

PRISCILA TORRES CUNHA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
ANATÔMICAS EM SEMENTES DE LENTILHA EM DIFERENTES
ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO E SUBMETIDAS AO
ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C972a
2018
Cunha, Priscila Torres, 1988-
Alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas em
sementes de lentilha em diferentes estádios de maturação e
submetidas ao armazenamento / Priscila Torres Cunha. – Viçosa,
MG, 2018.
viii, 44 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 35-44.

1. *Lens culinaris* . 2. Lentilha - Semente - Fisiologia -
Qualidade. 3. Lentilha - Semente - Armazenamento.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 635.658

PRISCILA TORRES CUNHA


**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
ANATÔMICAS EM SEMENTES DE LENTILHA EM DIFERENTES
ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO E SUBMETIDAS AO
ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
para obtenção do título de *Magister Scientiae*


APROVADA: 01 de agosto de 2018.



Laercio Junio da Silva



Warley Marcos Nascimento



Edgard Augusto de Toledo Picoli



Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias
(Orientadora)

A Deus, meus familiares e aos meus
amigos... companheiros de todas as horas...

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora por ter me dado saúde e forças para superar as dificuldades e completar mais um ciclo na minha vida;

Aos meus pais, irmão, sobrinha e demais familiares pelo amor, apoio e incentivo;

Ao meu namorado, por toda paciência, compreensão, carinho e amor;

Aos professores pelo despertar a alegria de trabalhar e conhecer, em especial a minha orientadora professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias pela oportunidade, ensinamentos, suporte e confiança e ao professor Edgar Augusto de Toledo Picoli pelo apoio, auxílio, disponibilidade;

Ao professor Eduardo Euclides de Lima e Borges, por ceder às dependências do Laboratório de Análise de Sementes Florestais e ao técnico José Mauro Ferreira, pela assistência para que pudesse realizar parte do experimento;

Ao Dr. Warley Marcos Nascimento da EMBRAPA Hortaliças, pelo fornecimento das sementes de lentilha e sugestões para a condução do trabalho;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade e fornecer todos os recursos para a realização deste trabalho e aos funcionários com quem convivi ao longo desses anos por toda a ajuda e paciência;

A todos os amigos do GSEM pela ajuda, pelas risadas e por todo o carinho que me receberam nesses anos, em especial à Ana Clara Reis Trancoso pela ajuda, companheirismo e amizade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de fomento à pesquisa.

Aos novos amigos que conquistei e aos velhos amigos pelos bons momentos vividos, a todos que acreditaram em mim ao longo de tanto tempo e fizeram parte dessa caminhada longa e árdua, difícil e gostosa!

Obrigada

RESUMO

CUNHA, Priscila Torres, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2018. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas em sementes de lentilha em diferentes estádios de maturação e submetidas ao armazenamento.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

A lentilha é uma hortaliça de ciclo anual, pertencente à família Fabaceae. O Brasil importa quase a totalidade do grão destinado ao consumo, que em 2015 foi de 11 mil toneladas, representando um valor de 10 milhões de dólares. Nas nossas condições, há demanda por informações sobre produção de sementes de lentilha. Conhecer as alterações que ocorrem nas sementes durante o seu processo de maturação é importante, pois tais informações são relevantes para a produção de sementes de alta qualidade. Considerando que as sementes podem ser semeadas logo após a colheita ou então armazenadas para posterior semeadura, é importante também conhecer o potencial de armazenamento de sementes colhidas em diferentes estádios de maturação. Diante disso, os objetivos do trabalho foram: i) avaliar as alterações fisiológicas, bioquímicas, anatômicas e histoquímicas em sementes de lentilha colhidas em diferentes estádios de maturação; ii) avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de lentilha submetidas ao armazenamento. Sementes de lentilha, cv. Precoz, foram produzidas no campo experimental instalado na “Horta Nova” /DFT/UFV durante o período de abril a outubro de 2017. Foram colhidas vagens em quatro estádios de maturação: verde, verde-amarelo, amarelo e marrom. Logo após a colheita, determinou-se o grau de umidade e a massa de matéria seca das sementes. Foi realizada ainda a caracterização anatômica e histoquímica das sementes de acordo com as técnicas de microscopia de luz, sendo os corte corados com Azul de toluidina, Xylidine Poncea (XP), Lugol e Vermelho de rutênio. Para a condução das demais avaliações, as sementes foram secas até 13% de umidade e armazenadas em ambiente 20° C e 55 % UR por 0, 3 e 6 meses. Foram então realizadas as seguintes avaliações: grau de umidade, massa da matéria seca, germinação, índice de velocidade de germinação, emergência de plântulas, condutividade elétrica e envelhecimento acelerado. Foram determinadas também a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT) e peroxidase (POX). Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema de parcelas subdivididas, com quatro repetições, sendo os quatro estádios de maturação das vagens alocados nas parcelas e os três períodos de armazenamentos das sementes (0, 3 e 6 meses) nas subparcelas. Os dados foram

submetidos à análise de variância e as médias obtidas para os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Foram observadas fissuras no tegumento das sementes obtidas de vagens marrons. A deposição de reservas de proteínas já havia iniciado no estágio verde e se manteve durante o desenvolvimento das sementes. A deposição de amido já havia cessado a partir do estágio verde. Sementes de lentilha obtidas de vagens amarelas apresentaram maior vigor em relação às sementes obtidas de vagens verdes e marrons. Para sementes de vagens marrons, o armazenamento por 6 meses reduziu a germinação. Houve maior atividade das enzimas antioxidantes CAT e POX em sementes obtidas de vagens amarelas quando comparadas às de vagens marrons; com aumento do tempo de armazenamento há redução da atividade da CAT.

ABSTRACT

CUNHA, Priscila Torres, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2018. **Physiological, biochemical and anatomical changes in lentil seeds in different maturation stages and submitted to storage.** Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

The lentil is a vegetable of annual cycle, belonging to the family Fabaceae. The Brazil imports almost all of the grain that consumption corresponding to 11,000 tons in 2015, representing a value of 10 million dollars. In our conditions, there is demand for information on seed production of lentils. Therefore, information about main changes during seed development process is importante to determine the ideal harvest time aiming high-quality seeds production. Considering that seeds can be sown soon after harvesting or stored for subsequent sowing, it is also important to know the storage potential of seeds harvested at different time. The objectives of the study were: (i) to evaluate the physiological, biochemical, anatomical and histochemical changes of lentil seeds harvested at different maturation stages; ii) to assess the physiological and biochemical changes during storage of lentil seeds. Lentil seeds, *cv. Precoz*, were produced in the experimental field of "Horta Nova" / DFT / UFV, Viçosa – MG, during the period of April to October of 2017. The pods were collected in four maturation stadiges: green, yellow-green, yellow and brown. After harvest, the seed moisture content and dry matter were determined. Anatomical and histochemical characterization of freshly harvested seeds were performed also and the sections were stained with Toluidine blue, Xylidine Ponceau, Lugol's iodine and Ruathenium Red and submitted to polarized light. Then, the seeds were dried until 13% moisture content and stored at 20° C and 55% RH for 0, 3 and 6 months. The following tests were performed: moiture content, germination, germination speed index, emergence of seedlings, electrical conductivity, accelerated aging and activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase - SOD; catalase -CAT and peroxidase - POX). A completely randomized design, in subdivided plots scheme, with four replicates were used. The four maturation stages were allocated in the plots and the three periods of storage in the subplots. The data were subjected to analysis of variance and the means were compared by Tukey's test ($p \geq 0.05$). It were observed cracks in the tegument of the seeds obtained from brown pods. The deposition of protein reserves had already started at green stage maintained during seed development. Starch reserves had already ceased at green stage. Lentil seeds obtained from yellow pods was more vigourous than seeds obtained from

green and brown pods. Seeds from brown pods showed reduction on germination at six months storage. There was greater activity of antioxidant enzymes CAT and POX in the seeds from yellow pods when compared to those from brown pods; there was reduction of CAT activity with the increase of seed storage time.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1. Produção das sementes em campo	5
2.2. Anatomia e histoquímica das sementes	6
2.3. Avaliação da qualidade fisiológica das sementes	7
2.4. Determinação da atividade de enzimas	9
2.5. Obtenção do extrato enzimático para determinação da atividade de enzimas antioxidantes	9
2.6. Delineamento e Análise estatística	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
3.1. Caracterização anatômica e histoquímica	11
3.2. Caracterização Fisiológica	19
3.3. Caracterização Bioquímicas	29
4. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

A lentilha (*Lens culinaris* Medik) é uma hortaliça de ciclo anual, pertencente à família Fabaceae, e está entre as cinco leguminosas mais importantes no mundo (Nascimento et al., 2016). Bastante utilizada nos países árabes (FAO 2014), a produção mundial de lentilha é de 4,8 milhões de toneladas (FAOSTAT 2016) estando concentrada na Ásia, principalmente na Índia e na Turquia. O Canadá também se destaca como país produtor e exportador da leguminosa.

A produção brasileira de lentilha ainda é pequena, fazendo-se necessária a importação para abastecer o mercado interno (Nascimento et al., 2016). O país importa do Canadá, Argentina e Estados Unidos quase à totalidade dos grãos destinados ao consumo. Em 2015, a importação foi de 11 mil toneladas, representando um valor de 10 milhões de dólares (MDIC/SECEX,2016).

A lentilha, cultura de inverno nos trópicos, é plantada desde o nível do mar até 3.800 m de altitude, e não se adapta aos trópicos úmidos (Vieira et al., 1999). A temperatura ideal para o cultivo situa-se entre 15 e 25° C (EMBRAPA, 1993).

Segundo Giordano et al. (1988), no centro-oeste do Brasil as áreas com altitudes acima de 800 m oferecem excelentes condições para o desenvolvimento dessa leguminosa em plantios realizados no mês de abril até a segunda quinzena de maio. Plantios mais tardios resultam em menor produtividade e maior risco de chuva durante a colheita.

Apesar do país apresentar condições favoráveis para o cultivo, só atualmente pesquisas vem sendo desenvolvidas visando disponibilizar cultivares adaptadas às nossas condições edafo-climáticas bem como tecnologia adequada para a produção. Neste contexto, pesquisas relacionadas à tecnologia de produção de sementes de lentilha também são importantes para a expansão da cultura, para disponibilizar no mercado sementes de alta qualidade. Dentre os fatores que determinam a qualidade das sementes destacam-se o estágio de maturação por ocasião da colheita e a sua longevidade durante o armazenamento.

O processo de desenvolvimento das sementes, desde a fertilização do óvulo até a maturidade da semente, envolve uma série de alterações físicas, anatômicas, fisiológicas e

bioquímicas. Segundo Marcos - Filho (2015), este processo pode ser dividido em três fases distintas: histodiferenciação, durante a qual são formados os tecidos da semente, sendo intensa a divisão e expansão celular; deposição de reservas, caracterizada pelo aumento progressivo da massa de matéria seca; e secagem ou dessecação, fase em que ocorre redução no teor de água das sementes e, conseqüentemente, nas atividades metabólicas.

Alguns parâmetros tecnológicos têm sido utilizados para monitorar e caracterizar o processo de maturação das sementes, destacando-se o teor de água, o tamanho, o conteúdo de matéria seca, a germinação e o vigor (Marcos-Filho, 2015). Assim, após a fertilização, há um rápido aumento no tamanho das sementes, atingindo o máximo em curto período de tempo em relação à duração total do processo. Ao final da maturação, o tamanho pode diminuir devido à secagem das sementes.

As sementes por serem dreno, recebem os produtos da fotossíntese, o que resulta em aumento no conteúdo de matéria seca, representada principalmente por proteínas, carboidratos e lipídios (Bewley e Black, 1994; Marcos-Filho, 2005). Nesta fase, o teor de água das sementes se mantém alto, decrescendo lentamente à medida que a água vai sendo substituída pelas reservas sintetizadas (Dias e Nascimento, 2006).

A maturidade fisiológica é atingida quando o conteúdo máximo de matéria seca é acumulado, quando cessa a translocação planta-semente (Botelho et al., 2010; Bolina et al., 2012). Paralelamente ao acúmulo de matéria seca, ocorre aumento da germinação e vigor, cujos valores máximos são atingidos próximo à maturidade fisiológica, podendo ocorrer um pouco antes ou um pouco depois, dependendo da espécie (Dias e Nascimento, 2006). A partir da maturidade fisiológica, o teor de água das sementes que ainda é alto decresce até entrar em equilíbrio com o ambiente, comportamento típico das sementes ortodoxas como a lentilha.

Durante a fase de acúmulo de reservas, sementes ortodoxas desenvolvem mecanismos para prevenir danos ocasionados pela desidratação dos tecidos. Dentre estes mecanismos destacam-se as proteínas *lea* (*late embryogenesis abundant*) e os açúcares solúveis (sacarose, estaquiose, rafinose, verbascose) que se acumulam no final da embriogênese, atingindo máxima concentração pouco antes da fase final de dessecação (Hincha e Thalhammer, 2012; Bewley et al., 2013; Silva et al., 2015). As proteínas *lea* são

altamente hidrofílicas, estáveis sob altas temperaturas e não têm ação catalítica, sendo importantes pela grande habilidade de atrair moléculas de água, mantendo a estrutura das membranas celulares (Battaglia e Covarrubias, 2013; Kaur et al., 2015). Os açúcares solúveis podem interagir com grupos hidrofílicos das membranas, atuando na sua preservação durante a desidratação (Corbineau et al., 2000; Corsato, 2014; Marcos-Filho, 2015).

A partir da maturidade fisiológica, as sementes ficam propensas ao processo de deterioração, cuja intensidade provoca redução significativa na germinação e no vigor (Marcos-Filho, 2015). Trata-se de um processo degenerativo, progressivo que acarreta uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e físicas como: desestruturação do sistema de membranas, redução de atividades de biossíntese, inativação de enzimas, perda de integridade do DNA, redução da atividade respiratória, redução da velocidade de germinação e tolerância ao estresse, menor taxa de crescimento de plântulas, redução da emergência em campo culminando com a morte da semente (Delouche e Baskin, 1973; Bewley e Black, 1994; Kumar, et al., 2014; Marcos-Filho, 2015).

Diversos autores referem-se à peroxidação de lipídios como a principal causa da deterioração de sementes como observado em sementes de girassol (Abreu et al., 2013), de soja (Carvalho et al., 2014) e de algodão (Oliveira et al., 2016). Este processo resulta da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são moléculas altamente reativas resultantes da redução do oxigênio molecular com consequente formação de produtos tóxicos, como o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Bailly, 2004; Bailly et al., 2008; Kumar et al., 2014). A intensidade de danos celulares é determinada pela habilidade das sementes de eliminar as EROs via sistema enzimático ou não enzimático. O sistema enzimático antioxidativo é composto por várias enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases (POX) (Mittler, 2002; Rajjou e Debeaujon, 2008). Em estudos com sementes de algodão (Goel et al. (2003), soja (Sung e Chiu, 1995), amendoim (Sung, 1996) e girassol (Bailly, 1996) observou-se redução na atividade dessas enzimas durante o processo de deterioração das sementes.

Considerando que o processo de deterioração das sementes inicia-se em campo a partir da maturidade fisiológica, conhecer o processo de maturação das sementes para definição da época ideal de colheita é fundamental para a qualidade das sementes,

especialmente para espécies de crescimento indeterminado como a lentilha. Nestas espécies, o florescimento é contínuo e a maturação é desuniforme, de modo que em uma mesma planta são encontradas vagens em diferentes estádios de maturação, dificultando determinar o ponto ideal de colheita.

A colheita precoce pode acarretar uma grande proporção de sementes imaturas, como verificado por Kathun et al. (2009) quando colheram vagens de lentilha com coloração verde amarela. Por outro lado, a permanência das sementes no campo por tempo acima do necessário pode acarretar sérios prejuízos à sua qualidade fisiológica e sanitária devido à deterioração. Assim, o estágio de maturação das sementes por ocasião da colheita é determinante para que atinjam germinação superior à exigida para a comercialização de lotes, interferindo também no seu potencial de armazenamento.

Os resultados de pesquisas relacionados à maturação de sementes de lentilha têm apontado a coloração das vagens como parâmetro para determinação do ponto de colheita. Kathun et al. (2009) realizaram a colheita das sementes a cada 7 dias considerando três estádios de maturação: quando a maioria das vagens apresentava coloração verde amarela ou amarela com manchas levemente marrons e vagens secas e completamente marrons. Os autores concluíram que sementes obtidas de vagens amarelas com manchas marrom claro tiveram maior germinação, crescimento de plântulas e vigor. Menor qualidade fisiológica foi observada nas sementes de vagens verde amarelas. Em outro experimento, Kathun et al. (2008) verificaram que a qualidade fisiologia das sementes colhidas da parte mediana da planta foi superior à das sementes da parte superior e inferior.. Mais recentemente, Subedi et al. (2017), avaliando o efeito da aplicação de dessecantes em campo na qualidade das sementes de lentilha, observaram que o paraquat não afetou a germinação e o vigor, ocorrendo efeito negativo do glifosate nestas características.

As mudanças que ocorrem durante o processo de deterioração estão diretamente relacionadas ao período e às condições de armazenamento, ocasionando a redução da velocidade e da uniformidade de emergência, refletindo no desenvolvimento das plantas no campo (Bingham; Harris; McDonald, 1994). Dessa maneira, o armazenamento após a colheita deve ser conduzido de maneira que possibilite reduzir as transformações bioquímicas que provocam a deterioração, além de evitar o desenvolvimento de insetos e microrganismos, os quais contribuem para a diminuição da qualidade fisiológica (Carvalho; Vilela, 2006).

Nas nossas condições, há demanda por informações para sementes de lentilha. Assim, considera-se importante, antes de se tentar definir o ponto ideal de colheita, conhecer e monitorar as alterações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas durante o processo de desenvolvimento e maturação das sementes. Considerando que as sementes podem ser semeadas logo após a colheita ou então armazenadas para posterior semeadura, é importante também conhecer o potencial de armazenamento de sementes colhidas em diferentes estádios de maturação.

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar as alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas de sementes de lentilha colhidas em diferentes estádios de maturação e avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de lentilha cultivar Precoz submetidas ao armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se sementes de lentilha (*Lens culinaris* Medick) da cultivar Precoz, fornecidas pela Embrapa Hortaliças

2.1. Produção das sementes em campo

O campo de produção de sementes foi instalado na área experimental da Universidade Federal de Viçosa denominada “Horta Nova”, localizada no distrito de São José do Triunfo, Viçosa-MG. O município de Viçosa localiza-se na Zona da Mata de Minas Gerais, a 689,7 m de altitude e coordenadas geográficas 20° 45’ de latitude Sul e 42° 51’ de longitude Oeste (IBGE, 1991). Conforme a classificação climática de Köppen, o clima regional é do tipo Cwb, mesotérmico úmido com verões chuvosos e invernos secos (Vianello e Alves, 1991). Dados climatológicos (boletim climatológico) indicam umidade relativa do ar em torno de 80% e temperatura média durante o período de plantio até a última colheita das sementes de lentilha variando entre 22,9 °C para a máxima e 12,0 °C para a mínima.

Após o preparo convencional do solo, foi feita a semeadura no dia 06 de abril de 2017. A semeadura foi realizada em sulcos de 21 m de comprimento espaçados de 0,20 m, com densidade de 40 plantas/m linear de sulco. Antes da semeadura, foi feita a adubação

de plantio baseada nos resultados da análise de solo, seguindo-se as recomendações técnicas para cultura (Nascimento et al., 2016) Os tratos culturais foram realizados conforme recomendações para a cultura (Giordano et al, 1988), com irrigação por aspersão sempre que necessário e cessando durante a colheita das sementes.

Durante o florescimento, as flores foram marcadas por ocasião da antese para se determinar o número de dias após a antese (DAA) necessários para se obter vagens com coloração externa super verde (SV), verde (V), verde-amarelo (VA), amarelo (A), marrom (M) e vagens abertas (AB) usando um colorímetro para identificação e padronização das cores. Foram então colhidas vagens nos seguintes estádios de maturação: verde (V), verde-amarelo (VA), amarelo (A) e marrom (M) para a realização das análises anatômicas, histoquímicas, fisiológicas e bioquímicas.

Após a colheita, foi feita a debulha manual das sementes e parte das sementes de cada tratamento foi separada para caracterização anatômica e histoquímica descrita no item 3.1. As demais sementes foram colocadas para secar em condições de ambiente de laboratório (temperatura de 20° C e UR 55%) até atingirem teor de água de aproximadamente 13 %. Em seguida, essas sementes foram acondicionadas em sacos de papel kraft multifoliado e armazenadas por 0, 3 e 6 meses em temperatura ambiente de laboratório (20° C e UR 65%). Após cada período de armazenamento, as sementes foram submetidas a avaliações da qualidade fisiológica conforme os testes descritos no item 3.2.

2.2 Anatomia e histoquímica das sementes

As avaliações foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais. Foram retiradas amostras de sementes obtidas nos diferentes estádios de desenvolvimento, que foram fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% (5:5:90 v/v) (FAA 50) por 48 h (Johansen, 1940).

As amostras foram mantidas sob vácuo e, posteriormente, foram submetidas à desidratação em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin - Leica®), conforme indicações do fabricante. Secções transversais da porção mediana das sementes com 5µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica) e submetidas a avaliação das características anatômicas. Para

caracterização anatômica, os cortes foram corados com Azul de toluidina (O'Brien et al., 1964) e montado sob lamínula com resina sintética (Permount).

Para a histolocalização dos compostos de reserva no material incluído em resina: reagente de Lugol (Johansen, 1940) para amido e xilydine Ponceau (Vidal, 1970) para proteína. As avaliações histoquímicas foram realizadas em microscópio de luz (modelon AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan), acoplado à câmara fotográfica digital (modelo Zeiss Axio CamHRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

Logo após a colheita, as vagens foram dispostas em bandejas e colocadas para secar à sombra por 72 h. Foi feita a debulha manualmente e as sementes de cada tratamento foram colocadas para secar em condições de ambiente de laboratório (temperatura de 20° C e UR 55%) até atingirem teor de água de aproximadamente 13 %. Para acompanhar a perda de água das sementes, pesagens periódicas foram realizadas e, os resultados, aplicados na equação sugerida por Cromarty et al. (1985):

$$M_i (100 - U_i) = M_f (100 - U_f)$$

onde: M_i é a massa inicial das sementes; U_i é umidade inicial das sementes; M_f é a massa final das sementes (após secagem) e; U_f é umidade final das sementes (após secagem).

Atingido o grau de umidade desejado, as sementes foram, então, acondicionadas em sacos de papel multifoliado e armazenadas por 0, 3 e 6 meses em temperatura ambiente de laboratório (20° C e UR 55%). A cada período de armazenamento, as sementes foram submetidas a avaliações da qualidade fisiológica conforme os testes descritos no item 2.3., sendo também conduzidas análises bioquímicas da atividade de enzimas (item 2.4.)

2.3. Avaliação da qualidade fisiológica das sementes

A qualidade das sementes foi avaliada no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia da UFV pelos testes descritos a seguir.

Grau de umidade – foi determinado conforme metodologia prescrita nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), pelo método da estufa, a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, durante 24

horas, utilizando-se quatro repetições de 25 sementes, sendo os resultados expressos em porcentagem (base úmida).

Massa da matéria seca - foi determinado juntamente com o grau de umidade das sementes (Brasil, 2009), consistindo do peso médio final das quatro repetições de 25 sementes após secagem a $105^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Os resultados foram expressos em mg/semente.

Germinação: foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, semeadas em rolos de papel toalha do tipo germitest, umedecidos com água destilada na quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e mantidos em germinador regulado a temperatura de 20°C . Foram realizadas contagens no quinto e décimo dia após a semeadura (Brasil, 2009), sendo os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais obtidas.

Índice de velocidade de germinação (IVG): conduzido conjuntamente com o teste de germinação descrito acima, realizando-se contagens diárias do número de plântulas normais obtidas. O IVG foi calculado conforme Maguire (1962).

Envelhecimento acelerado: as sementes foram distribuídas em camada única sobre tela metálica fixada no interior de caixas plásticas do tipo gerbox, contendo, no fundo, 40 mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), na proporção de 40g de NaCl para 100 mL de água. As caixas foram tampadas e mantidas em incubadora tipo B.O.D. à temperatura de 41°C , por 48 horas (Freitas e Nascimento, 2006). Após este período, quatro repetições de 50 sementes foram submetidas ao teste de germinação como descrito acima, computando-se a porcentagem de plântulas normais obtidas no quinto dia após a semeadura (Brasil, 2009).

Condutividade elétrica: foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes pesadas em balança com precisão e colocadas para embeber em copos plásticos contendo 75 mL de água deionizada. As sementes foram mantidas em B.O.D, à temperatura constante de 25°C (Torres et al., 2009), onde permaneceram por 16 horas, tempo este definido após realização da curva de embebição das sementes. Após este período, a condutividade elétrica foi determinada em condutivímetro, sendo os resultados expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

Emergência de plântulas: foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes em sala de crescimento. A semeadura foi realizada a 1,0 cm de profundidade em mistura de solo e areia na proporção 1:1, contida em bandejas de isopor. As contagens diárias foram realizadas após a emergência da primeira plântula até a estabilização do número de plântulas emergidas .

2.4. Determinação da atividade de enzimas

Inicialmente foi obtida a curva de embebição das sementes em água para se determinar o tempo ideal de embebição para as determinações enzimáticas. Para tanto, foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento, colocadas para embeber em rolo de papel toalha umedecido com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco e mantidos em germinador a 20 °C. As sementes foram pesadas antes do início da embebição e após intervalos de tempos regulares: primeiramente a cada 2 horas nas seis primeiras horas de embebição; em seguida, a cada 3 horas durante 6 horas; de 6 em 6 horas por 12 horas; e de 12 em 12 horas até ocorrer a estabilização da embebição. Ao final de cada tempo, as sementes eram retiradas, enxugadas com papel toalha e pesadas, para obtenção do peso úmido. O incremento percentual foi calculado ao longo do tempo, obtido por meio do quociente entre a massa fresca inicial e a massa fresca final (JUSTO, 2007) conforme a fórmula:

$$100 * (Pf-Pi)/pi$$

onde, Pf representa o peso final das sementes a cada tempo e Pi o peso inicial das sementes antes da embebição.

Estas determinações foram realizadas no Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal na UFV. Foram utilizadas dez sementes de cada estágio de maturação que foram colocadas para embeber por 16 h, tempo este definido após se obter a curva de embebição das sementes em água. Após esse período, o tegumento das sementes foi retirado com o auxílio de um bisturi.

2.5. Obtenção do extrato enzimático para determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Para a obtenção dos extratos enzimáticos brutos para as determinações da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (POX)), o material vegetal foi congelado em nitrogênio líquido e mantido em freezer à temperatura de -80°C . Posteriormente, foram macerados cerca de 0,500 g de material vegetal. Foram então adicionados 2 mL de meio de extração, tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 6,8) ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Em seguida, foi feita uma centrifugação a 15.000 xg por 15 minutos, a 4°C para retirada da camada de óleo do sobrenadante.

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão. 100 μL do extrato enzimático foi adicionado a 1 mL do reagente de Bradford, seguido de agitação. Após 20 minutos, foi realizada a leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro a 595 nm.

Superóxido dismutase (SOD): foi determinada de acordo com o protocolo proposto por Del Longo et al. (1993) por meio da adição do extrato enzimático bruto a um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) $75\mu\text{M}$, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM . A reação foi conduzida e a atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

Catalase (CAT): foi determinada de acordo com o protocolo proposto por Havir e Mchale (1987), por meio da adição do extrato enzimático bruto ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995) e os resultados expressos em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$ proteína.

Peroxidases (POX): foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio (25 mM, pH 6,8), pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM (Kare e Mishra, 1976). Durante dois minutos de reação, foi observado o aumento da absorbância no comprimento de onda de 420 nm, a 25°C . A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de

extinção molar de 2,47 mM L⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em μmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

2.6. Delineamento e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em parcelas subdivididas com quatro repetições. Os valores obtidos para cada variável foram submetidos a testes de normalidade Shapiro - Wilk para os resíduos e homogeneidade das variáveis. Os dados foram então submetidos à análise de variância sendo os quatro estádios de maturação das vagens (verde, verde amarelo, amarelo e marrom) alocados nas parcelas e os três períodos de armazenamentos das sementes (0, 3 e 6 meses) nas subparcelas. As médias obtidas para os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram processadas no SISVAR (Ferreira, 2012). Para os resultados referentes à caracterização anatômica foi feita a análise descritiva.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização anatômica e histoquímica

Os resultados obtidos para as análises anatômicas, grau de umidade e massa de matéria seca são referentes apenas às sementes recém-colhidas (época 0 de armazenamento). A Figura 1 (A e B) ilustra o experimento de campo para a produção de sementes de lentilha. Na Figura 1 C observa-se a marcação de flor feira por ocasião da antese. As vagens colhidas em diferentes estádios de maturação caracterizados pela sua coloração externa e número de dias após a antese (DAA) são ilustradas na Figura 1 D. Na Figura 1 E é possível observar às sementes de lentilha obtidas de vagens de cada um dos estádios de maturação: aos 15 DAA (vagens verde e pouco desenvolvidas), aos 25 DAA as sementes obtidas de vagens verdes, 30 DAA as sementes obtidas de vagens verdes amarelas, aos 35 DAA sementes obtidas de vagens amarelas e 40 DAA sementes obtidas de vagens marrons e aos 45 DAA (vagens deiscentes). Verificou-se que as sementes obtidas de vagens verdes colhidas antes de 25 DAA não germinaram e aos 45 DAA já era nítida a ocorrência de deiscência das vagens.

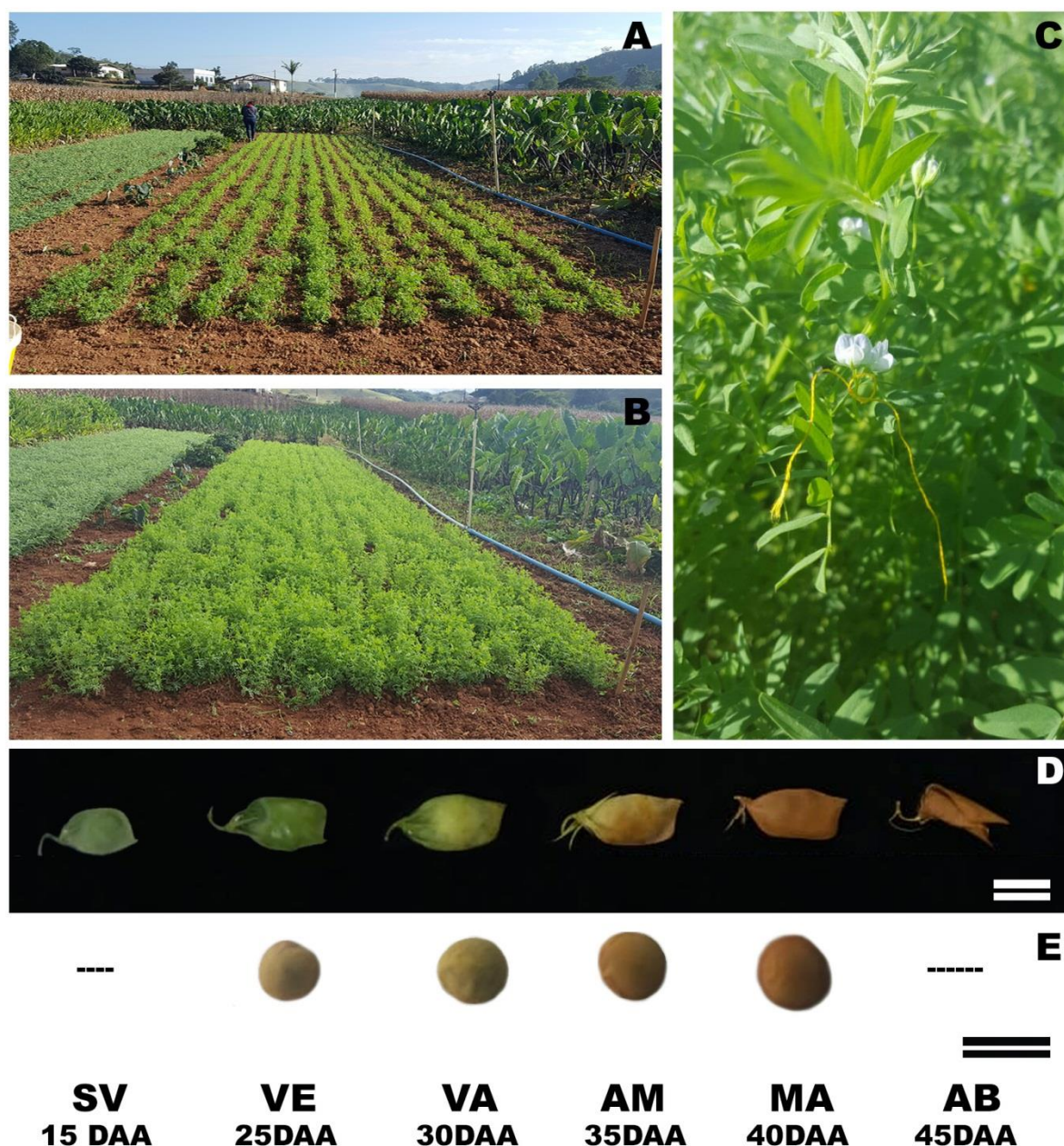


Figura 1. Campo de produção de sementes de lentilha (A e B). Flores de lentilha marcadas no dia da antese (C). Vagens de lentilha colhidas em diferentes estádios de maturação (DAA) e sementes obtidas das respectivas vagens, Super verde (SV), verde (VE) Verde/amarela (VA), amarelas (AM), marrom (MA) e vagens abertas (AB). Barra corresponde a 1 cm.

As principais estruturas das sementes de lentilha foram ilustradas na Figura 2 D. A semente é constituída por tegumento, cotilédones e embrião. Trata-se, portanto, de uma semente exalbuminosa. O tegumento de leguminosas, geralmente é formado por células do parênquima com uma camada externa de esclerênquima e um sistema vascular (Dongen et al., 2003).

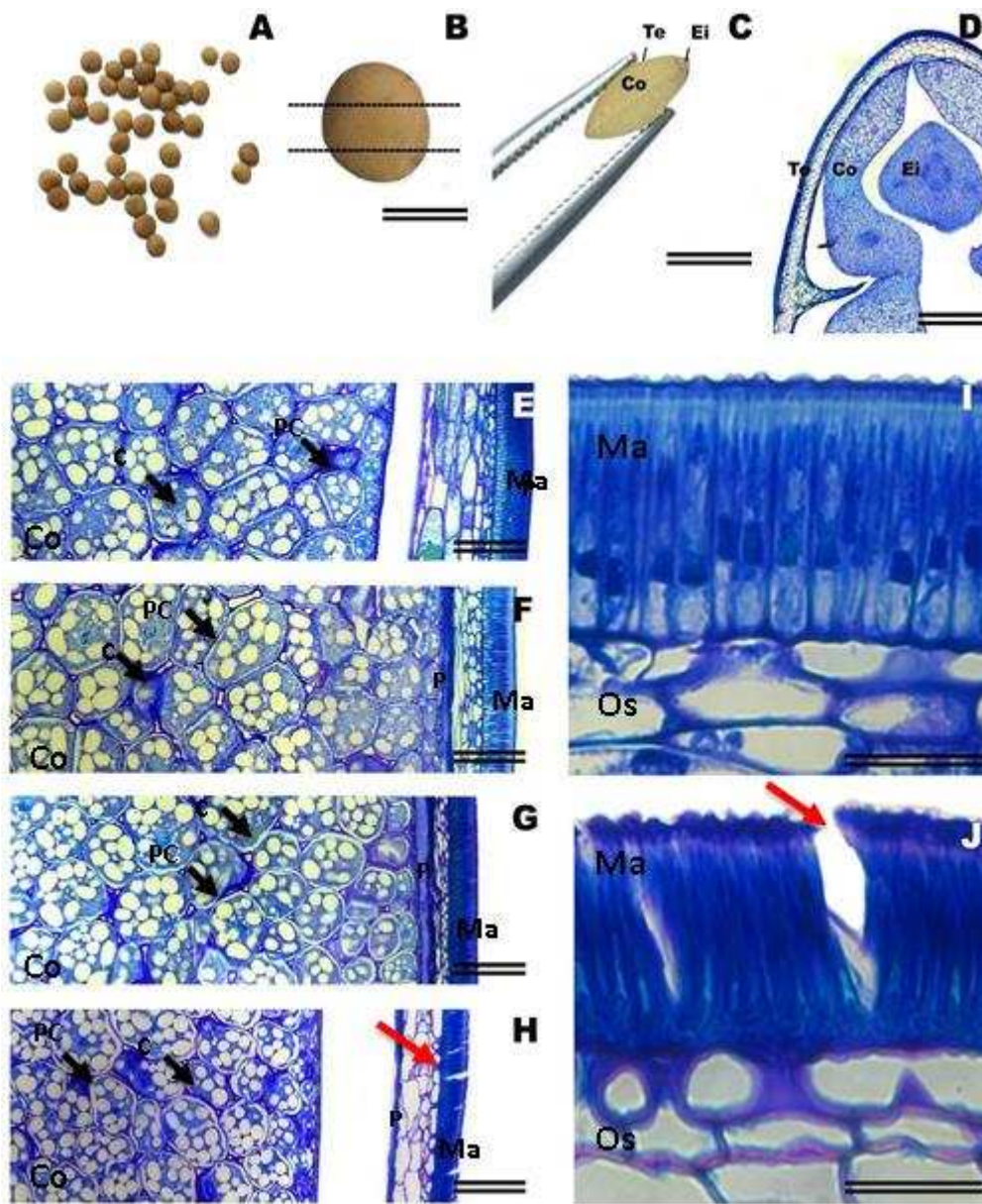


Figura 2: Corte da semente de lentilha para caracterização anatômica e histoquímica (B). Principais estruturas das sementes de lentilha (C) e (D). Seções transversais, corados com Azul de Toluidina em diferentes estádios de desenvolvimento verde (E); verde-amarelo (F); amarelo (G); marrom (H) Co: cotilédone; Te: tegumento interno ; Ei: eixo embrionário . Barra 1cm.

O estudo das células que compõem o tegumento torna-se importante porque é por meio desse tecido que a água atinge o embrião das sementes de grande parte das leguminosas (Chachalis e Smith, 2000). Sementes de leguminosas são tipicamente testais,

produzidas por óvulos bitegmentados, em que, com frequência, ocorre a redução do tegumento interno (tégmen) (Corner, 1976). A exotesta é constituída por uma camada de macroesclereídes, que não sofrem lignificação (Figura 2E, 2F, 2G e 2H), e cuja composição é basicamente de celulose, pectinas e hemicelulose. Esta inferência é baseada na metacromasia do corante azul de toluidina apresentada na Figura 2.

A coloração azulada e arroxeadada das paredes retrata a presença de celulose e pectinas, enquanto a coloração mais clara ou falta de coloração na porção mais externa dos macroesclereídes sugere a composição desigual da parede, que nesta região apresenta maior proporção de hemicelulose que não reage com o azul de toluidina. Ao longo do desenvolvimento observa-se que esta camada de macroesclereídes sofre o espessamento da parede dos estádios verde (Figura 2I) até estágio marrom (Figura 2J).

Esta diferença de composição e espessamento contribui para a ocorrência e fissuras nesta camada do tegumento (Figuras 2H e 2J). O fato de estas fissuras serem observadas em sementes do estágio amarelo e estágio marrom são coerentes com a hipótese de que uma combinação de fatores colabora para ocorrência das fissuras. Dentre estes fatores relaciona-se o aumento da dureza das estruturas internas das sementes relacionadas á deposição de reservas, á dessecação da semente e o espessamento e constituição diferenciada das células mais externas do tegumento da semente. Este conjunto resulta provavelmente em um aumento da tensão nestas células, que associado á perda de água, ocasiona as fissuras do tegumento.

É possível observar que estas fissuras ocorrem de forma generalizada ao longo de todo tegumento das sementes obtidas de vagens marrons (Figura 3A), com perda de conjunto de esclereídes, facilitando o aporte de água para germinação ou facilitar o desenvolvimento de microrganismo oportunistas, o que contribui para a redução da qualidade das sementes.

O tegumento apresenta uma segunda camada celular, composta por osteosclereídes (Figuras 2E e 2J). Semelhante á camada superior do tegumento, estes osteosclereídes carecem de lignificação da parede, que de acordo com a coloração de toluidina, indica uma maior proporção de pectinas dentre os demais componentes estruturais de parede.

Outras camadas de natureza parenquimática são observadas na porção interna do tegumento (Figuras 2E e 2H). Estas camadas de parênquima podem passar a eventualmente apresentar uma função estrutural onde as camadas celulares voltadas para os cotilédones se encontram colapsadas que é observado com maior frequência a partir do estágio amarelo. Novamente, concomitantemente com a perda de água das sementes e deposição de reservas esta camada pode funcionar como uma camada com potencial para aliviar eventuais impactos mecânicos à semente.

Corner (1976), descreveu extensa publicação sobre anatomia das sementes de dicotiledôneas. Em soja, por exemplo, à medida que se avança o estágio de maturação da semente, verifica-se progressiva lignificação das macroesclereídes. Esse comportamento pode ser verificado pela reação do azul de toluidina com a lignina, que cora de azul claro. Sementes de soja com maior teor de lignina no tegumento possuem qualidade fisiológica superior àquelas com menor teor de lignina. Esse comportamento ocorre devido à proteção mecânica conferida por esse composto e, conseqüentemente, menor deterioração das sementes (Menezes et al., 2009).

O acúmulo de compostos de reserva durante o desenvolvimento de algumas sementes ocorre principalmente nos cotilédones (Borek et al., 2013) este comportamento também pode ser observado para a sementes de lentilha (Figura 3A). Em espécies exalbuminosas é comum o amido constituir-se no principal composto de reserva, seguido de proteínas e, em menor proporção, de lipídios (Nakamura e Oliveira, 2005), nesse trabalho não foi possível observar presença de lipídios, devido à reação negativa com os reagentes Sudan red e Sudan Black.

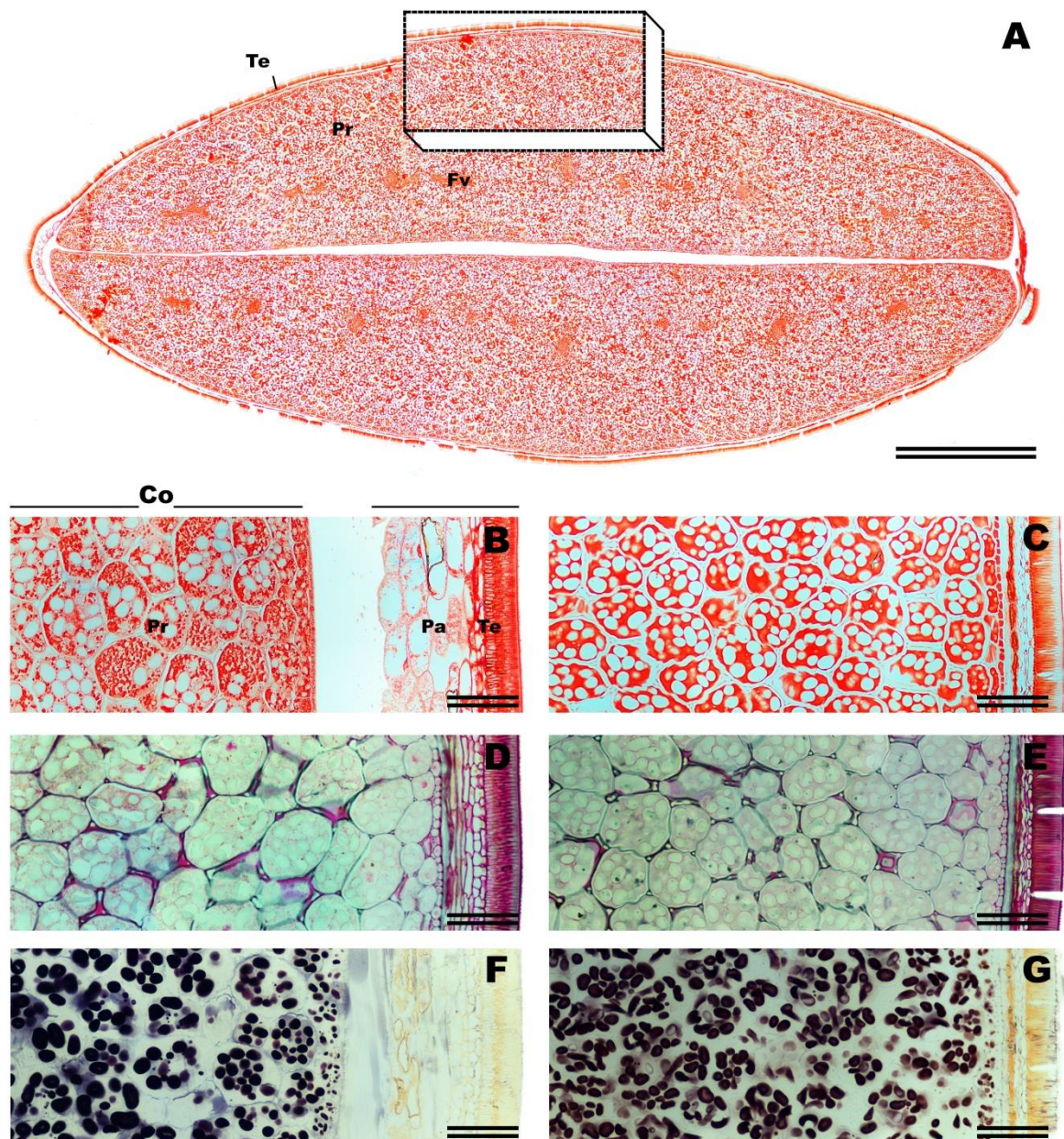


Figura 3. Histoquímica da semente de lentilha. Testes de XP (proteína), vermelho de rutênio (carboidratos e pectinas) e lugol (amido) para os estádios de desenvolvimento verde (V); verde/amarelo (VA); amarelo (A) e marrom (M).

Os resultados dos testes histoquímicos evidenciam a localização das reservas nos cotilédones das sementes de lentilha (Figura 3A). Os testes de floroglucina para lignina e sudan III e sudan black para lipídeos foram negativos. Esses resultados confirmam a

ausência da lignificação das camadas celulares do tegumento, o que implica em uma função diferenciada deste tegumento para as sementes de lentilha, onde a resistência mecânica passou a ter uma menor importância.

Observa-se maior presença de proteínas nas camadas de esclereídes e o parênquima mais periférico do tegumento no estágio verde (Figura 3B). Este conteúdo de proteínas é menor nos estágios mais avançados de maturação da semente, como estágio marrom (Figura 3C).

Os corpos proteicos são evidentes e isolados e provavelmente menores nos dois primeiros estágios de maturação (verde e verde-amarelo), enquanto nos dois últimos (amarelo e marrom) o citoplasma é mais denso e os corpos proteicos não podem, mas ser individualizados com a reação de XP (Figura 3C)

Com o processo de desenvolvimento das sementes ocorre deposição de pectina sobre a camada de macroesclereídes do tegumento (Figura 3D e 3E) havendo uma fina camada que apresentou reação positiva com o vermelho de rutênio, indicando presença de substâncias pectínicas.

As pectinas são polissacarídeos ramificados, altamente hidratados e heterogêneos, constituídos por ácido galacturônico (Carpita e McCann, 2000). Têm papel fundamental no transporte de íons, além de determinar a porosidade da parede e regular a adesão célula-célula por meio da lamela média, participando, ainda, da defesa celular, entre outras funções. (Carpita e McCann, 2000).

A presença de pectinas nas camadas celulares do tegumento e das células de parênquima de reserva do mesofilo dos cotilédones é evidenciada em todos os estágios de desenvolvimento das sementes de lentilha (Figura 3D e 3E). A constituição diferenciada da parede dos esclereídes também pode ser observada quando a reação com vermelho de rutênio, a camada mais externa da parede dos macroesclereídes é menos corada no estágio verde (Figura 3D) e é mais homogênea no estágio marrom (Figura 3E).

A presença de proteínas e a maior proporção de pectinas na constituição da parede destas células remetem à possibilidade de que estas células do tegumento mantenham-se vivas por maior período de tempo se comparadas às sementes de outras espécies vegetais.

Em Fabaceae, a principal resistência à entrada de água é conferida pela testa, pois, com a ruptura desta camada, ocorre rápida absorção de água, iniciando-se a germinação (Montardo et al., 2000). As expansões e contrações, em decorrência das variações da temperatura e da umidade relativa do ar, podem causar rupturas no tegumento das sementes, por tratar-se de um tecido pouco elástico (Marcos Filho, 2015). Esse fenômeno pode ter contribuído para a formação das fissuras observadas nas sementes de vagem marrom, uma vez que permaneceram expostas às condições adversas do campo por um período maior (Figura 2J).

As fissuras ocorrem quando as células da superfície da semente expandem-se, exercendo uma compressão. Ou ainda, quando as células da região interna contraem-se e desenvolvem uma tensão sobre a porção interna, a partir do gradiente de pressão decrescente na semente após o período de rápida secagem. O efeito da temperatura sobre a ocorrência de fissuras é indireto, pois influencia na mudança da umidade relativa do ar e pressão de vapor e, conseqüentemente, no teor de água das sementes (Kunze, 1979).

Mertz et al., (2009) trabalhando com diferenças estruturais de tegumento de soja, observaram que rachaduras podem ocorrer devido à alta susceptibilidade do tegumento das sementes a danos causados pelas flutuações na umidade, pois até mesmo nesse caso, onde as sementes foram produzidas em casa de vegetação e colhidas manualmente, o tegumento mostrou-se altamente frágil, com grande parte das sementes apresentando rachaduras.

Durante o processo de maturação, à medida que ocorre o acúmulo de matéria seca, a água é substituída pelas substâncias de reserva que vão sendo sintetizadas pelas sementes em desenvolvimento. As sementes de lentilha são ricas em proteínas (22-35%), carboidratos complexos, amido (44-48%), fibra alimentar (12-15%), minerais essenciais potássio, ferro, cálcio, fósforo (Mirali et al., 2017).

O resultado do teste com o reagente de Lugol evidenciou a presença de amido nas sementes de todos os estádios de maturação (Figura 3F e 3G). Conforme Zeeman et al. (2010), o amido pode ser acumulado transitoriamente em algumas células, em estádios de desenvolvimento específicos. O amido presente nos estádios mais iniciais de maturação provavelmente foi convertido em outros compostos, como açúcares solúveis. O amido transitório é utilizado como fonte principal de carbono na divisão, expansão e

diferenciação de células (Jordy, 2004). É também utilizado como fonte de carbono para a síntese de outros compostos de reserva como proteínas e lipídios, ou ainda como fonte de energia para o metabolismo celular (Andriotis et al., 2010).

3.2. Caracterização Fisiológica

Para todas as variáveis houve interação entre estádios de maturação e tempos de armazenamento.

Os resultados referentes ao grau de umidade das sementes mostram um decréscimo significativo com o avanço do desenvolvimento das sementes, com valores de 54%, 36%, 23% e 18 % referentes aos estádios de maturação verde, verde amarelo, amarelo e marrom, respectivamente (Figura 4).

O alto teor de água na fase inicial de maturação é vital para a expansão celular (Bewley et al., 2013), além de ser importante por permitir a translocação de compostos, tendo em vista que a transferência de metabólitos da planta para as sementes é realizada em meio líquido (Marcos - Filho, 2005). Araújo et al. 2018 estudando a época de colheita e armazenabilidade de sementes de *Crotalaria juncea* L. relatou valores diferentes no teor de água, devido à não uniformidade da floração e maturação das vagens. Khatun et al. (2009) observaram maior grau de umidade das sementes de lentilha obtidas de vagens verdes em relação às de vagens marrons e secas. O monitoramento de grau de umidade das sementes é importante para monitorar o entendimento do processo de maturação (Marcos - Filho, 2005).

Concomitantemente ao decréscimo do grau de umidade durante a maturação, houve aumento no conteúdo de massa seca das sementes até o estágio verde-amarelo (Figura 5). Apesar dos maiores valores para os estádios amarelo e marrom, o conteúdo de massa seca nestes estádios não diferiram significativamente entre si e foram superiores às dos demais estádios. O menor conteúdo de massa seca ocorreu nas sementes de vagens verdes.

Observa-se ainda que, praticamente não houve acréscimo significativo na massa seca das sementes do estágio amarelo para o marrom, indicando não ter havido mais translocação de assimilados da planta para as sementes. Nestes estádios, verifica-se, pelos

valores do teor de água das sementes (23% e 18%, respectivamente), que as mesmas já se encontravam na fase final de maturação quando ocorre secagem. O máximo acúmulo de matéria seca é um indicativo de que as sementes atingiram a maturidade fisiológica, quando não há mais translocação de assimilados da planta para as sementes (Marcos - Filho, 2015). A partir desse momento, as sementes de espécies ortodoxas, iniciam o processo de secagem em campo até atingirem um teor de água compatível para a colheita.

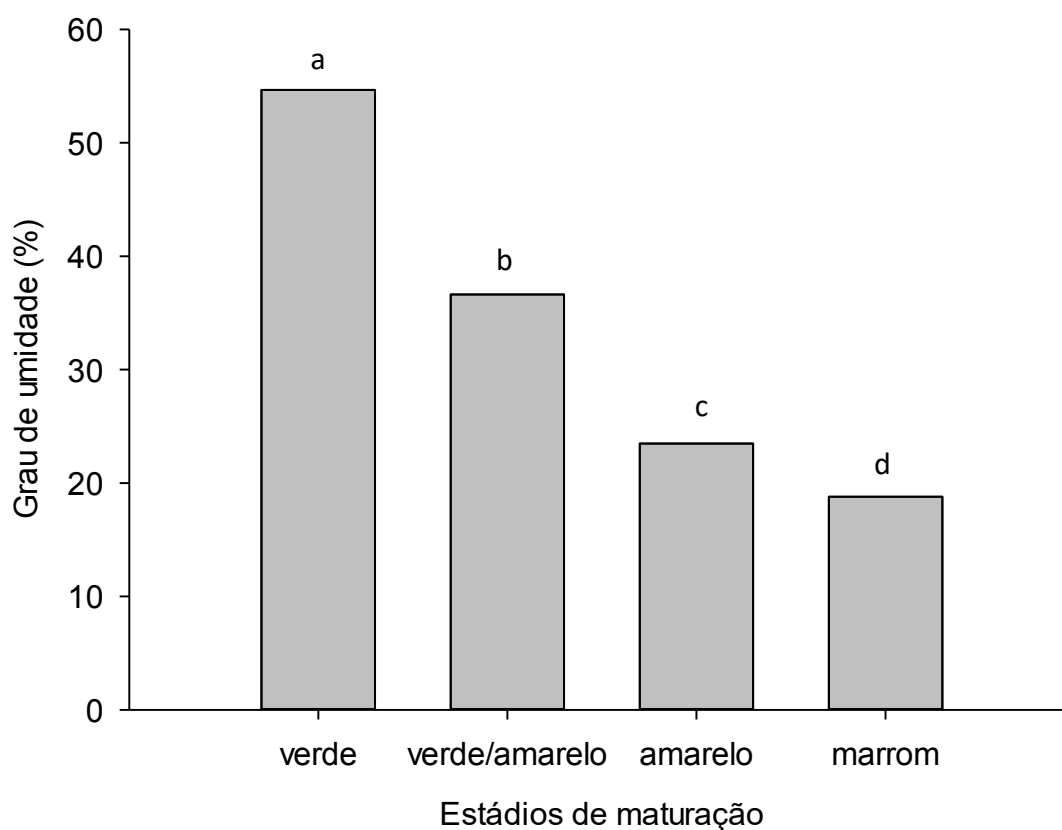


Figura 4. Grau de umidade das sementes de lentilha obtidas de vagens em diferentes estádios de maturação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

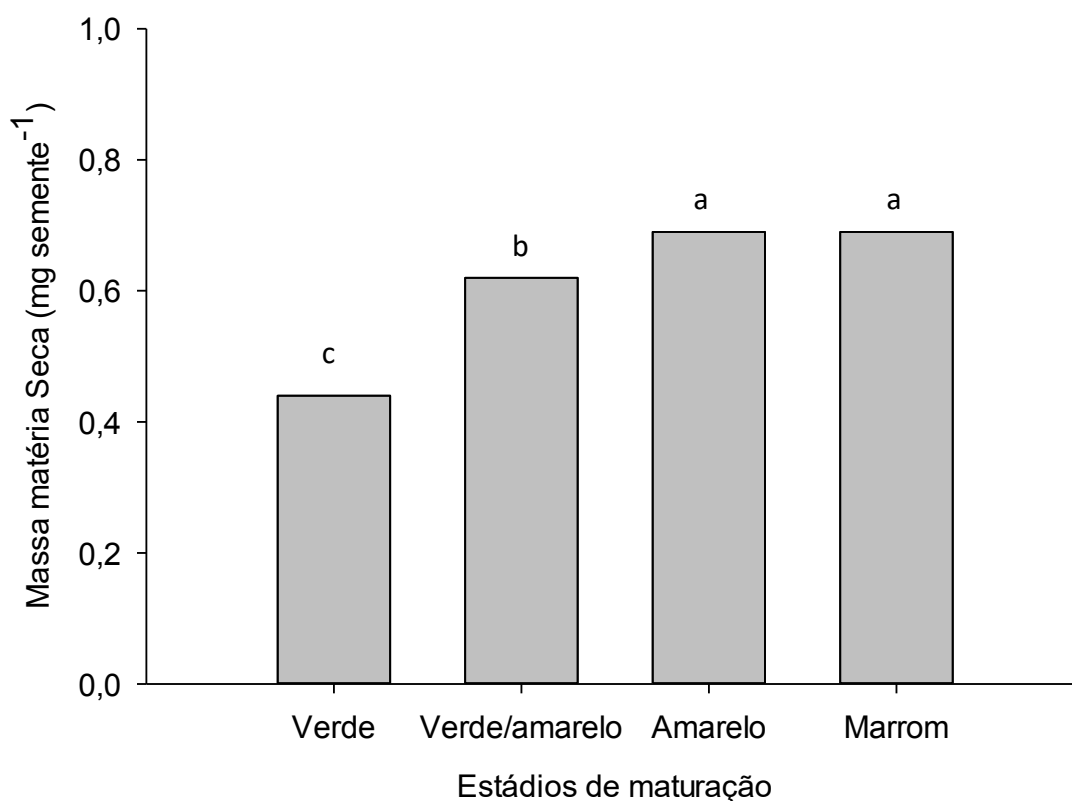


Figura 5. : Massa seca de sementes de lentilha obtidas de vagens em diferentes estádios de maturação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

O comportamento para a germinação das sementes, obtidos antes e após o período de armazenamento, encontra-se representados na Figura 6. Verifica-se que as sementes de todos os estádios de maturação não diferiram significativamente entre si aos 0, e 3 meses de armazenamento (Figura 6). Apenas aos 6 meses de armazenamento houve diferença na germinação com menores valores para sementes de vagens marrons e maiores valores para as de vagens amarelas, sendo que as sementes de ambos os estádios não diferiram estatisticamente das sementes dos estádios verde e verde amarelo. Kanthun et al. (2009) observaram menor germinação para sementes de lentilha obtidas de vagens verde amareladas quando comparadas com as de vagens marrons e secas, e atribuíram este resultado à alta proporção de sementes imaturas e mal formadas (Kathun et al., 2009). No presente trabalho, os dados evidenciam que mesmo nas sementes obtidas de vagens verdes o embrião já apresentava capacidade de germinar, o que pode ser explicado pela estrutura bem formada e por já possuírem quantidades suficientes de reservas para serem

mobilizadas durante a germinação, o que foi possível observar nas fotomicrografias de luz antes do armazenamento (Figuras 3A).

Observa-se, contudo, que a germinação das sementes de todos os estádios foi relativamente alta, acima de 80%, o que pode ser atribuído ao fato de que a secagem das sementes foi feita no interior das vagens, conforme relato de alguns autores. Em soja (Adams e Rinne, 1981; Morais et al., 2001a) e feijão caupi (Morais et al., 2001b), quando a secagem das sementes foi realizada no interior da vagem a germinação foi preservada, a secagem da vagem em ambiente permite que as sementes em seu interior completem a expansão, mantém a atividade enzimática, algumas proteínas são modificadas e impõe-se o processo de maturação nas sementes imaturas. (Nakagawa et al., 2005). Comparando-se os períodos de armazenamento (Figura 6), verifica-se que não houve diferença na germinação das sementes os diferentes estádios ao longo do armazenamento, exceto para sementes de vagens marrons cuja germinação caiu aos 6 meses de armazenamento.

Embora, as sementes obtidas de vagens verdes mantivessem a capacidade de germinar, o vigor não foi inferior se comparado as sementes obtidas de vagens amarelas.

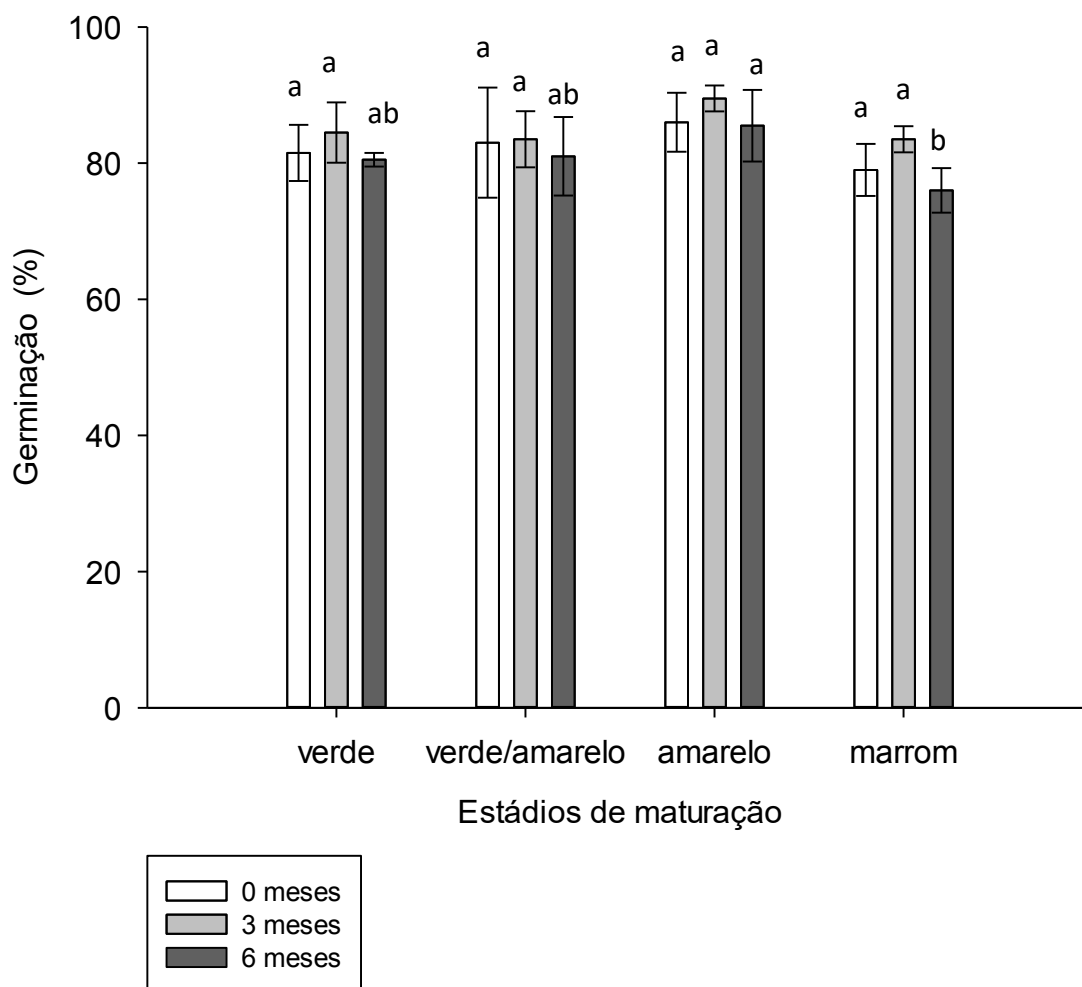


Figura 6: Germinação (%) de sementes de lentilha obtidas de vagens em diferentes estádios de maturação durante o armazenamento por 0, 3 e 6 meses. . Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e comparam estádios de maturação em cada período de armazenamento. Erros-padrão comparam períodos de armazenamento dentro de cada estágio de maturação.

O vigor determinado através do índice de velocidade de germinação (IVG) foi maior para sementes obtidas de vagens amarelas no início do armazenamento (época 0) (Figura 7). Aos 3 meses de armazenamento não se verificou diferença significativa para o IVG ao longo do desenvolvimento. Aos 6 meses de armazenamento houve uma redução do IVG para todos os estádios de maturação. Resultado semelhante foi observado em sementes de feijão ao longo do armazenamento, diminuição do vigor manifestou-se pela redução na velocidade de germinação das sementes (Santos et. al., 2005).

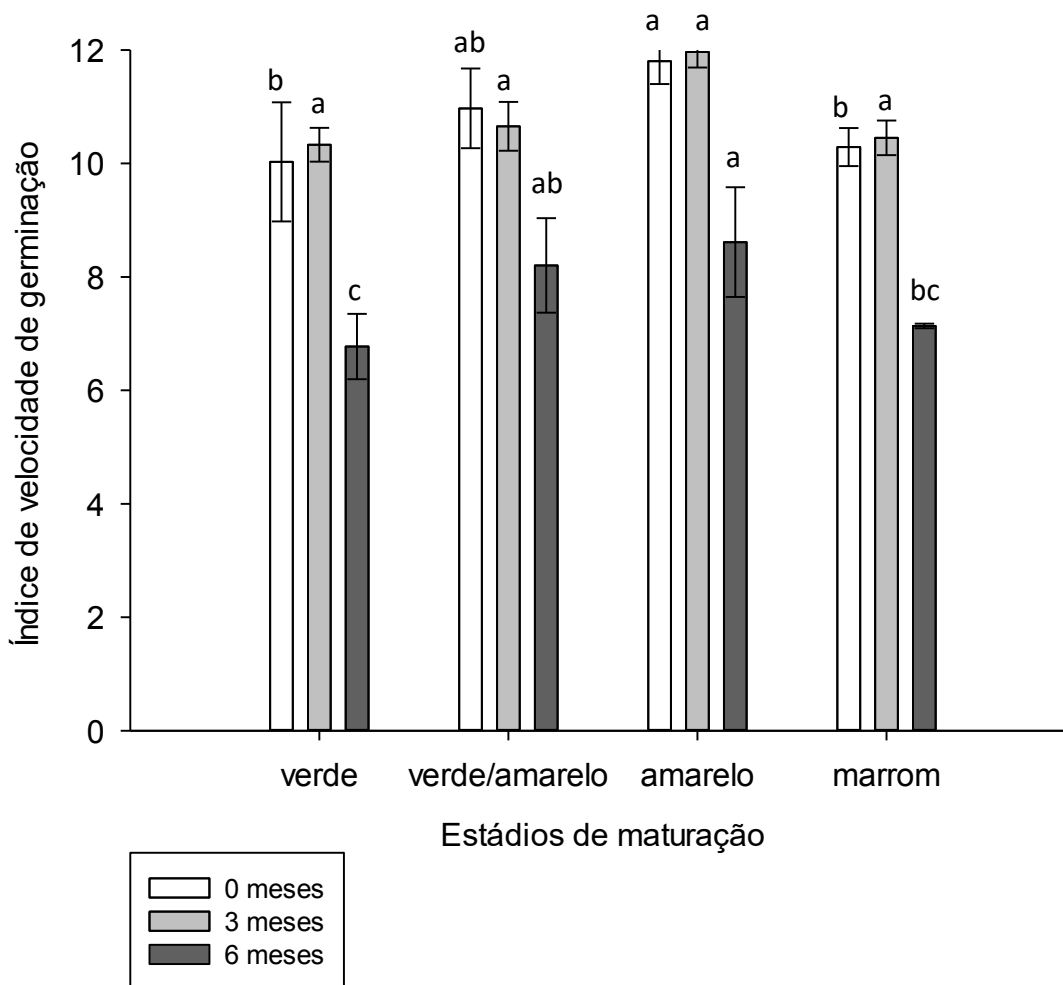


Figura 7: Índice de velocidade de germinação de sementes de lentilha colhidas em diferentes estádios de maturação, durante o armazenamento por 0, 3 e 6 meses. Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e comparam estádios de maturação em cada período de armazenamento. Erros-padrão comparam períodos de armazenamento dentro de cada estágio de maturação.

A emergência de plântulas (Figura 8) foi maior para sementes obtidas de vagens amarelas em todos os períodos de armazenamento, não diferindo daquelas de vagens verde amarelas aos 0 e 3 meses de armazenamento. Em geral, os menores valores de emergência ocorreram para sementes de vagens marrons aos 3 meses de armazenamento não diferindo estatisticamente das sementes de vagens verdes no mesmo período (3 meses). Assim, embora sementes dos diferentes estádios de maturação não tenham diferido quanto à germinação aos 0 e 3 meses de armazenamento (Figura 6), ao se

avaliar a emergência de plântulas foi possível constatar maior vigor para as sementes de vagens amarelas em todos os períodos de armazenamento.

Ao se comparar os períodos de armazenamento (Figura 8), verifica-se que praticamente não houve diferença significativa nos valores de emergência de plântulas obtidos aos 0, 3 e 6 meses para todos os estádios de maturação. Já pelo teste de germinação, pode-se constatar menores valores para sementes de vagens marrons aos 6 meses de armazenamento. Esta diferença entre os resultados de germinação em laboratório e emergência de plântulas em substrato pode ser explicada pela maior ocorrência de microrganismos durante a germinação das sementes no período de 6 meses.

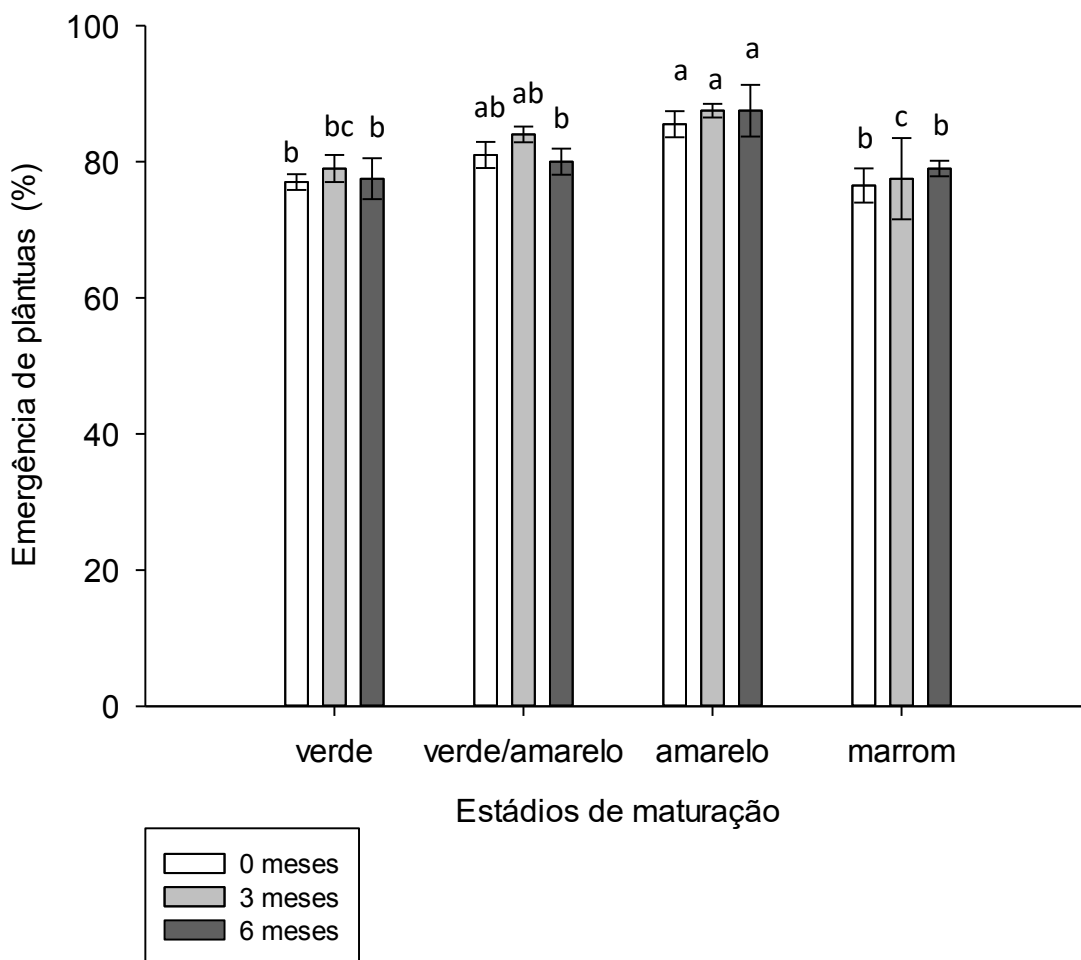


Figura 8: Emergência de plântulas de sementes de lentilha, colhidas em diferentes estádios de maturação, durante o armazenamento por 0, 3 e 6 meses

A proporção de lixiviados de constituintes celulares está inversamente relacionada ao vigor e germinação, e reflete a perda de integridade das membranas celulares e favorece o crescimento de microrganismos, e conseqüentemente, acelera a deterioração das sementes (Binotti et al., 2008).

Aos 0 e 3 meses de armazenamento, menor condutividade elétrica, ou seja, maior vigor foi observado em sementes obtidas de vagens amarelas quando comparadas às de vagens marrons (Figura 9). Aos 6 meses, sementes de maior vigor foram obtidas de vagens amarelas quando comparadas aos dos demais estádios de maturação.

A condutividade elétrica das sementes de todos os estádios de maturação aumentou significativamente aos 6 meses de armazenamento, indicando redução no vigor (Figura 9), exceto para sementes de vagens amarelas. Nestas, não houve diferença no vigor das sementes ao longo do armazenamento.

Em geral, os maiores valores de condutividade foram observados nas sementes de vagens marrons que pode ser atribuído ao processo físico de secagem que ocasionou perda de água ocasionada pela maior permanência das sementes no campo. Uma das primeiras manifestações da deterioração é a desorganização do sistema de membranas (Delouche e Baskin, 1973). Assim, nas sementes obtidas de vagens marrons os maiores valores de condutividade e menor vigor podem ser atribuídos à uma maior desestruturação das membranas celulares levando à uma maior lixiviação de exsudados durante a embebição.

Além disto, conforme a (Figura 2H e J), é possível verificar com frequência fissuras ao longo do tegumento das sementes obtidas de vagens marrons, provavelmente consequência de expansões e contrações em decorrência das variações de temperatura e umidade relativa do ar ao final do processo de maturação. Estas variações podem causar rupturas no tegumento das sementes que ficam expostas às condições adversas do campo por um período maior de tempo (Marcos-Filho, 2005). Assim, tais fissuras também contribuíram para que ocorresse maior lixiviação de eletrólitos e, conseqüentemente, maiores valores de condutividade nas sementes obtidas de vagens marrons.

Em soja, com o atraso na colheita das sementes houve aumento da condutividade elétrica indicando menor vigor (Diniz et al., 2013). Segundo Salinas et al. (1998), alterações na integridade das membranas citoplasmáticas ocorrem com conseqüente

aumento na lixiviação de solutos em sementes de soja armazenadas por seis meses. Em sementes de feijão, Lin (1990) verificou decréscimo no vigor e na germinação diretamente associado ao aumento da lixiviação eletrolítica de solutos celulares das sementes, sugerindo uma relação estreita entre deterioração das membranas e redução do vigor e germinação.

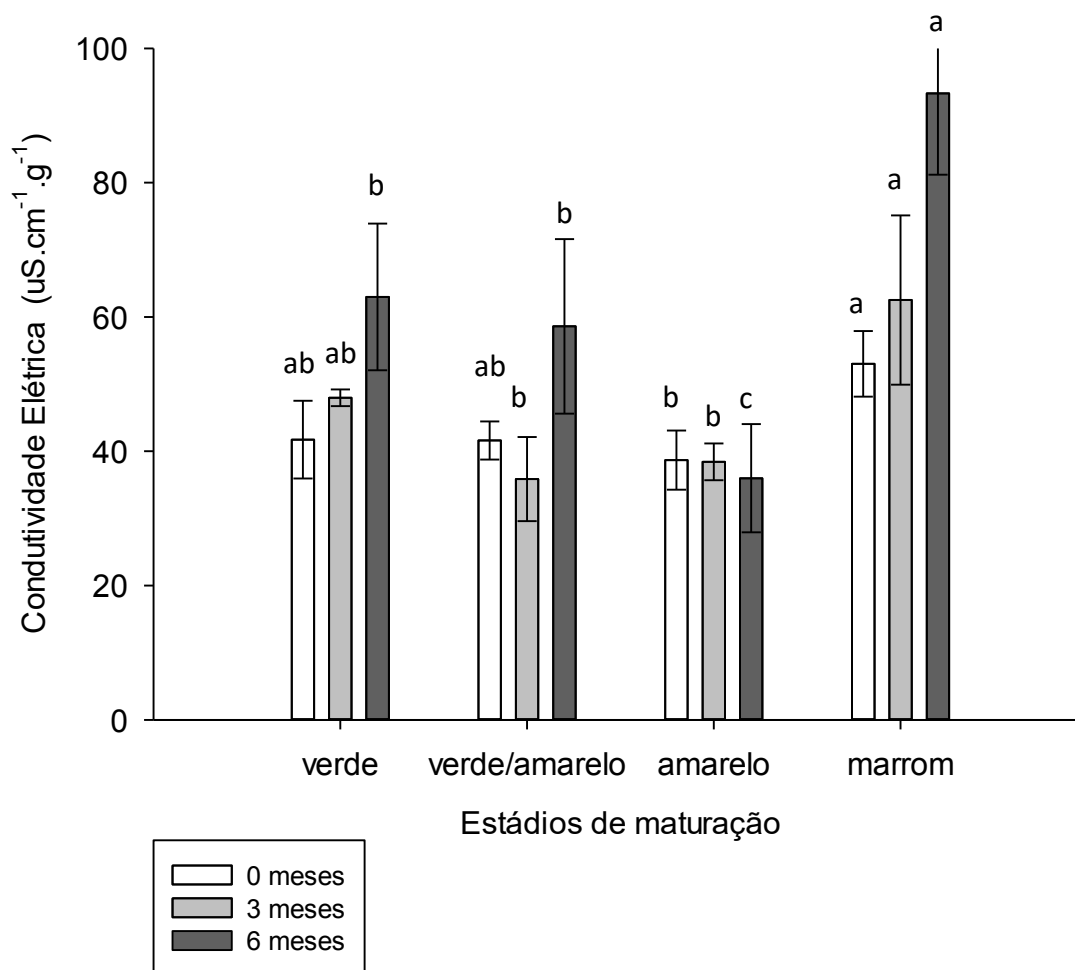


Figura 9: Condutividade elétrica de sementes de lentilha colhidas em diferentes estádios de maturação, durante o armazenamento por 0, 3 e 6 meses. Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e comparam estádios de maturação em cada período de armazenamento. Erros-padrão comparam períodos de armazenamento dentro de cada estágio de maturação.

Com base no teste de envelhecimento acelerado, no qual as sementes são submetidas ao estresse por alta umidade relativa e alta temperatura, observa-se antes do

armazenamento (época 0), maior vigor para sementes do estágio amarelo e menor vigor para sementes do estágio marrom. Estes resultados concordam com o que foi observado nos testes de emergência de plântulas (Figura 8) e condutividade elétrica (Figura 9). Aos 3 meses de armazenamento, sementes de vagens amarelas também tiveram desempenho superior, exibindo maior vigor do que as de vagens verde amarelas. Já aos 6 meses, sementes do estágio amarelo foram superiores às de todos os demais estágios. Portanto, de modo geral, pode-se afirmar que maior vigor foi observado para sementes de vagens amarelas durante todo o período de armazenamento.

Ao se comparar os períodos de armazenamento (Figura 10), sementes verdes tiveram maior vigor no tempo 0 com redução aos 3 e 6 meses, períodos estes que não diferiram entre si. Nas sementes de vagens verde amarelas e de vagens marrons, não houve diferença significativa no vigor aos 0 e 3 meses, redução aos 6 meses. Já nas sementes de vagens amarelas, que conforme comentado acima foram mais vigorosas que as dos demais estágios, não diferiram quanto ao vigor ao longo do armazenamento.

Analisando os resultados dos testes de avaliação da qualidade fisiológica, verifica-se que mesmo não ocorrendo diferença significativa na germinação, em geral, o vigor foi maior nas sementes obtidas de vagens amarelas se comparando com as de vagens verdes e marrons. Resultados semelhantes foram obtidos por Khatun et al. (2009), onde sementes de lentilha colhidas no estágio em que as vagens apresentavam-se amarelas com manchas marrom claro tiveram maior vigor do que sementes obtidas de vagens secas e com coloração externa marrom. Observa-se ainda que com o armazenamento por 6 meses houve redução da qualidade das sementes, principalmente das sementes de vagens marrons.

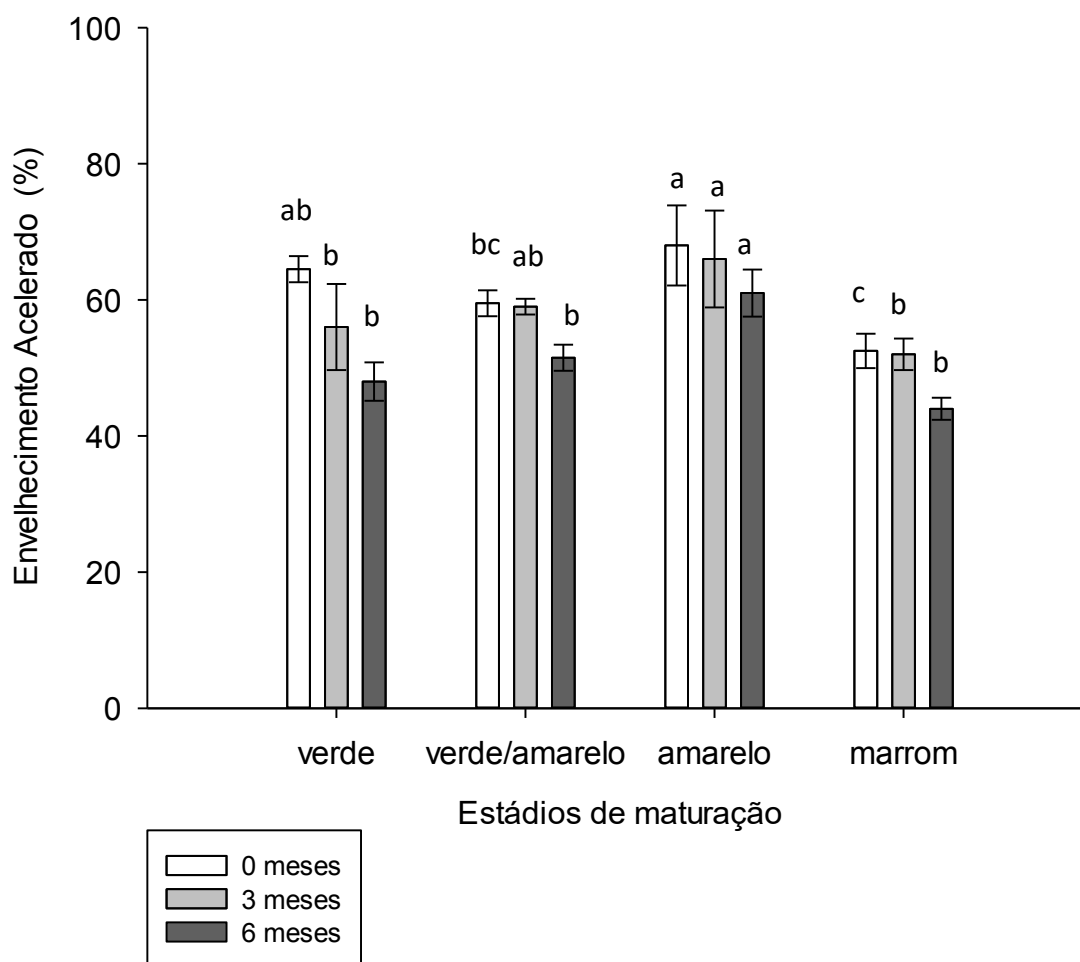


Figura 10: Envelhecimento acelerado de sementes de lentilha, colhidas em diferentes estádios de maturação, durante o armazenamento por 0, 3 e 6 meses. . Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e comparam estádios de maturação em cada período de armazenamento. Erros-padrão comparam períodos de armazenamento dentro de cada estágio de maturação.

3.3. Caracterização Bioquímica

As enzimas do sistema antioxidante são sintetizadas durante o desenvolvimento das sementes, tendo função importante na proteção contra espécies reativas de O_2 que aumentam com a deterioração. A SOD age contra o estresse oxidativo atuando na dismutação do O_2^- , transformando-o em $H_2O_2 + O_2$. É encontrada em diferentes compartimentos celulares, como nas mitocôndrias, nos peroxissomos, no citossol e, possivelmente, no espaço extracelular (Alscher et al., 2002). Não houve diferença significativa na atividade da SOD nas sementes dos diferentes estádios de maturação antes do armazenamento (Figura 11). Silva (2006) observou que a atividade da SOD em

sementes de soja foi intensa durante todos os estádios de maturação avaliados; neste caso, provavelmente, deve ter ocorrido a formação de radicais livres nas sementes imaturas durante à secagem, ativando a SOD como mecanismo de reparo celular.

Após armazenamento por 6 meses, foi observado aumento da atividade dessa enzima, sendo maior nas sementes obtidas de vagens verdes e marrons, indicando que sua ação de defesa, para redução de superóxido (O_2^-) e conseqüente redução da formação de radicais livres, foi mais demandada nesses estádios de maturação. Sementes obtidas de vagens verdes se encontram em formação, atividade metabólica alta e nos demais estádios já houve a secagem como observado em sementes obtidas de vagens marrons, sendo assim, menor atividade metabólica devido á secagem. O aumento da atividade da enzima no início está ligado á formação e o aumento no final devido á perda de água.

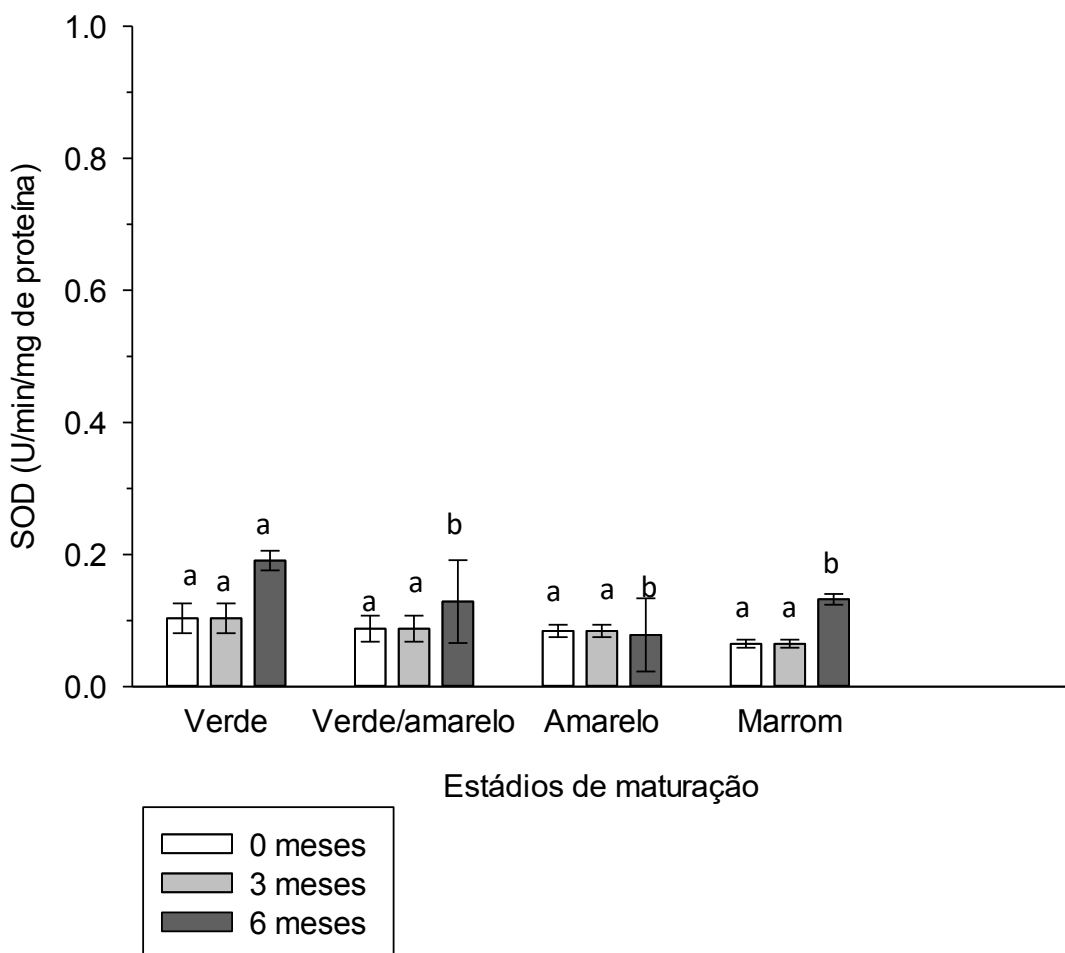


Figura 11: Atividade da enzima superóxido dismutase e sementes de lentilha, colhidas em diferentes estádios de maturação, durante o armazenamento por 0, 3 e 6 meses. . Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e comparam estádios de maturação em cada período de armazenamento. Erros-padrão comparam períodos de armazenamento dentro de cada estágio de maturação.

Já para a atividade da catalase (CAT), não houve diferença significativa entre as sementes dos estádios verde, verde amarelo e amarelo, apresentando valores superiores aos obtidos para sementes de vagens marrons em todos os períodos armazenamento (Figura 12). A menor atividade da CAT nestas sementes indica maior peroxidação de lipídios e, conseqüentemente, menor vigor, o que pode ser comprovado, de modo geral, pelos resultados dos testes de condutividade elétrica (Figura 9) e de envelhecimento acelerado (Figura 10).

O decréscimo na atividade da CAT pode ser atribuído à inativação progressiva ou redução e paralisação de sua síntese (Marcos-Filho, 2015), o que resulta na queda na atividade dessa enzima ao final do período de armazenamento, refletindo na redução da germinação e vigor das sementes. A atividade da CAT (Figura 12) reduziu aos 6 meses de armazenamento para sementes obtidas de vagens verde/amarela. A catalase, por ser uma enzima envolvida no processo de remoção do peróxido de hidrogênio, exerce controle desses peróxidos endógenos por meio do ciclo óxido-redução (Fridovich, 1986). Sendo assim, a redução na atividade dessa enzima poderá afetar a prevenção de danos oxidativos, ocasionados principalmente pela ação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Redução na atividade da CAT associada ao decréscimo na viabilidade foi constatada em sementes de girassol (Bailly et al., 1996), amendoim (Sung, 1996) e soja (Sung e Chiu, 1995).

A peroxidase encontra-se amplamente distribuída nos compartimentos celulares, sendo associada às paredes e membranas celulares, organelas, vacúolos e ao citosol, desempenhando importante papel no metabolismo das sementes, contribuindo para o aumento dos mecanismos de defesa e prevenção de perda da qualidade (Ushimaru et al., 2001).

A atividade da enzima peroxidase (POX) foi maior nas sementes obtidas de vagens verdes e amarelas quando comparada às dos demais estádios no período 0 de armazenamento. Aos 3 meses de armazenamento, maior atividade para sementes obtidas de vagens amarelas (Figura 13). Aos seis meses de armazenamento, menor atividade da

POX ocorreu em sementes de vagens marrons em relação às dos demais estádios de maturação no mesmo período (Figura 13).

Com relação aos períodos de armazenamento, não houve diferença significativa na atividade da POX aos 0 e 3 meses nas sementes de todos os estádios de maturação. Aos 6 meses, já se verificou redução na atividade desta enzima nas sementes de vagens verdes, verde amarelas e amarelas. Apenas para sementes de vagens marrons não houve diferença significativa na atividade da POX ao longo do armazenamento. Contudo, estas sementes apresentaram menor atividade da POX em comparação com as sementes de vagens amarelas. Estes resultados confirmam o menor vigor das sementes de vagens marrons que pode ser relacionado à menor atividade de enzimas antioxidantes (Figuras 12 e 13).

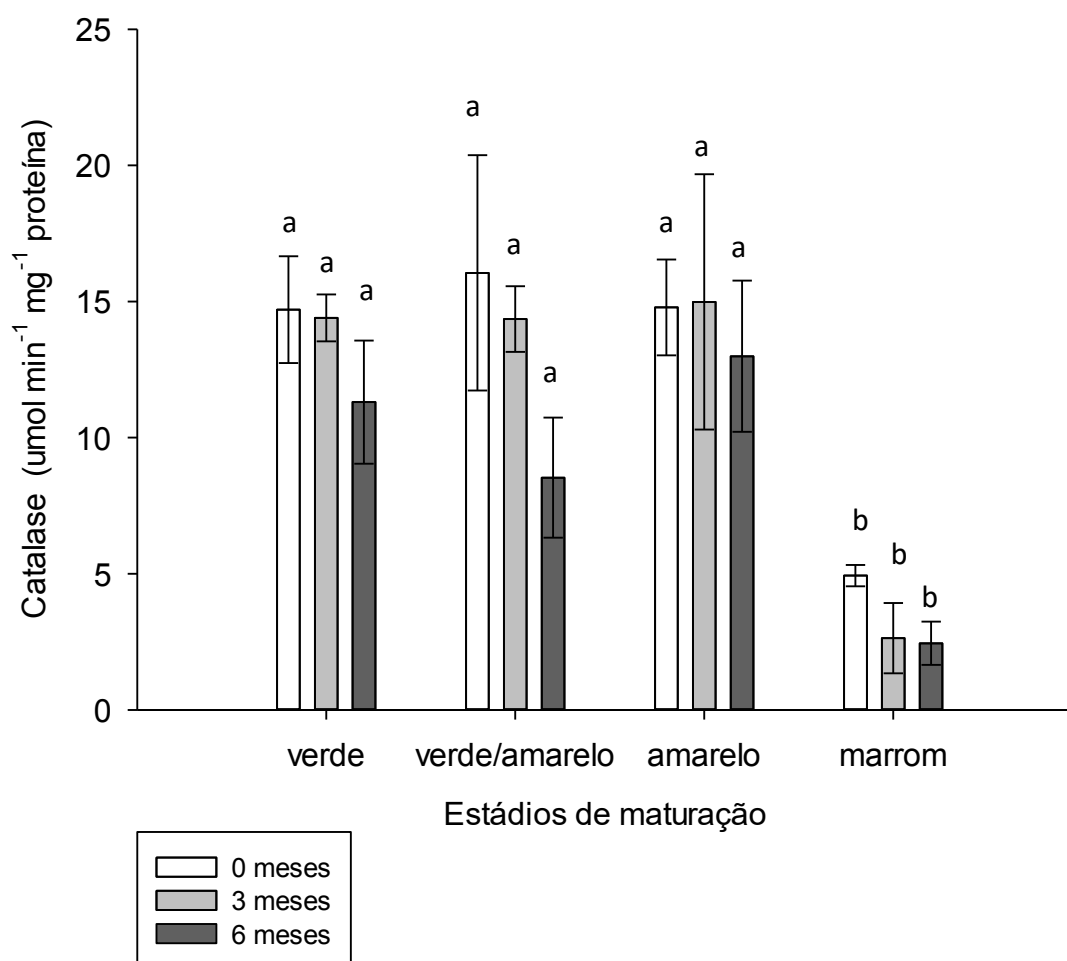


Figura 12: Atividade da enzima catalase em sementes de lentilha colhidas em diferentes estádios de maturação, durante o armazenamento por 0, 3 e 6 meses. Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq$

0,05) e comparam estádios de maturação em cada período de armazenamento. Erros-padrão comparam períodos de armazenamento dentro de cada estágio de maturação.

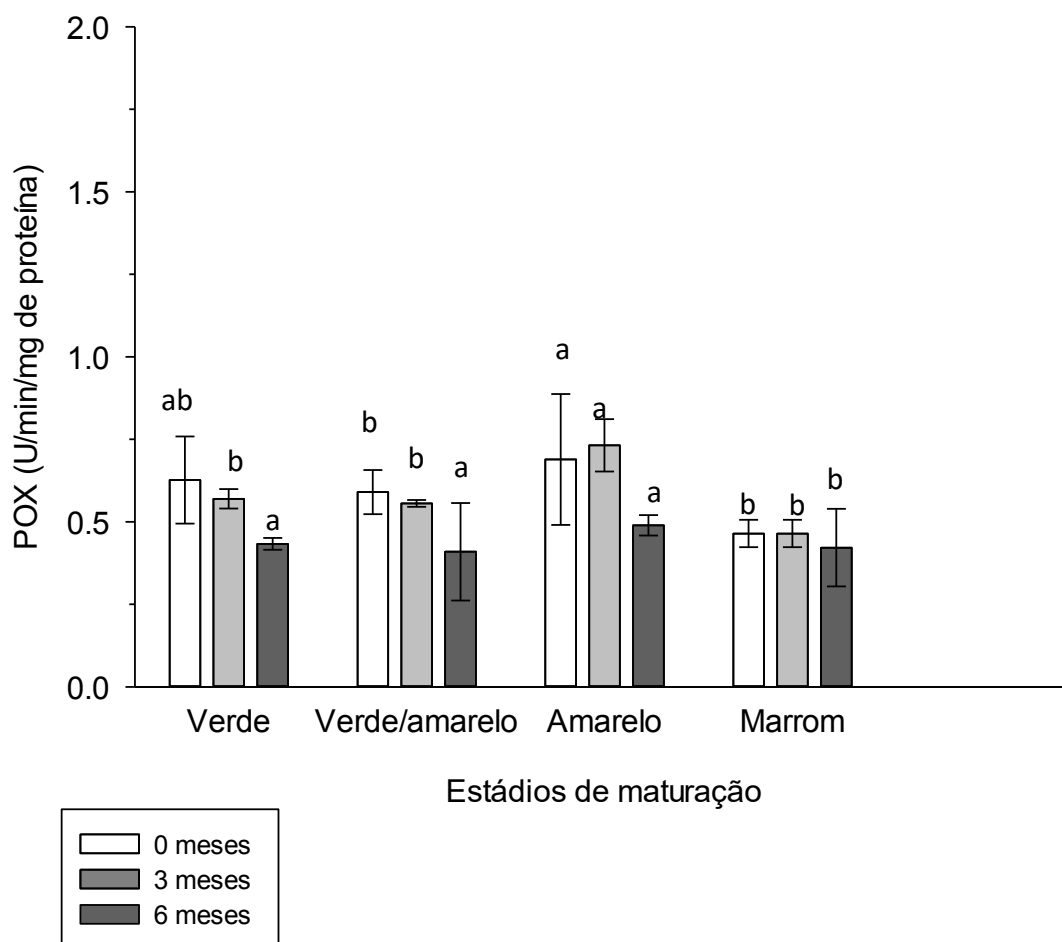


Figura 13: Atividade da enzima peroxidase em sementes de lentilha, colhidas em diferentes estádios de maturação, durante o armazenamento por 0, 3 e 6 meses. Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e comparam estádios de maturação em cada período de armazenamento. Erros-padrão comparam períodos de armazenamento dentro de cada estágio de maturação.

4. CONCLUSÃO

A deposição de reservas de proteínas e amido ocorre no estágio verde se estabilizando a partir do estágio amarelo.

Houve ocorrência de fissuras no tegumento das sementes obtidas de vagens amarelas, intensificando-se no estágio marrom.

Não houve diferença significativa na germinação das sementes de lentilha obtidas de vagens em diferentes estádios de maturação; para sementes de vagens marrons o armazenamento aos 6 meses reduziu a germinação.

Sementes obtidas de vagens amarelas tiveram maior vigor em relação às de vagens verdes e marrons;

Houve maior atividade das enzimas antioxidantes CAT e POX em sementes obtidas de vagens amarelas quando comparadas às de vagens marrons; com aumento do tempo de armazenamento (6 meses) há redução da atividade dessa enzima;

REFERÊNCIAS

ABREU, L. A. D. S. et al. Deterioration of sunflower seeds during storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 240-224, 2013.

ADAMS, C.A.; RINNE, R.W. Seed maturation in soybeans (*Glycine max* L. Merr.) is independent of seed mass and of the parent plant, yet is necessary for production of viable seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.32, n.128, p.615-620, 1981.

ALSCHER, R. G; ERTURK, N; HEALTH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

ANDRIOTIS, V.M.E.; PIKE, M.J.; KULAR, B.; RAWSTHORNE, S.; SMITH, A.M. Starchturnover in developing oil seed embryos. **New Phytologist**, v. 187, n. 3, p. 791–804, 2010.

ARAUJO, A. V.; ARAUJO, E. FONTES; AMARO, H. T. R; SANTOS, R.H. S; CECON, P. R. Time of harvest and storability of *Crotalaria juncea* L. seeds. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza , v. 49, n. 1, p. 103-111, 2018.

BAILLY C, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, CORBINEAU F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology, **Comptes Rendu Biologies**, vol. 331, p. 806-814, 2008.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v.14, p. 93-107, 2004.

BAILLY, C.; BENAMAR, A.; COBINEAU, F.; CÔME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, v. 97, n. 1, p. 104-110, 1996.

BATTAGLIA, M.; COVARRUBIAS, A.A. Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Front. Plant Science*, v.4, 190, 2013.

BINOTTI F. F. D. S., HAGA K. I., CARDOSO E. D., ALVES C. Z., DE SA M. E., Arf O. 2008. Relationships of accelerated aging time with bulk conductivity test and with physiological seed quality in common bean. *Acta Scientiarum-Agronomy*, v.30, 247–254.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v.44, p.276-287, 1971.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. New York: **Plenum**, p.445, 1994.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Longevity, storage, and deterioration. In: J.D. Bewley, K.J. Bradford, H.W.M.Hilhorst& H. Nonogaki (eds.). Seeds: physiology of development, germination and dormancy. 3ed. **Springer**, New York, pp. 341-376, 2013.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILROST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. 3. ed., New York: Springer,. 392 p, 2013. **Biology**, v. 58, n. 1, p. 61-97, 1986.

BINGHAM, L. J.; HARRIS, A.; McDONALD, L. A. A comparative study of radicle and coleoptile extension in maize seedlings form age and unaged seed. **Seed Science and Technology**, v.22, n. 1, p. 127-139, 1994.

BOLINA, C. C. Maturação fisiológica da semente e determinação da época adequada de colheita do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Científica Linkania Master**, v.2, n.3, 2012.

BOREK, S.; GALOR, A.; EWELINA-PALUCH, E. Asparagine Enhances Starch Accumulation in Developing and Germinating Lupin Seeds. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.32, p.471–482, 2013.

BOTELHO, F.J.E.; GUIMARÃES, R.M.; OLIVEIRA, J.A.; EVANGELISTA, J.R.E.; ELOI, T.A.; BALIZA, D.P. Desempenho fisiológico de sementes de feijão colhidas em diferentes períodos do desenvolvimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 900-907, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 2009. 365 p.

CARPITA, N.; MCCANN, M. The Cell Wall. In **Biochemistry & molecular biology of plants**. BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. (Eds). Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 53-107, 2000.

CARVALHO, E. R. et al. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 49, n. 12, p. 967-976, dez, 2014.

CARVALHO, M. L. M.; VILELA, F. A. Armazenamento de sementes. **Informe Agropecuário**, , v. 27, n. 232, p.70-75. 2006.

CHACHALIS, D.; SMITH, M.L. Imbibition behavior of soybean (*Glycine max* L. Merrill) accessions with different testa characteristics. **Seed Science and Technology**, v. 28, n. 2, p.321-331, 2000.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1995.

CORBINEAU, F. et al. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. **Seed Science Research**, v. 10, p. 329-339, 2000.

CORNER, E. J. H. **The seeds of dicotyledons**. Cambridge University Press, v. 2, p. 311, 1976.

CORSATO, Jaqueline Malagutti. Maturação e aquisição de tolerância à dessecação de sementes de *Annona emarginata* (Shltdl.) H. Rainer. 2014. 185 f. **Tese (doutorado)** - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2014.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **Design of seed storage facilities for genetic conservation**. Rome: International Board of Plant Genetic Resources, 1985. 100 p.

DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v.34, p.1023- 1028, 1993.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seeds lots. **Seed Science and Technology**, v.1, n.2, p.427-452, 1973.

DINIZ, F.O.; REIS, M.S.; ARAÚJO, E.F.; DIAS, L.A. S.; SEDIYAMA, T.; SEDIYAMA-BHERING, C.A.Z. Incidence of pathogens and field emergence of soybean seeds subjected to harvest delay. **Journal of Seed Science**, v.35, p.478-484, 2013.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, as culturas da ervilha e lentilha. Brasília: (SPI, 1993. 56 p.)16 cm. (Coleção Plantar: 2)

FAO. 2014 Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 6 jan. 2018.

FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de análise de variância**. Versão 5.6. Lavras-MG: UFLA, 2012.

FREITAS, RA; NASCIMENTO, WM. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de lentilha. **Revista Brasileira de Sementes**, 28: 59-63, 2006.

GIORDANO, L.B.; PEREIRA, W.; LOPES, J.F. **Cultivo da lentilha**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1988. 3p. (Instruções Técnicas, 9).

GOEL, A.; SHEORAN, I. S. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. **Biologia Plantarum**, Praga, n. 46. v. 3, p. 429-434, 2003.

HINCHA, D.K.; THALHAMMER, A. LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, p. 1000– 1003, 2012.

HORVÁTH, E.; JANDA, T.; SZALAI, G.; PÁLDI, E. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isoenzymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. **Plant Science**, v.163, p.1129- 1135, 2002.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. On line. Disponível em:< <http://www.ibge.gov.br/home>>. acesso em: 10 fev. 2018.

JOHANSEN, P.A. **Plant microtechnique**. McGraw Hill Book Company, New York, 1940.

JORDY, M.N. Seasonal variation of organogenetic activity and reserves allocation in the shoot apex of *Pinus pinaster* Ait. **Annals of Botany**, v. 93, n. 1, p. 25 - 37, 2004.

JUSTO, C.F.; ALVARENGA, A.A.; ALVES, E.; GUIMARÃES, R.M.; STRASSBURG, R.C. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. **Acta Botânica Brasílica**, v. 21, n. 3, p. 539-551, 2007.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p.315-319, 1976.

KAUR, H. et al. Differentially expressed seed aging responsive heat shock protein OsHSP18.2 implicates in seed vigor, longevity and improves germination and seedling establishment under abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v.6, artigo 713, 2015.

KHATUN, A., KABIR, G. AND BHUIYAN, M.A.H. Effect of harvesting stages on the seed quality of lentil (*Lens culinaris* L.) during storage. **Bangladesh J. Agril. Res.** 34(4): 565-576, 2009.

KHATUN, A.; BHUIYAN M.A.H.; AYUB A. Storability of lentil *Lens culinaris* L. seed as influenced by seed collection. **Bull. Inst. Trop. Agr.**, Kyushu Univ. 31: 1-8, 2008.

KUMAR, V. et al. Effect of post-harvest ripening and drying methods on seed quality and storability in pumpkin cv Pusa Hybrid 1. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 84, n. 9, p. 1144-1148, 2014.

KUNZE, O.R. Fissuring of the rice grain after heated air drying. **Transactions of the ASAE**, v. 22, n. 5, p. 1197-1207, 1979.

LIN, S.S. Alterações na lixiviação eletrolítica, germinação e vigor da semente de feijão envelhecida sob alta umidade relativa do ar e alta temperatura. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.2, n.2, p.1-6, 1990.

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

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina, PR: ABRATES, 2015. 659 p.

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

MENEZES, M.; VON PINHO, E.V.R.; JOSÉ, S.C.B.R.; BALDONI, A.; MENDES, F.F. Aspectos químicos e estruturais da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1716- 1723, 2009.

MENEZES, M.; VON PINHO, E.V.R.; JOSÉ, S.C.B.R.; BALDONI, A.; MENDES, F.F. Aspectos químicos e estruturais da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1716- 1723, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci** 7(9):405–410, 2002.

MONTARDO, D.P.; CRUZ, F.P.; CAETANO, J.H.; BOLDRINI, I.I.; DALL'AGNOL, M. Efeito de dois tratamentos na superação de dormência de sementes de cinco espécies de *Adesmia* DC. **Revista Científica Rural**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2000.

MORAIS, O.M.; SOUZA, R.T. NAKAGAWA, J. Maturação, formas de secagem e qualidade fisiológica de sementes de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v.11, n.2, p.61, 2001.

MORAIS, O.M.; SOUZA, R.T.; NAKAGAWA, J. Maturação de vagens, formas de secagem e qualidade fisiológica de sementes de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v.11, n.2, p.62, 2001b.

NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C.; ZUCARELI, C. Maturação, formas de secagem e qualidade fisiológica de sementes de mucuna-preta. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 45-53, 2005.

NAKAMURA, A.T.; OLIVEIRA, D.M.T. Morfoanatomia e ontogênese da sâmara de *Pterocarpus violaceus* Vogel (Fabaceae: Faboideae). **Revista Brasileira Botânica**, v. 28, n. 2, p. 375-387, 2005.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.

NASCIMENTO, W.M.; VIEIRA, R.F.; LIMA, R.R. Lentilha. In: NASCIMENTO, W.M. (ED.) Hortaliças Leguminosas. 1ed. Brasília: Embrapa, 2016. v.1, p.121-146.

O'BRIEN, T.; P. FEDER, N. MCCULLY, M.; E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **The Biological Laboratories Harvard**, Cambridge, USA, 1964.

OLIVEIRA, A. D. S. et al. Biochemical changes in fiber naturally colored cottonseeds during storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 101-109, 2016.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes rendus biologiques**, v. 331, n. 10, p. 796- 805, 2008.

RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G. & ALVAREZ V., V.H. **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. Viçosa, MG, CFSEMG/UFV, 1999. 359p.

SALINAS, A.R.; SANTOS, O.S.B.; VILLELA, F.A.; SANTOS FILHO, B.G.; SOUZA SOARES, L.A.; OLIVEIRA, M.F. Fisiologia da deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) durante o armazenamento. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.3, n. 2, p.106-118, 1998.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A.. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.104-114, 2005.

SILVA, P.A. Estudo da qualidade fisiológica, bioquímica e ultra-estrutural, durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja. 2006. 66f. **(Tese de doutorado)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

SILVA, P.P.; BARROS, A.C.S.A.; VON PINHO, E.V.R.; NASCIMENTO, W.M. Physiological analysis and heat-resistant protein (LEA) activity in squash hybrid seeds during development. **Journal of Seed Science** , v.37, n.4, p.185-191, 2015.

SUBEDI, M., C.J. WILLENBORG, AND A. VANDENBERG. Influence of harvest aid herbicides on seed germination, seedling vigor and milling quality traits of red lentil (*Lens culinaris* L.). *Front. Plant Science*, v.8:311, 2017.

SUNG, J.M. Lipid peroxidation and peroxide scavenging in soybean seeds during ageing. **Physiologia Plantarum**. v. 97, n. 1, p. 85-89, 1996.

SUNG, J.M.; CHIU, C.C. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. **Plant Science**, Clare, v. 110, n. 1, p. 45-52, 1995.

TORRES, S. B.; MEDEIROS, M. A.; TOSTA, M. S.; COSTA, G. M. M. Teste De Condutividade Elétrica Em Sementes De Gergelim. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 3, p.070-077, 2009.

USHIMARU, T.; KANEMATSU, S.; KATAYAMA, M.; TSUJI, H. Antioxidative enzymes in seedling of *Nelumbo nucifera* germinated under water. **Physiologia Plantarum**, , v. 112, p. 39-46, 2001.

VIANELLO, R. L.; ALVES, A. R. Meteorologia básica e aplicações. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 448 p.

VIDAL, B.C. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R, **Annales Histochimie**, v. 15, n. 4, p. 289-296, 1970.

VIEIRA, R.F.; VIEIRA, C.; VIEIRA, R.F. **Leguminosas graníferas**. Viçosa: UFV, 2001. 206p.

VIEIRA, R.F.; RESENDE, M. A. V.; VIEIRA, C.; FERREIRA, R. T. Épocas de plantio da lentilha precoce em quatro regiões de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília , v. 34, n. 7, p. 1233-1240, 1999.

ZEEMAN, S.C; KOSSMANN, J.; SMITH, A.M. Starch: Its metabolism, evolution and biotechnological modification in plants. **Annual Review Plant Biology**, v. 61, p. 209-234, 2010.