

QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Brachiarias* spp. APÓS MASTIGAÇÃO SIMULADA, DIGESTÃO ÁCIDO ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO *in vitro*

*Fabiana Gonçalves Santos Bolzan*¹, *Bruno Borges Deminicis*², *Thiago Neves Pereira Valente*³,
*Érico da Silva Lima*⁴

¹Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). 29500-000, Alegre, ES, Brasil. fabiana_bolzan@hotmail.com

²Universidade Federal do Sul da Bahia (UFSB).45613-204, Itabuna, BA, Brasil. brunodeminicis@gmail.com

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFGoiano).73.900-000, Posse, GO, Brasil.
tiago.valente@ifgoiano.edu.br

⁴Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU), 05606-010, São Paulo, SP, Brasil. ericozoo1@yahoo.com.br

Objetivou-se com este estudo analisar os efeitos da mastigação simulada, fermentação, digestão ácido-enzimática *in vitro*, e os efeitos dinâmicos destes, sobre qualidade fisiológica de sementes de quatro cultivares de *Brachiaria* spp. (cv. Marandu, cv. MG5-Xaraés, cv. Basilisk e cv. Ruziziensis). Foram conduzidos quatro ensaios, o primeiro para observar o percentual de sementes danificadas pela mastigação simulada; o segundo, para verificar a taxa de germinação das sementes após mastigação; o terceiro para comparar a taxa de germinação após fermentação e digestão ácido enzimática, por meio de inoculação ruminal, ácido clorídrico e pepsina; e o quarto para verificar a taxa de germinação das sementes não destruídas após serem submetidas a mastigação simulada, fermentação e digestão ácido enzimática *in vitro*. Os tratamentos que simulam *in vitro* a passagem das sementes de *Brachiaria* spp., no trato digestório de bovino causaram redução na germinação das sementes.

Palavras-chave: Marandu, MG5-Xaraés, Basilisk, Ruziziensis.

Survival and seed germination of *Brachiarias* spp. under simulated mastication, enzymatic acid digestion and *in vitro* fermentation. The objective of this study was to analyze the effects of simulated mastication, fermentation, acid-enzymatic digestion *in vitro*, and the dynamic effects of these on physiological quality of seeds of four cultivars of *Brachiaria* spp. (cv. Marandu, cv. MG5-xaraés, cv. Basilisk e cv. Ruziziensis). Four trials were conducted, the first to observe the percentage of seeds damaged by simulated mastication; the second, to verify the seed germination rate after chewing; the third to compare the rate of germination after fermentation and enzymatic acid digestion, by means of ruminal inoculation, hydrochloric acid and pepsin; and the fourth to verify the germination rate of undestroyed seeds after undergoing simulated chewing, fermentation and enzymatic acid digestion *in vitro*. The treatments that simulate *in vitro* the passage of *Brachiaria* spp. Seeds in the bovine digestive tract caused a reduction in seed germination.

key words: Marandu, MG5-Xaraés, Basilisk, Ruziziensis.

Introdução

A dispersão de sementes por animais é fundamental e comum nas regiões tropicais do mundo todo. Este mecanismo ajuda a manter pastagens, bosques e florestas vivas e ricas em ambientes que, muitas vezes, sofreram degradação por uso indevido do solo e ou manejo inadequado. A dispersão de sementes é um processo fundamental do ciclo de vida de cada espécie vegetal e se trata do deslocamento dos propágulos vegetais a partir da planta-mãe, para distâncias “seguras” (Cordeiro e Howe, 2003).

Os herbívoros podem dispersar sementes, que são ingeridas com a massa de forragem em as pastagens (Fischer, Poschold, Beinlich, 1996; Jansen, 1982), por meio da dispersão por endozocoria, que é a passagem através do trato digestório dos animais (Jansen, 1982).

Porém a introdução de sementes nas pastagens é influenciada por uma série de fatores (Almeida et al., 2002), um deles, talvez não o principal, é a dormência das sementes. Alguns autores, como Almeida (2016), consideram que esta pode ser influenciada, principalmente, pelo tipo de dispersor e adaptação da espécie ao local e que a distribuição das sementes e espécies.

Assim como a presença/ausência na regeneração natural, podem dar indicativos de tolerância, comportamento, participação das espécies em outros estádios serais, presença ou ausência de agentes polinizadores e dispersores, e permanência da espécie em questão no sistema (Costa et al., 2010). A dormência é um estado em que as sementes deixam de germinar mesmo quando há condições favoráveis para que isso ocorra. A dispersão que os animais podem realizar pode promover escarificação das sementes, possivelmente, beneficiando a germinação e superação da dormência (Carmona, 1992).

Para avaliação da sobrevivência das sementes por endozocoria têm sido utilizados diferentes métodos, *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Esta técnica vem sendo aperfeiçoada ao longo dos anos e tem possibilitado o estudo de diversos alimentos (Ribeiro et al., 2009; Castro et al., 2014; Nayak e Lakshmi, 2014; Çakmak et al., 2016). Devem representar o mais próximo possível o processo de digestão que ocorre no animal (Berchielli, Garcia, Oliveira, 2006). O objetivo é simular as condições normais do rumem, com atmosfera anaeróbica, temperatura de incubação constante e pH ótimo.

A compreensão dos mecanismos da dispersão de sementes (Giulietti et al., 2002; Jordano et al., 2006, Silva e Rodal, 2009; Virtuoso et al., 2013) aliado ao conhecimento das características das forrageiras que se pode dispersar em determinadas áreas é uma ferramenta extremamente útil para a conservação e manutenção de áreas em equilíbrio, além da recuperação de áreas degradadas. Principalmente, porque as braquiárias que são muito utilizadas no Brasil pela sua resistência e boa produção, podem ser dispersas após passarem pelo trato digestório de ruminantes (Feer, 1995; Prasad et al., 2006) e ajudar a manter as pastagens. O uso de bovinos como dispersores naturais de sementes em pastagens, pode ser uma alternativa de melhoria das pastagens ou ao mesmo tempo baixar custos de introdução de espécies de maior potencial produtivo. Portanto é necessário compreender mais profundamente a sobrevivência e o comportamento germinativo das sementes excretadas pelos ruminantes, afim de avaliar a dinâmica da difusão forragem-semente em pastagens, ou seja a dispersão de sementes em pastagens.

Desta forma, com este estudo objetivou-se analisar a mastigação simulada, a fermentação e digestão ácido-enzimática *in vitro*, e os efeitos sobre a qualidade fisiológica de sementes de quatro cultivares de *Brachiaria* spp.

Material e Metodos

Mastigação Simulada

De acordo com metodologia descrita por Bonn (2004) e adaptada por Deminicis et al. (2012), foi realizado ensaio experimental para a avaliação do percentual de sementes destruídas (Souza Filho et al., 2011) pela escarificação que simula a mastigação por um bovino, com delineamento experimental inteiramente casualizado, utilizando 50 sementes de 4 cultivares de *Brachiaria* spp. por repetição, em 6 repetições. As respectivas espécies e cultivares utilizadas foram: *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, *Brachiaria brizantha* cv. MG5-xaraés, *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk e *Brachiaria ruziziensis* cv. Ruziziensis.

Para simular a mastigação foi escolhido o método descrito por Bonn (2004), simulando uma tensão mecânica sobre as sementes. Para isso foi utilizada uma barra de ferro (Figura 1) com uma área de contato



Figura 1- Mastigação simulada das sementes.

de 2 cm² e comprimento de 1,3 m, e uma pessoa com aproximadamente setenta quilogramas manteve a barra a noventa graus com o solo, girando-a noventa graus lateralmente e tencionando-a para baixo por 3 segundos. A base fixa onde as sementes foram colocadas foi construída com uma estilha de madeira, um recipiente plástico, duas camadas de fita de borracha e um prego com cabeça (2 cm), para simular o contato das sementes com a gengiva e os dentes de um bovino. Para simular algum tipo de alimento, foram adicionados, ao recipiente plástico, aproximadamente 3 gramas de folhas de forragem picado à 2,5 cm.

A área de mastigação foi ajustada exatamente dentro do recipiente plástico que foi anexado ao pedaço de madeira “representando” a mandíbula. As sementes foram colocadas (dez gramas de sementes) no recipiente plástico em uma única camada cobrindo a área de contato com as borrachas e a cabeça do prego e sobre elas, as 3g de forragem picada, sendo então as sementes “mastigadas” ou “prensadas” três vezes (3 rotações a 90° e pressão para baixo) com a barra de ferro (com peso de 400 g) encaixada sobre a forragem que cobria as sementes no recipiente plástico, conforme proposto por Bonn (2004). Todas as sementes contidas nos dez gramas utilizados foram previamente contadas e, após mastigação, foram separadas, contadas e pesadas. Permitindo que se chegasse ao valor percentual de sementes que não foram destruídas pela mastigação.

Na segunda etapa foi conduzido ensaio em delineamento experimental inteiramente casualizado, foram utilizadas as quatro cultivares de *Brachiaria* spp. com 6 repetições, para avaliar o comportamento germinativo das sementes intactas após mastigação.

Para o tratamento mastigação, foi realizada a simulação da mastigação com posterior seleção de 50 sementes não destruídas, por repetição, para o teste de germinação.

Para a confecção do tratamento controle, foram utilizadas 50 sementes e o teste de germinação foi realizado, de acordo com Brasil (2009), em câmara de germinação do tipo BOD com temperaturas de 20-35°C, com 12 horas de luz. As sementes foram colocadas para germinar em rolo de papel germiteste, umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso seco do papel. A avaliação do teste de germinação (plântulas normais) foi realizada no 21º dia após a montagem do teste. A classificação das plântulas foi realizada de acordo com Brasil (2009), considerando normais as plântulas com todas as estruturas essenciais em perfeito desenvolvimento.

Ao final dos dois ensaios, pode-se chegar à porcentagem de sobrevivência (S%) das sementes pela fórmula: $S\% = (\% \text{ Intactas} \times G\% \text{ das sementes Intactas}) / 100$. Os resultados da germinação foram expressos em porcentagem, sendo submetidos a análise da variância, utilizando o teste de Tukey, a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.

Fermentação e Digestão ácido-enzimática *in vitro*

Este estudo foi realizado em 2 etapas, utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2, com 4 cultivares em 3 tempos de incubação (12, 24 horas e tempo zero) em 6 repetições, sendo utilizadas 50 sementes por repetição. No primeiro experimento, foi realizado estudo da germinação de sementes, sem passar por nenhum tratamento prévio, após fermentação *in vitro*.

Em síntese foram adicionados em erlenmeyer a solução com fezes bovina e as sementes, o CO₂ foi inoculado, então as sementes ficaram à temperatura de trinta e nove graus Celsius, nos tempos de doze e vinte e quatro horas. Após serem lavadas as sementes foram novamente acondicionadas nos erlenmeyer e foi realizada digestão ácido-enzimática nos tempos de doze e vinte e quatro horas. Após estes tempos as sementes foram para o teste de germinação, sendo que não foram submetidas a desinfestação superficial com hipoclorito de sódio conforme Bizzetto e Homechin (1997) e Galli et al. (2007).

As sementes (50) de cada repetição, cultivar e tempo de incubação foram acondicionadas em cada Erlenmeyer, totalizando de 250 mL contendo 10 mL de solução FB (diluição 200g de fezes/400 mL de tampão), à temperatura de 39°C, ficaram nos tempos de fermentação: 12 e 24 horas. O CO₂ foi inoculado por cerca de 30 segundos, antes e após a adição do líquido ruminal. A solução de FB composta de 200g de fezes/400 mL de solução tampão, para simular a digestão no retículo – rúmem e omaso, à uma temperatura de 39°C e pH de 6,9 (Silva et al., 2003 e Deminicis et al., 2012). A solução tampão ou saliva sintética sugerida por McDougall (1948), é composta por 9,80 g/L de NaHCO₃, 9,30 g/L de Na₂HPO₄.12H₂O, 0,47g/L de NaCl, 0,57 g/L de KCl, 0,04 CaCl₂ anhyd, 0,06 g/L de MgCl₂ anidro.

Foi utilizado o tempo zero, no qual foram utilizadas sementes intactas de cada cultivar, ou seja, sementes que não passaram por nenhum tratamento físico, químico ou biológico e foram levadas para o teste de germinação em BOD (12 horas de luz) à 25 °C, onde permaneceram durante 10 dias. Ao término dos períodos de fermentação, os erlenmeyers foram drenados e as sementes lavadas no próprio erlenmeyer, cinco a seis vezes com água destilada. Sequencialmente as sementes foram levadas para a digestão ácido-enzimática.

Na digestão ácido-enzimática, sobre as sementes (50 de cada repetição por cultivar) que passaram pela fermentação *in vitro*, foram adicionados 40 mL de HCl a 6N e 8 g de pepsina (Deminicis et al., 2012). A pepsina foi previamente dissolvida em 34 mL de água destilada a 35°C por cinco minutos em agitador, mantendo-se o pH entre 2,0 e 3,0 (Holden, 1999). O CO₂ foi inoculado e as sementes permaneceram por 12 e 24 horas em solução.

Após o término da digestão ácido-enzimática foi realizado o teste de germinação, utilizando as 50 sementes de cada repetição que passaram pela digestão ácido-enzimática, foram colocadas em papel germiteste umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso seco do papel e levadas para câmara de germinação tipo BOD, com temperatura de 20-35°C, com 12 horas de luz.

A avaliação do teste de germinação (plântulas normais) foi realizada no 10º dia após a montagem do teste. Foram determinadas as porcentagens de germinação e dureza de cada cultivar em cada tempo de fermentação.

No segundo experimento foi realizado estudo da germinação de sementes não destruídas, obtidas após mastigação simulada e fermentação *in vitro*. Em cada tubo, as sementes foram incubadas à 39° C com fezes bovinas (FB) (diluição 200g de fezes/400 mL de tampão), simulando a digestão no retículo - rúmem e omaso, e pH de 6,9 (Silva et al., 2003 e Deminicis et al., 2012), sendo esta solução descrita como Solução FB equivalente ao líquido ruminal rotineiramente utilizado.

As sementes foram acondicionadas nos erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL de solução FB, à temperatura de 39 °C. Os tempos de fermentação foram: 12 e 24 horas. O CO₂ foi inoculado por cerca de 30 segundos, antes e após a adição do líquido ruminal. Ao término dos períodos de fermentação, os jarros foram drenados e as sementes lavadas no próprio jarro, cinco a seis vezes com água destilada. Sequencialmente as sementes foram levadas para a realização do teste de germinação. As sementes foram colocadas em germinador tipo BOD à 20-35°C, com 12 horas de luz, onde permaneceram durante 10 dias, utilizando-se quatro repetições de 50 sementes por repetição, colocadas para germinar em rolo de papel germiteste umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. Foram determinadas as porcentagens de germinação e dureza de cada espécie/cultivar em cada tempo de fermentação.

Na terceira fase foi realizado estudo da germinação de sementes não destruídas ou “intactas” obtidas após mastigação simulada, fermentação e digestão ácido-enzimática *in vitro*. Na qual foram realizadas: Mastigação simulada seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, selecionando-se 50 sementes de cada cultivar que não foram destruídas. Após selecionar as 50 sementes que não foram destruídas pela mastigação simulada, estas sementes (50 de cada cultivar com 6 repetições por cultivar) seguiram para fermentação e digestão ácido-enzimática *in vitro*, seguindo os mesmos passos anteriormente descritos, nos tempos de 12 e 24 horas.

Como na etapa anterior, ao término dos períodos de fermentação, os jarros foram drenados e as sementes lavadas no próprio jarro, cinco a seis vezes com água destilada. Sequencialmente, as sementes foram levadas para o teste de germinação, para avaliação após 10 dias, sendo então avaliadas quanto a dureza e germinação. As plântulas foram classificadas como normais e

anormais e as sementes como duras e mortas. Os resultados obtidos nos testes de germinação foram transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$ para normalização dos dados, e submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% ou teste F, para comparação das médias, utilizando o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

Resultados e Discussão

Não foi verificada diferença ($p > 0,05$) entre as cultivares de *Brachiária* (Tabela 1), para percentual de sementes não destruídas. Um dos fatores que pode influenciar a porcentagem de sementes que não são danificadas pelo teste de mastigação simulada é a espécie (Morais et al., 2017). Cada espécie tem características e particularidades como tamanho, formato das sementes e quantidade que pode facilitar a sobrevivência (Almeida et al., 2015).

Ao passarem pelo trato digestório ou mesmo pela simulação da passagem por este, um considerável número de sementes pode permanecer viáveis (Simão Neto et al., 1987; Gardener et al., 1993; Machado et al., 1997; Bray et al., 1998).

Na Tabela 2, em relação a porcentagem de sementes controle dormentes (%D controle), ao comparar as cultivares, a cv. Marandu obteve maior porcentagem de sementes dormentes em relação as

demais, já a cv. Ruziziensis com menor quantidade sementes dormentes e entre as cv. MG5-Xaraés e cv. Basilisk não houve diferença ($p > 0,05$).

Para a porcentagem de sementes duras que passaram pela mastigação simulada (% D após MS) houve diferença significativa com maior porcentagem de sementes dormentes para cv. Marandu, porém não diferiu da cv. MG5-Xaraés, e entre a cv. Basilisk e a cv. Ruziziensis e não houve diferença significativa.

Ao comparar a porcentagem de sementes duras/dormentes em cada cultivar, verificou-se diferença para cv. Marandu e cv. Basilisk, com maior porcentagem de germinação para as sementes que passaram pela mastigação simulada. Porém as cultivares MG5 e Ruziziensis não houve diferença estatística entre as sementes controle e as que passaram pela mastigação simulada. Ao ponderar sobre a porcentagem de germinação das sementes controle (G % controle) pode-se observar que houve diferença significativa ($p < 5\%$), entre as cultivares, entretanto não foi verificada diferença entre as cultivares MG5, Basilisk e Ruziziensis, com maiores porcentagens de sementes que germinaram. A cv. Marandu apresentou diferença quando comparada com as demais, apresentando menor percentual de sementes que germinaram.

Ao avaliar porcentagem de germinação após a mastigação simulada, observou-se diferença ($p < 0,05$)

Tabela 1. Porcentagem de sementes de *Brachiaria* spp. não destruídas pela mastigação simulada (MS)

Espécie - Cultivar	Marandu	MG5-Xaraés	Basilisk	Ruziziensis	CV%
% Sementes não destruídas	69,51a	77,98a	71,35a	85,19a	13,44

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Porcentagem de dormência (% D) e porcentagem de germinação (% G) e das sementes antes e após mastigação simulada (MS)

Espécie - Cultivar	Marandu	MG5-Xaraés	Basilisk	Ruziziensis	CV%
%D controle ¹	45,00Aa	39,00Ab	34,00Ab	29,83Ac	19,05
%D após MS ²	39,67Ba	39,00Aa	28,83Bb	29,83Ab	16,09
%G controle ³	40,00Ab	60,00Aa	61,00Aa	60,50Aa	21,60
%G após MS ⁴	22,33Bbc	15,67Bc	30,67Ba	28,66Bb	33,60

% D controle¹ = sementes antes da mastigação simulada, sem tratamento.

%D após MS² = % de sementes que após a mastigação simulada permaneceram dormentes.

%G controle³ = % de germinação das sementes controle.

%G após MS⁴ = % de germinação das sementes que passaram pela mastigação simulada.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna (comparação entre as sementes controle antes e após a mastigação simulada em relação a dormência e germinação) e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

entre as cultivares, com maior taxa de germinação para cv. Basilisk, e menor MG5-Xaraés, não havendo diferença entre cv. Marandu e cv. Ruziziensis. As sementes do tratamento controle (tempo zero), ou seja, que não foram submetidas à mastigação simulada apresentaram taxa de germinação superior em relação às sementes que foram submetidas à mastigação simulada em 27,57%, a cultivar que se apresentou como mais susceptível à mastigação simulada foi a MG5-Xaraés, por ter apresentado redução em cerca de 82% no percentual de germinação. Pariz et al. (2009) avaliando a qualidade fisiológica de sementes intactas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Brachiaria ruziziensis* em teste de germinação, após 7 e 21 dias, observaram resultados percentagens de germinação de 89,5 e 50,0 %, respectivamente. Ou seja, resultados superiores aos obtidos no presente estudo para a cv. Marandu e inferiores para cv. Ruziziensis.

Avaliando a porcentagem de germinação, das sementes controle e das sementes que receberam tratamento da mastigação simulada em cada cultivar, foi verificada diferença ($p < 0,05$) entre as sementes controle e as sementes que passaram pela mastigação simulada. As sementes controle tiveram maior porcentagem de germinação em relação as sementes que passaram pela mastigação simulada, obviamente por não terem sofrido possível danos físicos.

Na Tabela 3 estão dispostos os resultados da germinação e dormência/dureza das sementes controle

e após fermentação/digestão ácido enzimática *in vitro* por 12 e 24 horas. Não houve diferença estatística entre MG5 e cv. Basilisk, após 12 horas de digestão ácido enzimática, as cultivares Marandu e MG5 não diferiram estatisticamente e obtiveram maior taxa de sementes dormentes, então tem-se a cv. Ruziziensis com menor quantidade de sementes dormentes após este período de incubação, entre MG5 e cv. Basilisk não houve diferença estatística. Após 24 horas obteve-se na cv. Marandu maior quantidade de sementes dormentes e demais iguais ao teste anterior.

Ao comparar % de sementes dormentes que não receberam tratamento (controle) com as sementes que receberam tratamento (fermentação mais digestão após 12 e 24 horas), em cada cultivar (tabela avaliada na vertical), houve diferença significativa ($p < 5\%$), na cv. Marandu com maior quantidade de sementes dormentes no lote controle e após 12 horas. Já as outras cultivares não houve diferença estatística com ou sem tratamento.

A dormência das sementes é um dos fatores que pode afetar a germinação das sementes, além desse fator a disponibilidade de água, temperatura, pH do substrato, oxigênio, luz, maturidade fisiológica, entre outros, são condições intrínsecas e extrínsecas (Pereira et al., 1995). As diferentes espécies de gramíneas apresentam particularidades em relação a dormência e suas causas, que podem ocorrer isoladas, combinadas ou simultaneamente (Toledo;

Tabela 3. Porcentagem de dormência (% D) e porcentagem de germinação (G %) de sementes de *Brachiaria* spp. antes (tempo zero) e após fermentação mais digestão ácido enzimática *in vitro* por 12 horas (12 FD) e após fermentação mais digestão ácido enzimática *in vitro* por 24 horas (24 FD)

Espécie - Cultivar	Marandu	MG5-Xaraés	Basilisk	Ruziziensis	CV%
% D tempo Zero ¹	45,00Aa	39,00Aab	34,00Ab	29,83Ac	19,05
%D após 12 FD ²	42,35Aa	39,00Aab	34,00Ab	28,90Ac	12,36
%D após 24 FD ³	39,33Ba	36,00Ab	34,00Ab	26,00Ac	7,05
% G tempo Zero ⁴	40,00Ab	60,00Aa	61,00Aa	60,50Aa	21,60
% G após 12 FD ⁵	24,30Bb	24,80Bb	35,20Ba	32,50Ba	14,75
% G após 24 FD ⁶	4,30Ca	4,80Ca	5,20Ca	2,50Ca	33,95

% D tempo zero¹ = sementes sem tratamento.

% D após 12/24 horas^{2,3} = % de sementes que após fermentação mais Digestão ácido-enzimática simulada permaneceram dormentes.

% G tempo Zero⁴ = % de germinação das sementes que não passaram por tratamento.

% G controle³ = %de germinação das sementes controle.

% G após 12 FD⁵ = % de germinação das sementes após 12 de fermentação mais digestão ácido-enzimática.

% G após 24 FD⁶ = % de germinação das sementes após 24 de fermentação mais digestão ácido-enzimática.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna (comparação das sementes entre tempo zero e após fermentação e digestão ácido-enzimática) e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Chamma; Novembro, 1995). Existem sítios de caráter fotoquímico ou bioquímica (dormência fisiológica), de caráter difuso (dormência física) e de caráter morfológico (dormência morfológica). De fato o fenômeno da dormência interfere no estabelecimento uniforme das populações de espécies e beneficia o aparecimento de plantas daninhas nas áreas de pastagens (Martins; Silva, 2003; Laura et al., 2005, Lacerda et al., 2010).

Foi verificada a diferença significativa ($p < 5\%$), da % de germinação para o tratamento no tempo zero. A cv. Marandu apresentou menor porcentagem de sementes que germinaram em relação as demais, porém não houve diferença significativa entre as sementes controle cv. MG5-Xaraés, cv. Ruziziensis e cv. Basilisk. Após 12 horas houve diferença significativa entre as cultivares, com maiores quantidades de sementes que germinaram para a cv. Basilisk e cv. Ruziziensis, porém não havendo diferença significativa entre estas. Já após 24 horas não houve diferença significativa entre as espécies.

Para as cultivares em relação a porcentagem de germinação no tratamento controle, após 12 horas e após 24 horas, houve diferença significativa ($p < 5\%$), com maior taxa de germinação das sementes controle. Porém a porcentagem germinação após 12 e 24 horas da cv. Ruziziensis não houve diferença estatística. De acordo com Martins e Silva (2003) a *Brachiaria brizantha* apresenta, além de desuniformidade na maturação e na degrana, apresenta dormência nas sementes cuja natureza, intensidade e persistência não estão suficientemente esclarecidas.

Todavia, (Rezende et al., 2007) sementes de Estilosantes do cv. Campo Grande que foram misturadas ao sal mineral e ofertadas a bovinos, e misturadas em sal e imediatamente semeadas, foi possível notar que quando as sementes passaram pelo trato digestório dos animais nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 tiveram melhores porcentagens de germinação, já que foi avaliado até 168 horas, inclusive melhor que o tratamento testemunha, isto pode ser devido aos ácidos presentes no trato digestório e a variação de pH, que causam esscarificação.

Ao avaliar 20 espécies de sementes em pastagens ibéricas centrais em experimento que simulou a passagem pelo trato digestório de ruminante, quinze espécies (*Anthemis arvensis*, *Alyssum granatense*, *Andryala integrifolia*, *Brassica barrelieri*,

Campanula rapunculus, *Chamaemelum mixtum*, *Filago lutescens*, *J. montana*, *L. stoechas*, *Ornithopus compressus*, *Petrorhagia nanteuilii*, *Plantago coronopus*, *Silene gallica*, *Spergularia purpurea* e *Tolpis barbata*), tiveram maior germinação das sementes controle do que no tratamento simulando a ingestão por ovelhas. Para *B. barrelieri*, *C. rapunculus*, *F. lutescens*, *S. gallica* e *L. stoechas*, o tratamento produziu uma diminuição na velocidade de germinação, enquanto que para *S. purpurea* e *P. lanceolata*, o tratamento aumentou a velocidade de germinação.

Na Tabela 4, pode-se verificar que entre as cultivares houve diferença significativa para porcentagem de sementes dormentes controle, com maior porcentagem de dormentes na cv. Marandu, sem diferença estatística entre a cv. MG5 e a cv. Basilisk.

Para a porcentagem de sementes dormentes após mastigação simulada (MS) e fermentação e digestão ácido enzimática *in vitro* (FD) com 12 horas de incubação houve diferença estatística, com maior taxa de dormentes para a cv. Marandu e menor para a cv. Ruziziensis, não havendo diferença entre MG5 e cv. Basilisk. Foi observado que com 24 horas de incubação houve diferença estatística com maior taxa de sementes dormentes na cv. Marandu, porém não houve diferença entre MG5 e cv. Basilisk, e a cv. Ruziziensis teve menor taxa de sementes dormentes. Lisboa et al. (2009) ao recuperar sementes de *capim annoni-2* (*Eragrostis plana*) em fezes bovinas de 7,2% das sementes recuperadas 3,1% de sementes fornecidas, eram viáveis, o curto tempo de permanência das sementes no trato digestório dos animais é fundamental para sobrevivência e viabilidade das sementes.

A maior taxa de germinação ocorreu para as sementes controle, com diferença estatística entre os tratamentos (controle, 12 e 24 horas). Porém não houve diferença significativa na porcentagem de germinação entre as cultivares no tratamento controle. Após 12 horas a cv. Basilisk obteve maior taxa de germinação, diferenciando-se das outras cultivares, não havendo diferença significativa ($p < 5\%$), para cv. Marandu e cv. MG5-Xaraés. Porém após 24 horas não houve diferença significativa entre as cultivares.

Após 24 horas a porcentagem de germinação foi menor em relação a porcentagem de germinação 12 horas, em ambas as Tabelas 2 e 3. Esta redução da

Tabela 4. Porcentagem de dormência/dureza (% D) e de germinação (G %) de sementes de *Brachiaria* spp. antes (controle), após mastigação simulada (MS), fermentação e digestão ácido-enzimática *in vitro* por 12 horas (12 FD); fermentação e digestão ácido-enzimática *in vitro* por 24 horas (24 FD)

Espécie - Cultivar	Marandu	MG5-Xarás	Basilisk	Ruziziensis	CV%
% D tempo Zero ¹	45,00Aa	39,00Bab	34,00Ab	29,83Ac	19,05
% D após MS e 12 FD ²	39,75 Ba	37,25Bb	34,00Ab	21,00Bc	13,23
% D após MS e 24 FD ³	38,10Bc	36,00Ba	34,00Aab	20,90Bbc	6,86
% G tempo Zero ⁴	40,00Aa	60,00Aa	61,00Aa	60,50Aa	21,60
% G após MS e 12 FD ⁵	23,00 Bc	23,73Bc	30,15Ba	28,00Bb	10,41
% G após MS e 24 FD ⁶	1,20Ca	1,50Ca	1,10Ca	0,60Ca	23,98

% D tempo zero¹ = sementes sem tratamento.

% D após 12 / 24 horas^{2,3} = % de sementes que após mastigação, fermentação mais Digestão ácido-enzimática simulada permaneceram dormentes.

% G tempo Zero⁴ = % de germinação das sementes que não passaram por tratamento.

% G após 12 / 24 FD^{5,6} = % de germinação das sementes após 12 e 24 horas de mastigação, fermentação mais digestão ácido-enzimática.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna (comparação das sementes dormentes entre tempo zero e após fermentação e digestão ácido-enzimática) e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

germinação pode ter diferentes causas, pois o processo digestivo pode ser um meio estressante as sementes, o que permite a consideração de possível comparação a testes de “envelhecimento acelerado” ou “envelhecimento artificial” de sementes com altas temperaturas e umidade relativa, causando menor porcentagem de germinação e vigor (Ferreira et al., 2004) ou que de fato é possível em se tratando do ambiente ruminal e abomasal (Del Campo & Boere, 2008). Blackshaw & Rode (1991) avaliaram o efeito da ensilagem e passagem de sementes através do rúmen, sobre a germinação e viabilidade das sementes, observaram que sementes da erva daninha *Brome Downy* (*Bromus tectorum* L.), a grama *Foxtail* (*Setaria*) e a grama *Barnyardgrass* (*Echinochloa*) não foram viáveis após digestão por 24 horas em ambiente ruminal. Porém 17% da grama *Foxtail* sobreviveram.

Segundo Katovich, Bercker e Doll (2005), o processo de fermentação que ocorre no rúmen dos bovinos, diminui a taxa de viabilidade das gramíneas. Porém Robles & Castro (2002) afirmaram que a passagem pelo trato digestório de bovinos pode causar uma escarificação ácida por ação das enzimas e ácido que atuam sobre as sementes, e assim aumenta a taxa de germinação, ainda as sementes que permanecem sem germinar são importantes para formar um banco de sementes no solo (Robles & Castro, 2002). Diferentemente do ocorrido neste estudo.

Contudo Bakker & Olf (2003) concluíram que o papel do bovino como dispersor é muito importante, relataram um número de germinação muito maior em fezes bovinas do que em papel, provando que por possuírem nutrientes as fezes bovinas podem ser um ambiente favorável. De acordo com Melado (2007) o gado excreta por dia cerca de 24 kg de fezes, a adubação orgânica que os animais promovem é uma opção muito viável para que obtenha uma pastagem ecológica, isto é muito importante pois áreas degradadas podem ser recuperadas com auxílio destas fezes e outras medidas.

Considerações Finais e Conclusões

Os resultados indiretamente alertam sobre impactos ambientais do gado em áreas de preservação, pois as sementes podem sobreviver *in vitro* e possivelmente *in vivo*, são necessários novos experimentos já que são escassos os trabalhos com as cultivares de *Brachiaria* spp. O coeficiente de variação das cultivares apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, não foram possíveis de serem comparados, pois não haviam estudos de *Brachiaria* spp., passando por processos de mastigação e digestão simulados *in vitro*.

As técnicas de mastigação, fermentação e digestão ácido enzimática *in vitro* demonstram os possíveis danos que as sementes podem sofrer, ao serem ingeridas pelos bovinos. As sementes de *Brachiaria*

spp, podem sobreviver a passagem à mastigação simulada, fermentação e digestão ácido-enzimática *in vitro*, entretanto poderá haver drástica redução na germinação das sementes.

Literatura Citada

- ALMEIDA, D. S. 2016. Alguns princípios de sucessão natural aplicados ao processo de recuperação. In: Recuperação ambiental da Mata Atlântica. 3ed. Revista e ampliada - Ilhéus, BA, Editus. pp.48-75.
- ALMEIDA, J. C. C. et al. 2015. Dispersão e persistência de leguminosas forrageiras tropicais após ingestão por bovinos. *Bioscience Journal* 31:867-874.
- ALMEIDA, R. G.; NASCIMENTO JUNIOR, D.; EUCLIDES, V. P. B. 2002. Produção animal em pastos consorciados sob três taxas de lotação, no cerrado. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31:852-857.
- BAKKER, E. S.; OLFF, H. 2003. Impact different-sized herbivores on recruitment opportunities for subordinate herbs in grasslands. *Journal of Vegetation Science* 14:465-474.
- BERCHIELLI, T. T.; GARCIA, A. V.; OLIVEIRA, S. G. 2006. Principais técnicas de avaliação em estudo de nutrição. In: Berchielli, T. T.; Vaz Pires, A.; Oliveira, S. G. eds. *Nutrição de ruminantes*. 2 ed. Jaboticabal, SP. FUNEP.
- BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M. 1997. Efeito do período e da temperatura de armazenamento na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja com altos índices de Phomopsis sojæ (Leh.). *Revista Brasileira de Sementes* 19(2):296-303.
- BLACKSHAW, R. E.; RODE, L. M. 1991. Effect of ensiling and rumen digestion by cattle on weed seed viability. *Weed Science* 39:104-108.
- BONN, S. 2004. Dispersal of plants in the Central European landscape - dispersal processes and assessment of dispersal potential exemplified for endozoochory. Dissertation) (Doktorgrades der Naturwissenschaften). Germany, Stuttgart, Universität Regensburg.
- BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-MAPA. 2009. Regras para análise de sementes. Brasília, DF, Secretaria de Defesa Agropecuária. 155p.
- BRAY, S. G. et al. 1998. Can cattle spread giant rat's tail grass seed (*Sporobolus pyramidalys*) in their feces? 1998. Proceedings of Australian Agronomy Conference. Disponível em: <<http://www.regional.org.au/au/asa/1998/6/030bray.htm>> Acesso em: 4/4/2016.
- ÇAKMAK, D. et al. 2016. Advancement in protocol for *in vitro* seed germination, regeneration, bulblet maturation, and acclimatization of *Fritillaria persica*. *Turkish Journal of Biology* 40(4):878-888.
- CARMONA, R. 1992. Problemática e manejo de bancos de sementes de invasoras em solos agrícolas. *Planta Daninha (Brasil)* 10:5-16.
- CASTRO, T. C. et al. 2014. Morphological aspects of fruits, seeds, seedlings and *in vivo* and *in vitro* germination of species of the genus *Cleome*. *Journal Seed Science* 36(3):326-335.
- CORDEIRO, E.; HOWE, H. F.; CORDEIRO, N. 2003. Forest fragmentation severs mutualism between seed dispersers and an endemic African tree. *Proceedings. National. Academy. Science* 100:14052-14054.
- COSTA, P. A. et al. 2010. Quebra de dormência em sementes de *Adenantha pavonina* L. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 40:83-88.
- DEL CAMPO, C.; BOERE, V. 2008. Is there equivalence between the tympanic membrane temperature and the rectal temperature in normothermic Santa Ines sheep? *Ciência Rural* 38(6):1781-1783.
- DEMNICIS, B. B. et al. 2012. Mastigação simulada e digestão ácido-enzimática de sementes de leguminosas forrageiras tropicais. *Arquivos de Zootecnia* 61:387-396.
- FEER, F. 1995. Seed dispersal in African forest ruminants, *Journal of Tropical Ecology* 11(4):683-689.
- FERREIRA, D. F. 2000. Sistema de análises de variância para dados balanceados. (SISVAR 4. 1. pacote computacional). Lavras, MG, UFLA.
- FERREIRA, E.; ROCHA, G. C. ; BRAZ, S. P. 2004. Modelos estatísticos para o estudo da distribuição de excretas de bovinos em pastagens tropicais e sua importância na sustentabilidade desses sistemas. *Livestock Research for Rural Development* 16:66.
- FISCHER, S. F. P.; POSCHLOD, B.; BEINLICH. 1996. Experimental studies on the dispersal of plants and animals on sheep in calcareous grasslands. *Journal of Applied Ecology* 33:1206-1222.
- GALLI, J. A.; PANIZI, R. C.; VIEIRA, R. D. 2007. Sobrevivência de patógenos associados a sementes de soja armazenadas durante seis meses. *Revista Brasileira de Sementes* 29(2):205-213.
- GARDENER, C. J.; MCLVOR, J. G.; JANSEN, A. 1993. Passage of legume and grass seeds through the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *Journal of Applied Ecology* 30:63-74.

- GIULIETTI, A. M. et al. 2002. Espécies endêmicas da caatinga. In: Sampaio, E.V. B.; Giullietti, A. M.; Virginio, J. ; Gamarra-Rojas, C. eds. Vegetação e flora da caatinga. Recife, PE, Associação Plantas do Nordeste - APNE/CNIP. pp.103-118.
- HOLDEN, L.A. 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science* 82:1791-1794.
- JANZEN, D.H. 1982. Differential seed survival and passage rates in cows and horses, surrogate pleistocene dispersal agents. *Oikos* 38(2):150-156.
- JORDANO, P. et al. 2006. Ligando frugivoria e dispersão de sementes à biologia da conservação. In: *Biologia da conservação: essências*. São Paulo, SP, Editorial Rima. pp.411-436,
- KATOVICH, J.; BECKER, R.; DOLL, J. 2005. Weed seed survival in livestock systems. University of Minnesota, Extension Service and University of Winsconsin. 4p.
- LACERDA, M. J. R. et al. 2010. Seed dormancy-breaking of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. *Semina: Ciências Agrárias* 31(4):823-828.
- LAURA, V. A. et al. 2005. Efeitos do ácido giberélico sobre a germinação de cultivares de *Brachiaria humidicula*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 42. Goiânia. Anais... Goiânia.
- LISBOA, C. A. V. et al. 2009. Poder germinativo de sementes de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Ness) recuperadas em fezes de bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38:405-410.
- MACHADO, L. A. Z.; DENARDIN, R. N.; JACQUES, A. V. A. 1997. Porcentagem de germinação e dureza do tegumento de sementes de três espécies forrageiras recuperadas em fezes ovina. *Revista da Brasileira de Zootecnia* 26:42-45.
- MCDUGALL, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. *Biochemical Journal* 43:99-109.
- MARTINS, L.; SILVA, W. R. 2003. Efeitos imediatos e latentes de tratamentos termico e químico em sementes de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. *Bragantia (Brasil)* 62(1):81-88.
- MELADO, J. 2007. Pastagem ecológica e serviços ambientais da pecuária sustentável. *Revista Brasileira de Agroecologia* 2(2):1777-1783.
- MORAIS, L. F. et al. 2017. Efeito da mastigação sobre a sobrevivência de sementes de leguminosas forrageiras tropicais e germinação. *Archivos de Zootecnia* 66:131-135.
- NAYAK, N. I. M.; LAKSHMI, P. 2014. Seed germination: An alternative to animal model to teach bioassay principles, *Journal Pharmacol Pharmacother* 5(1):56-58.
- PARIZ, C. M. et al. 2009. Desempenhos técnicos e econômicos da consorciação de milho com forrageiras dos gêneros *Panicum* e *Brachiaria* em sistema de integração lavoura pecuária. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 39:360-370.
- PEREIRA, L. C. et al. 1995. Pastagens consorciadas de braquiárias com estilosantes, no cerrado 1. Disponibilidade de forragem, composição botânica e valor nutritivo. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38. Piracicaba. Anais. Piracicaba, SP. SBZ. pp.62- 63.
- PRASAD, S. et al. 2006. Ruminant-mediated Seed Dispersal of an Economically Valuable Tree in Indian Dry Forests. *Biotrófica (Brasil)* 38(5):679-682.
- REZENDE, A.V. et al. 2007. Germinação de sementes de *Stylosanthes* misturadas ao sal para bovinos. In: Congresso de Forragicultura e Pastagens, 2. Anais. Lavras, MG, NEFOR. CD-ROM.
- RIBEIRO, M. N. O. et al. 2009. In vitro seed germination and seedling development of *Annona crassiflora* Mart. *Scientia Agrícola (Brasil)* 66(3):410-413.
- ROBLES, A. B. ; CASTRO, J. 2002. Effect of thermal shock and ruminal incubation on seed germination in *Helianthemum apenninum* (L.) mil. (Cistaceae). *Acta Botanica Malacitana* 27:44-47.
- SILVA, K. T. et al. 2003. Utilização de fezes (equina e bovina) em substituição ao líquido ruminal como fonte de inóculo para determinação da digestibilidade "in vitro" de alimentos para ruminantes. *Acta Scientiarum* 25:355-361.
- SILVA, M. C. N.; RODAL, M. J. N. 2009. Padrões das síndromes de dispersão de plantas em áreas com diferentes graus de pluviosidade, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasiliis* 23(4):1040-1047.
- SIMÃO NETO, M.; JONES, R. M. ; RATCLIFF, D. 1987. Recovery of pasture seed ingested by ruminants. 1. Seed of six tropical pasture species fed to cattle, sheep and goats. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 27:239-246.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; TREZZI, M. M.; IOUE, M. H. 2011. Seeds as alternative source of chemical substances with allelopathic activity. *Planta Daninha (Brasil)* 29(3): 709-716.
- TOLEDO, F. F.; CHAMMA, H. M. C. P.; NOVENBRE, A. D. L.C. 1995. Germinação de sementes *Panicum maximum* jacq. Pré tratadas com ácido sulfúrico. *Scientia Agrícola (Brasil)* 52:20-24.
- VIRTUOSO, E. R. F.; PRATA, A. P. N.; MELO, A. A. 2013. Floristic List from a Caatinga Remnant in Poço Verde, Sergipe, Brazil. *Journal of Species List and Distribution* 9:1354-1360. ●