, uma espécie de Papilionoideae com ciclo de vida curto e em que a dormência física é relatada, o objetivo do presente trabalho foi investigar se a disponibilidade hídrica durante o desenvolvimento seminal influencia na proporção de sementes com dormência física. Além disso, buscamos averiguar se o estresse hídrico durante o desenvolvimento da semente influencia também a aquisição de dormência física pós-dispersão e como a estrutura da testa pode explicar essas possíveis variações.

Para tal, sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. variante Punjante foram obtidas junto à Embrapa-Semiárido, Petrolina, Pernambuco, Brasil. Todas as etapas de cultivo descritas a seguir foram realizadas em casa de vegetação na Embrapa-Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil. Para o cultivo, foram utilizados 60 vasos de 3L. Em cada vaso, foram semeadas duas sementes previamente escarificadas. Após emergência, uma das plântulas foi descartada, mantendo a mais vigorosa. Desde a germinação até o momento em que os frutos começaram a se desenvolver, as plantas foram mantidas com 80% da capacidade de campo (CC). Após o desenvolvimento dos frutos, mas antes do início do processo de dessecação das sementes (na maturação fisiológica), os indivíduos foram separados em dois tratamentos, com 30 indivíduos cada: um no qual foi mantida irrigação de forma a assegurar 40% CC; e outro no qual foi mantida irrigação de forma a

assegurar 80% CC. Para ambos os tratamentos, a coleta das sementes foi realizada após a secagem completa dos frutos.

As avaliações foram realizadas nas sementes provenientes dos dois tratamentos de cultivo (40% CC e 80% CC). O desenho experimental está representado na Fig. 1. As avaliações iniciais foram realizadas com sementes recém-colhidas (amostras 40 e 80); as avaliações intermediárias foram realizadas com sementes armazenadas por três semanas em ambiente seco e por sementes armazenadas por três semanas em ambiente úmido (amostras 40S, 40U, 80S e 80U); e as avaliações finais foram realizadas com sementes armazenadas por seis semanas em ambiente seco; sementes armazenadas por seis semanas em ambiente úmido; sementes armazenadas por três semanas em ambiente seco, seguido de três semanas em ambiente úmido; e sementes armazenadas por três semanas em ambiente úmido, seguido de três semanas em ambiente seco (amostras 40SS, 40UU, 40SU, 40US, 80SS, 80UU, 80US e 80SU).

Para armazenar as sementes em ambiente seco ou úmido, foram utilizados dessecadores sem vacuômetro. A umidade relativa do ambiente seco foi controlada pelo uso de sílica gel e foi mantida em, aproximadamente, 40%. A umidade relativa do ambiente úmido foi controlada por papel filtro embebido em água destilada e mantida em, aproximadamente, 80% de umidade. A umidade relativa do interior dos dessecadores foi verificada semanalmente, utilizando termo-higrômetro Minipa MT-241.

Para identificação do teor de umidade (U), cinco repetições de 10 sementes foram inicialmente pesadas e acondicionadas em estufa a 105°C. Após 24 horas de armazenamento, as amostras foram pesadas novamente e calculado o teor de umidade de acordo com Brasil (2009).

Para determinação dos percentuais de germinação (%G) e de dormência física (%D) das sementes, cinco repetições de 15 sementes intactas foram levadas para germinação em gerbox, papel filtro e água destilada. As amostras foram mantidas a 25°C (fotoperíodo de 12 horas). As avaliações foram diárias e mantidas por cinco dias, quanto todas as sementes permeáveis já haviam germinado. Ao final, foram computados o percentual de sementes germinadas e sementes com dormência física (aquelas que não embeberam). As sementes impermeáveis foram escarificadas e levadas para germinação para verificar a viabilidade.

A identificação do *water gap* foi realizada a partir de 10 sementes foram embebidas em solução de azul de metileno a 1% por 12 h (Melo-Pinna et al. 1999). As sementes embebidas foram avaliadas e documentadas externamente e, também, seccionadas manualmente com navalha de aço ao longo dos planos longitudinal e transversal para examinar as regiões lateral, hilo, micrópila, calaza, rafe e antirrafe.

Para análise anatômica, as sementes foram seccionadas com o auxílio de navalha de aço descartável. Os fragmentos foram, então, infiltrados e incluídos em (2-hidroxietil)-metacrilato Leica, sendo o processamento feito em freezer por 15 dias (Paiva et al., 2011, modificado). Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo Zeiss Hyrax M40, obtendo-se secções com 10 µm de espessura. A coloração foi feita com azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (O'Brien et al., 1964, modificado). As lâminas foram montadas com água destilada e lamínula, e analisadas e documentadas em fotomicroscópio Olympus U-TV0.5XC-3.

A micromorfologia de superfície foi realizada a partir de observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas apenas na análise final. Inicialmente, as sementes foram acondicionadas em estufa a 60°C por 24 horas para

desidratação completa. Posteriormente, foram fixadas em suportes metálicos, utilizando massa adesiva epóxi para adequar o posicionamento das amostras e cola de grafite para garantir a condutividade do material. O posicionamento das amostras foi feito de forma a visualizar a região identificada como *water gap*. As amostras foram metalizadas com 10 nm de ouro em aparelho Balzers SCD 050. As análises foram realizadas em MEV Quanta FEI 200, no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, produzindo-se imagens digitais.

Os dados de teor de umidade, (%G) e (%D) foram submetidos a testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Brown-Forsythe), utilizando-se o programa estatístico JMP.5. Os dados de %G e %D foram transformados em arco seno da $\sqrt{\text{porcentagem}}$. Os dados normais e homogêneos foram submetidos à ANOVA, seguido do teste de Tukey a 5% de significância.

A avaliação inicial não revelou diferenças significantivas em relação do teor de umidade (TU) e, conseqüentemente, de dormência física entre as sementes provenientes de plantas cultivadas em 40% CC e 80% CC (Tabela 1). Em ambos os casos, todo o lote examinado estava composto por 100% de sementes permeáveis à água. Isso indica que o estresse hídrico imposto não representou um fator determinante para a aquisição de dormência física em *V. unguiculata*. Além disso, nas avaliações intermediária e final, não foram observadas diferenças entre os resultados dos dois tratamentos de cultivo.

Na avaliação intermediária, o armazenamento em ambiente seco por três semanas (40S e 80S) ocasionou a diminuição do teor de umidade das sementes e o aumento do percentual de sementes com dormência física (Tabela 1). Não foram observadas alterações do TU e do percentual de dormência física nas sementes expostas ao tratamento úmido por três semanas (40U e 80U) (Tabela 1).

Na avaliação final, sementes provenientes dos tratamentos 40SS e 80SS não apresentaram diferença significativa no TU, enquanto as sementes submetidas aos tratamentos 40SU, 80SU, 40UU e 80UU apresentaram aumento do TU (Tabela 1). Após transferência do ambiente úmido para o ambiente seco, sementes provenientes dos dois tratamentos de cultivo (40US e 80US) apresentaram diminuição do teor de umidade e aumento do percentual de sementes com dormência física (Tabela 1). O aumento da proporção de sementes impermeáveis após exposição a ambiente seco é consequência da sua desidratação (Jaganathan et al., 2019; Magalhães et al., 2021). A diminuição do TU é esperada porque, nas espécies de Papilionoideae (Leguminosae), caso de *V. unguiculata*, o hilo atua como válvula higroscópica. Sempre que a umidade relativa do ar diminui, o hilo se abre e a água do interior das sementes sai em forma de vapor (Hyde, 1954). Esse processo de perda de água acontece antes da dispersão da semente, ao final do último estágio de desenvolvimento (Hyde, 1954; Werker, 1997; Baskin e Baskin, 2014) e, como observado aqui e em outros estudos (Jaganathan et al., 2019; Magalhães et al., 2021), pode acontecer também após a dispersão.

Em sementes de Leguminosae (Caesalpinioideae e Papilionoideae), o armazenamento em ambiente úmido pode ocasionar a quebra de dormência física (van Klinken et al., 2008; Renzi et al., 2016; Magalhães et al., 2021). Para *V. unguiculata*, no entanto, não observamos diminuição significativa do percentual de sementes impermeáveis ao final do tratamento úmido. Possivelmente, o período de exposição ao ambiente úmido experimentado no presente estudo não foi suficiente para que houvesse quebra de dormência considerável, apesar de ser suficiente para tornar parte das sementes impermeáveis, como observado no armazenamento em ambiente seco.

A testa da semente madura de *V. unguiculata* tem a estrutura típica das sementes ortodoxas da família, sendo formada pela exotesta, composta por células em paliçada e pela mesotesta, constituída por uma camada de células em ampulheta e várias camadas de células parenquimáticas colapsadas. Nossos resultados demonstraram que o *water gap* está localizado na antirrafe (Fig. 2), visto que secções longitudinais da semente embebidas em azul de metileno mostram que essa é a região por onde a água entra inicialmente. As análises anatômicas desta região não revelaram diferenças estruturais entre sementes dormentes (Fig. 3A, B) e não dormentes (Fig. 3C, D). Resultados semelhantes foram observados em outras leguminosas, como *Erythrina speciosa* (Molizane et al., 2018; Magalhães e Oliveira, 2020; Magalhães et al., 2021) e *Glycine max* (Arechavaleta-Medina e Snyder, 1981; Ma et al., 2004). Nessas espécies, análises de micromorfologia de superfície revelaram que pequenas rachaduras superficiais são suficientes para tornar a semente permeável (Ma et al., 2004; Smýkal et al., 2014; Magalhães e Oliveira, 2020; Magalhães et al., 2021). De maneira similar, nossas análises mostraram que as sementes de *V. unguiculata* permeáveis à água (Fig. 4A, B) têm pequenas rachaduras superficiais que não ocorrem nas sementes com dormência física (Fig. 4C, D), indicando que o estrato mucilaginoso é o protagonista na manutenção da impermeabilidade também na espécie aqui estudada.

Segundo Werker (1997), ao final do desenvolvimento seminal das Leguminosae, substâncias pécticas presentes na testa passam por alterações químicas e se tornam duras e hidrofóbicas. A autora afirma que é a presença dessas substâncias na face periclinal externa das paredes celulares e no estrato mucilaginoso da testa que confere a dormência física às leguminosas. Nossos resultados, somados aos observados em outras leguminosas, demonstram que a dormência física é garantida pela presença do estrato

mucilaginoso íntegro e sem quaisquer rachaduras, pelo menos nas espécies estudadas até o momento. Possivelmente, as camadas celulares com paredes espessas (na exo e mesotesta) sejam importantes na manutenção da rigidez do envoltório seminal e proteção da semente, mas não revelam papel na impermeabilidade que garante a dormência física. Todavia, para confirmação desta hipótese, bem como para verificar a frequência do processo na família, estudos adicionais se fazem necessários.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (<http://www.microscopia.ufmg.br>), pelo processamento de amostras, uso de equipamentos e obtenção de imagens. Agradecem, também, ao Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos, da Embrapa-Semiárido, que gentilmente cedeu as sementes de *Vigna unguiculata*, a Clébio Pereira Ferreira, que ajudou na obtenção das mesmas e à Embrapa Milho e Sorgo pela estrutura e desenvolvimento dos experimentos de cultivo e em especial a Fábio Souza e a Melina Navarro Dabéss, por propiciarem esse desenvolvimento.

Referências

- Arechavaleta-Medina F, Snyder HE. 1981. Water imbibition by normal and hard soybeans. *Journal of the American Oil Chemists Society* 58: 976-979.
- Baskin CC, Baskin, JM. 2014. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, Academic Press.
- Baskin JM, Baskin CC, Li X. 2000. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology* 15: 139-152.
- Brasil. 2009. *Regras para análise de sementes*. Brasília, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária.

- Corner EJH. 1951. The leguminous seed. *Phytomorphology* 1: 117-150.
- Corner EJH. 1976. *The seeds of dicotyledons*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Gunn CR. 1981. Seeds of the Leguminosae. In: Polhill RM, Raven PH. (eds.) *Advances in legume systematics. Part 2*. London, UK, Royal Botanical Gardens Kew, Crown Copyright. p. 913-926.
- Hu XW, Wu YP, Wang YR. 2009. Different requirements for physical dormancy release in two populations of *Sophora alopecuroides* relation to burial depth. *Ecol Res* 24: 1051-1056.
- Hyde EOC. 1954. The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to the ripening of the seed and the permeability of the testa. *Annals of Botany* 18: 241-256.
- Jaganathan GK. 2016. Influence of maternal environment in developing different levels of physical dormancy and its ecological significance. *Plant Ecology* 217: 71-79.
- Jaganathan GK, Jiajin Li J, Yang Y *et al.* 2019. Complexities in identifying seed storage behavior of hard seed-coated species: a special focus on Lauraceae. *Botany Letters* 166: 70-79.
- Ma F, Cholewa E, Mohamed T, Peterson CA, Gijzen M. 2004. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coat with their permeability to water. *Annals of Botany* 94: 213-228.
- Magalhães CR, Oliveira DMT. 2020. Testa structure in *Erythrina speciosa* (Leguminosae): the role of the mucilaginous stratum in the acquisition of physical dormancy. *Acta Botanica Brasilica* 34: 592-598.

- Magalhães CR, Garcia QS, Oliveira DMT. 2021. Post-dispersion humidity condition alters the surface of the testa and the proportion of seeds with physical dormancy in *Erythrina speciosa*. *Seed Science Research* 1-8.
- Melo-Pinna GFA, Neiva MSM, Barbosa DCA. 1999. Estrutura do tegumento seminal de quatro espécies de Leguminosae (Caesalpinioideae), ocorrentes numa área de caatinga (PE Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 22: 375-379.
- Molizane DM, Julio PGS, Carmello-Guerreiro SM, Barbedo CJ. 2018. Physical, physiological and anatomical changes in *Erythrina speciosa* Andrews seeds from different seasons related to the dormancy degree. *Journal of Seed Science* 40: 331-341.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Paiva EAS, Pinho SZ, Oliveira DMT. 2011. Large plant samples: how to process for GMA embedding? *Methods in Molecular Biology* 689: 37-49.
- Renzi JP, Chantre GR, Cantamutto MA. 2016. Effect of water availability and seed source on physical dormancy break of *Vicia villosa* ssp. *villosa*. *Seed Science Research* 26: 254-263.
- Smýkal P, Vernoud V, Blair MW, Soukup A, Thompson RD. 2014. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science* 5: 351.
- van Klinken RD, Lukitsch B and Cook C. 2008. Interaction between seed dormancy-release mechanism, environment and seed bank strategy for a widely distributed

perennial legume, *Parkinsonia aculeata* (Caesalpinaceae). *Annals of Botany* 102:
255-264.

Werker E. 1997. *Seed anatomy*. Berlin, Gebrüder Borntraeger.

Tabela 1: Teor de umidade (%), percentual de germinação e percentual de dormência física (média \pm DP) de sementes recém colhidas e após os tratamentos de armazenamento nos três momentos de avaliação: inicial, intermediária e final. Os números 40 e 80 referem-se à porcentagem da capacidade de campo e, não seguidos de letra, indicam sementes recém colhidas; números seguidos de uma letra maiúscula indicam sementes armazenadas por três semanas em ambiente seco (S) ou ambiente úmido (U); números seguidos de duas letras maiúsculas indicam sementes armazenadas por: seis semanas em ambiente seco (SS) ou úmido (UU); três semanas em ambiente seco seguidas por três semanas em ambiente úmido (SU); três semanas em ambiente úmido seguidas por três semanas em ambiente seco (US).

Avaliações		Teor de umidade (%)	Percentual de germinação (%)	Percentual de dormência física (%)
Avaliação inicial	40	10,5 \pm 0,2 d	100 \pm 0 a	0 \pm 0 b
	80	11,4 \pm 0,2 cd	100 \pm 0 a	0 \pm 0 b
Avaliação intermediária	40S	5,8 \pm 0,1 f	78,3 \pm 6,4 cd	15 \pm 8,4 a
	40U	11,3 \pm 0,5 cd	100 \pm 0 a	0 \pm 0 b
	80S	6 \pm 0,4 f	86,7 \pm 0 bc	11,7 \pm 3,3 a
	80U	11,8 \pm 0,3 c	100 \pm 0 a	0 \pm 0 b
Avaliação final	40SS	5 \pm 0,1 f	78,3 \pm 6,4 cd	16,7 \pm 8,60 a
	40SU	8,5 \pm 0,9 e	88,3 \pm 6,4 bc	8,3 \pm 3,3 a
	40UU	17,3 \pm 1,3 b	100 \pm 0 a	0 \pm 0 b
	40US	5 \pm 0,1 f	89,3 \pm 3,1 b	9,9 \pm 4,1 a
	80SS	4,9 \pm 0,1 f	66,7 \pm 5,4 d	18,3 \pm 10 a
	80SU	8,4 \pm 1 e	76,7 \pm 13,9 cd	11,7 \pm 10 a
	80UU	19,4 \pm 0,1 a	100 \pm 0 a	0 \pm 0 b
	80US	5,2 \pm 0,1 f	88,3 \pm 3,3 bc	6,7 \pm 0 a

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas (teste de Tukey, $P < 0,05$).

Figura 1: Desenho experimental desenvolvido. Os números 40 e 80 referem-se à porcentagem da capacidade de campo de produção das sementes (não seguidos de letra, indicam sementes recém colhidas). A, armazenamento; S, ambiente seco; U, ambiente úmido (U).

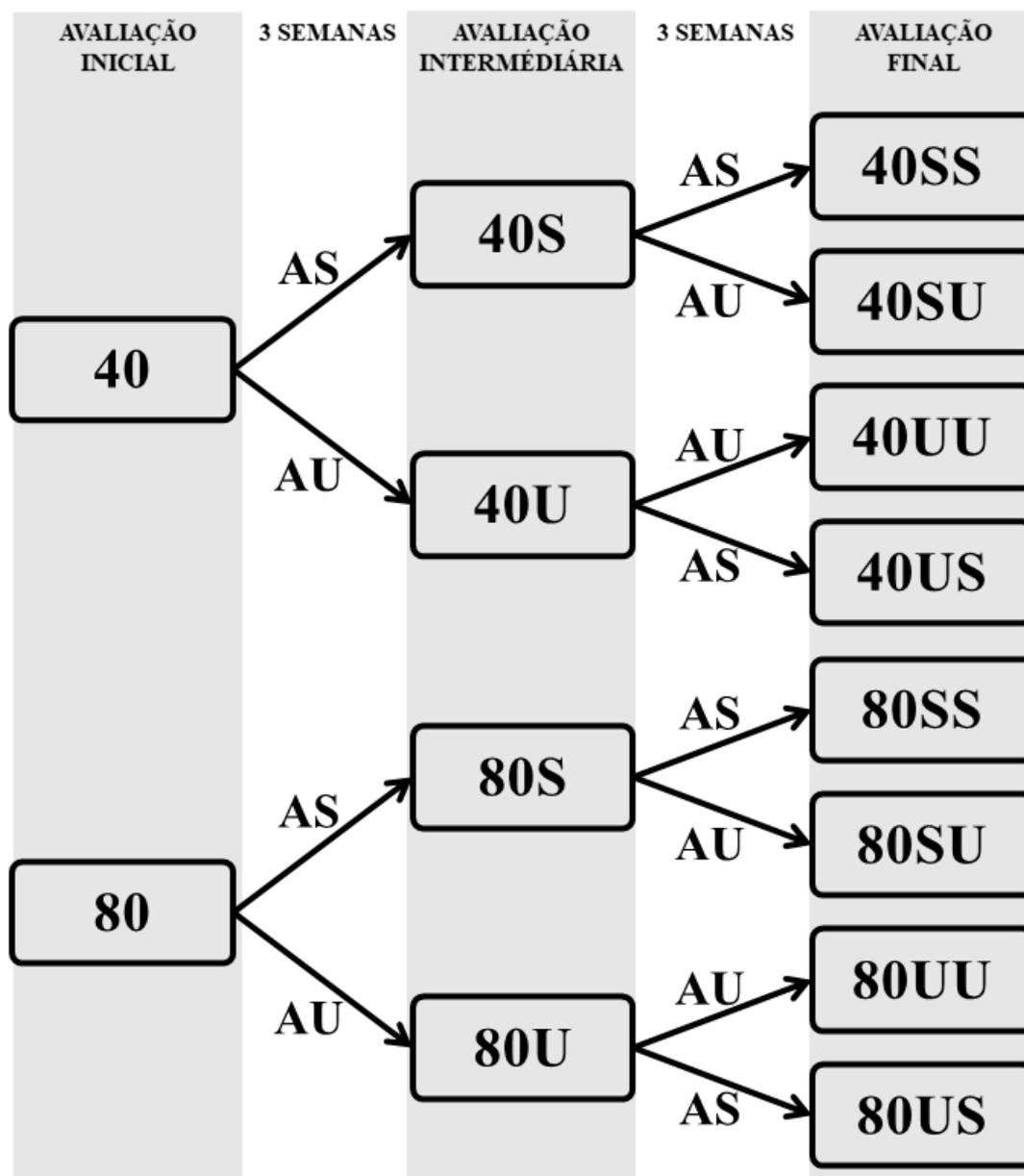


Figura 2: Diagrama da secção longitudinal de semente de *Vigna unguiculata* embebida em azul de metileno, com a identificação da região de entrada de água (*water gap*).

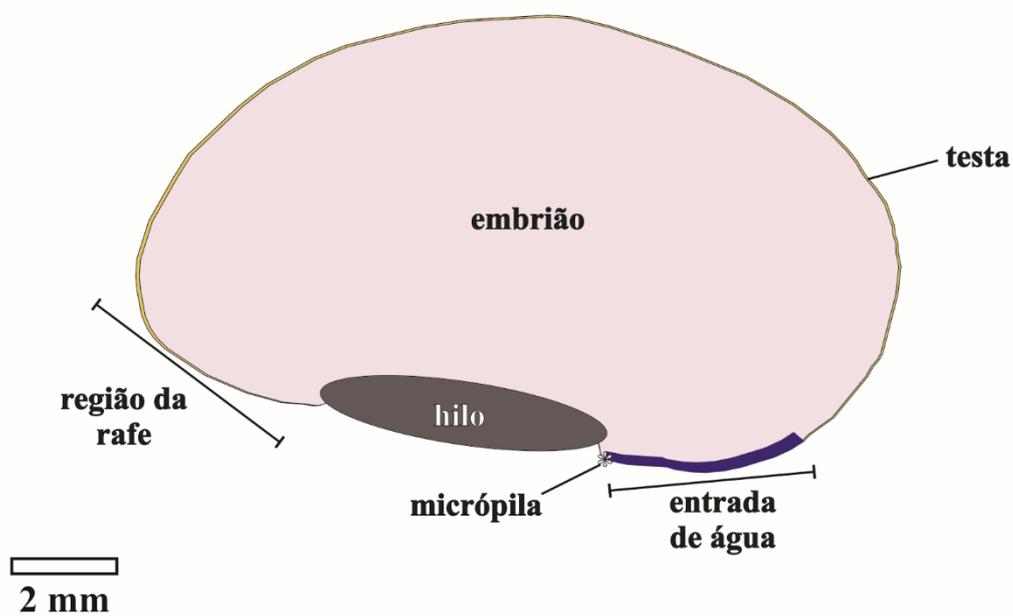


Figura 3: Anatomia da testa de *Vigna unguiculata* na região de antirrafe identificada como *water gap*. **A.** Semente produzida com 40% da capacidade de campo, submetida a seis semanas de armazenamento em ambiente seco (40SS); **B.** Semente produzida com 80% da capacidade de campo, submetida a seis semanas de armazenamento em ambiente seco (80SS); **C.** Semente produzida com 40% da capacidade de campo, submetida a seis semanas de armazenamento em ambiente úmido (40UU); **D.** Semente produzida com 80% da capacidade de campo, submetida a seis semanas de armazenamento em ambiente úmido (80UU). et, exotesta. mt, mesotesta.

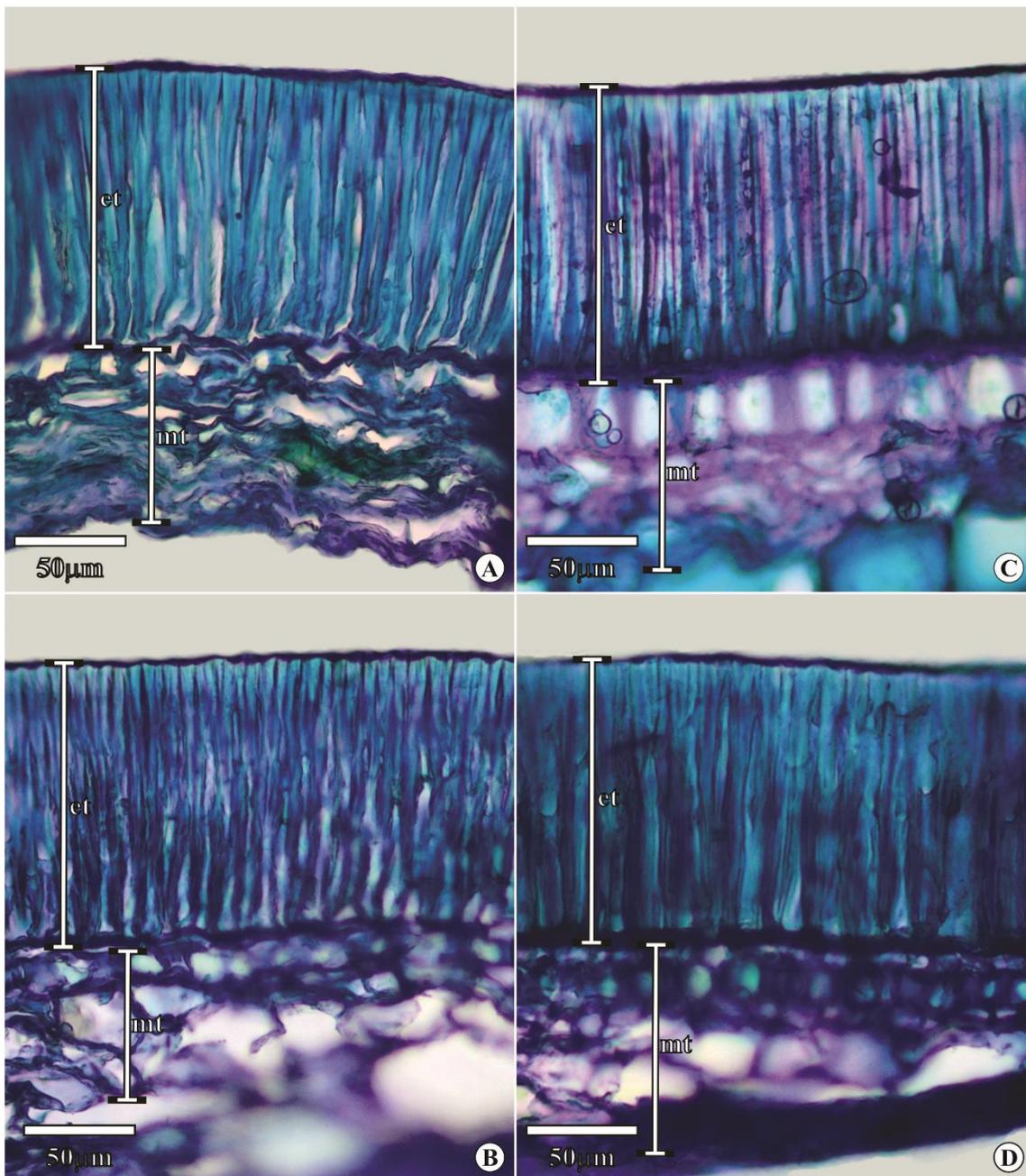
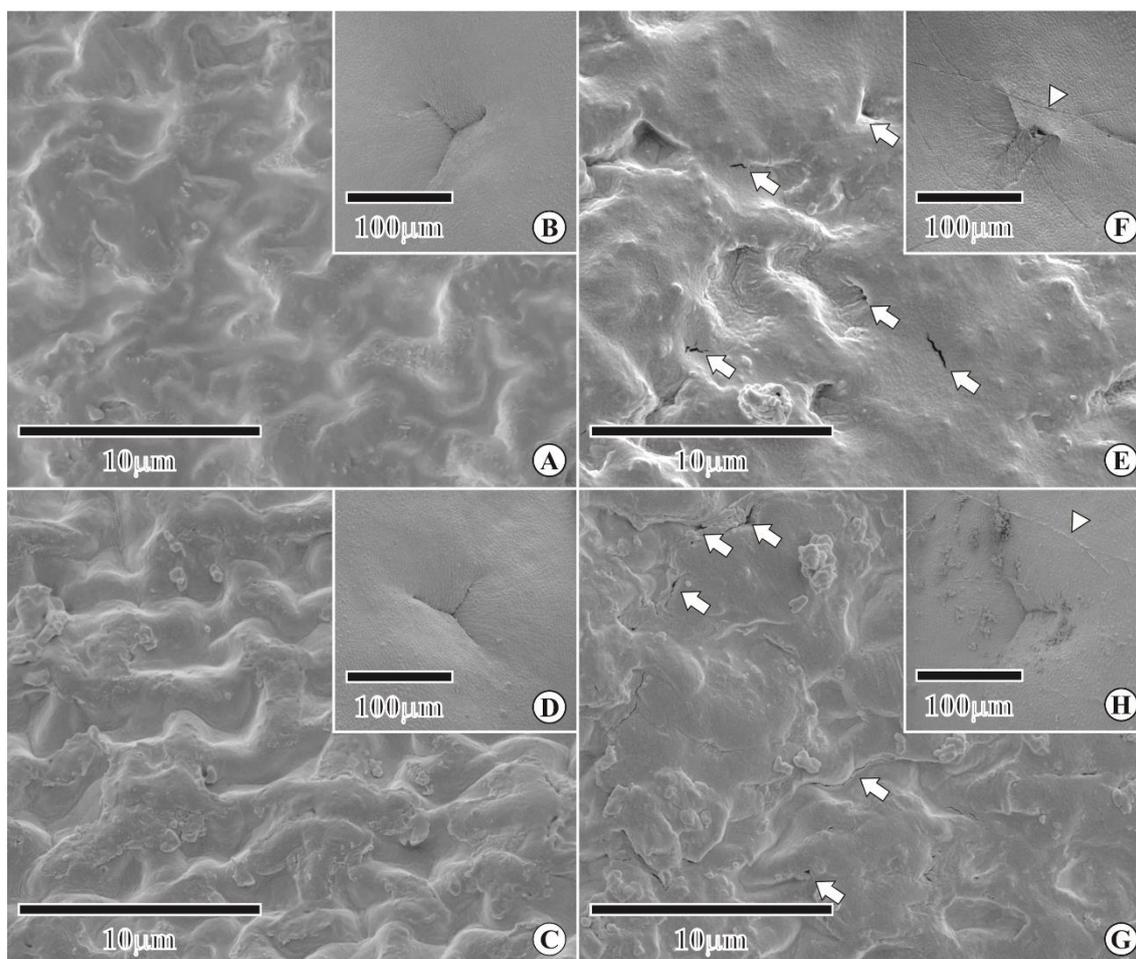


Figura 4: Micromorfologia de superfície de *Vigna unguiculata*. **A.** Antirrafe de semente produzida com 40% da capacidade de campo, submetida a seis semanas de armazenamento em ambiente seco (40SS); **B.** Micrópila de semente 40SS; **C.** Antirrafe de semente produzida com 80% da capacidade de campo, submetida a seis semanas de armazenamento em ambiente seco (80SS); **D.** Micrópila de semente 80SS; **E.** Antirrafe de semente produzida com 40% da capacidade de campo, submetida a seis semanas de armazenamento em ambiente úmido (40UU); **F.** Micrópila de semente 40UU; **G.** Antirrafe de semente produzida com 80% da capacidade de campo, submetida a seis semanas de armazenamento em ambiente úmido (80UU); **H.** Micrópila de semente 80UU. setas, rachaduras superficiais; ponta de seta, hifas de fungo



Capítulo IV

Condição de umidade pós-dispersão altera a superfície da testa e a proporção de sementes com DF em *Erythrina speciosa*

(capítulo publicado no periódico *Seed Science Research*)

Condição de umidade pós-dispersão altera a superfície da testa e a proporção de sementes com DF em *Erythrina speciosa*

Camila R. Magalhães¹, Queila S. Garcia¹ and Denise M. T. Oliveira¹

¹ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Autor de correspondência:

Camila Ribeiro Magalhães,

E-mail: magalhaesribeiroc@gmail.com

PlantSeR - Plant Secretion & Reproduction Lab, Departamento de Botânica, I2-177, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

Fone: 55 31 3409-3029

ORCID:

Camila R. Magalhães: 0000-0003-2100-672X

Denise M. T. Oliveira: 0000-0003-1918-2433

Queila S. Garcia: 0000-0002-7137-788X

Título resumido: Umidade altera DF em *Erythrina speciosa*

Palavras-chave: Armazenamento úmido; armazenamento seco; estrato mucilaginoso; Leguminosae; tegumento seminal; teor de umidade da semente; umidade relativa.

Auxílio financeiro. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES, código 001). Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa do D.M.T. Oliveira (processo 305686/2018-6) e Q.S. Garcia (processo 304387/2016-9).

Resumo

Sementes de Papilionoideae (Leguminosae) perdem água após a dispersão, o que pode aumentar a proporção de sementes impermeáveis (dormência física, DF). Contudo, ainda são desconhecidas as alterações que ocorrem na estrutura da testa durante este processo. O objetivo deste estudo foi investigar como a variação da umidade relativa do ar, no período pós-dispersão, afeta a proporção de sementes com DF em *Erythrina speciosa*. Sementes provenientes de duas populações foram armazenadas em ambientes seco e úmido e submetidas periodicamente a análises fisiológicas (teor de umidade e percentual de embebição e de germinação) e estruturais da testa (microscopia de luz e eletrônica de varredura). Os resultados mostraram que o armazenamento seco resultou em desidratação da semente, aumento da proporção de sementes impermeáveis à água e fechamento de fissuras no estrato mucilaginoso. Em contraste, o armazenamento úmido levou ao aumento do teor de água das sementes, diminuição da proporção de sementes com DF e formação de fissuras. Nós concluímos que, em consequência da variação de umidade do ambiente, ocorrem mudanças na conformação do estrato mucilaginoso das sementes, que alteram a saída de água e conseqüentemente a proporção de sementes impermeáveis. Em ambientes com baixa umidade ocorre a diminuição do seed teor de umidade e o fechamento das fissuras no estrato mucilaginoso e, conseqüentemente, o aumento da proporção de sementes impermeáveis. Por outro lado, a alta umidade relativa do ar aumenta o teor de umidade da semente e a formação de fissuras superficiais, por onde a água entra durante a embebição, ocasionando a diminuição da proporção de sementes com DF.

Link de acesso à publicação:

<https://doi.org/10.1017/S0960258520000495>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Descrita há várias décadas, a estrutura da testa das Leguminosae pode, por muitos, ser considerada um assunto encerrado. O presente trabalho, todavia, traz questões importantes que nos mostram que, apesar das contribuições relevantes dos trabalhos clássicos, ainda há muito a se compreender.

Apontamos aqui, equívocos recorrentes no que diz respeito à denominação das camadas celulares que compõem a testa. Macro esclereídes e osteo esclereídes são termos muito utilizados para nomear células de parede espessada que deveriam ser, mas não necessariamente são, impregnadas por lignina, componente básico das paredes celulares de esclereídes. Essa denominação controversa, além de propiciar a disseminação de dados incorretos, pode levar a erros de interpretação de resultados.

Ainda no escopo estrutural, vimos que a cutícula *sensu lato*, em Leguminosae, pode ter uma composição química diferente das cutículas encontradas em órgãos vegetais como as folhas, podendo, inclusive, não conter lipídios em sua composição. Na família, a camada mais externa é, frequentemente, composta apenas por substâncias pécnicas e, por isso, propomos utilizar a denominação “estrato mucilaginoso”, termo já adotado, por alguns autores, para designar camadas consideradas subcuticular e que reflete a natureza química da camada.

Nossos resultados demonstram que o estrato mais superficial da testa é essencial para aquisição e manutenção da dormência física em espécies de Leguminosae.

Longe de esgotar os debates sobre a caracterização das células que compõem a testa e suas funções, nossos resultados apenas pretendem iniciar as discussões acerca do assunto. Como perspectivas futuras, o presente trabalho pode ser desdobrado em investigações que:

- busquem compreender, com maior profundidade, a estrutura e composição química da camada mais superficial da testa, visto que ela se mostrou como uma região de grande importância para a dormência físicas em Papilionoideae;
- ampliem o conhecimento sobre estrutura e composição química do estrato mucilaginoso e cutícula em maior número de espécies de todas as subfamílias;
- verifiquem as funções das células de parede espessa da testa, paliçada e células em ampulheta, quando for o caso;

- apurem se o estrato mucilaginoso tem, em espécies das outras subfamílias de Leguminosae, a mesma importância para manutenção da impermeabilidade aqui demonstrada para Papilionoideae.