

GENAINA APARECIDA DE SOUZA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES
DE SERINGUEIRA [*Hevea brasiliensis* (WILLD. EX
ADR. DE JUSS.) MÜELL.-ARG.] DURANTE O
DESENVOLVIMENTO E O ARMAZENAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

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

T

S729a
2014
Souza, Genaina Aparecida de, 1983-
Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de seringueira
[*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. Adr. de Juss.) Müell.-Arg.] durante o
desenvolvimento e o armazenamento / Genaina Aparecida de Souza. -
Viçosa, MG, 2014.
xv, 135f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Seringueira. 2. *Hevea brasiliensis*. 3. Sementes - Germinação.
4. Sementes - Armazenamento. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Fisiologia
Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 633.8952

GENAINA APARECIDA DE SOUZA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES
DE SERINGUEIRA [*Hevea brasiliensis* (WILLD. EX
ADR. DE JUSS.) MÜELL.-ARG.] DURANTE O
DESENVOLVIMENTO E O ARMAZENAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção do título
de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2014.


Edgard Augusto de Toledo Picoli


Eduardo Euclides de Lima e Borges


Lisandro Tomas da Silva Bonome


Antônio de Pádua Alvarenga


Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias
(Orientadora)

À meu marido
Alexmiliano Vogel de Oliveira
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus porque sem ele nada seria possível, principalmente nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do doutorado.

A EPAMIG pela disponibilidade de laboratórios e área experimental. Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa. A Fapemig pelo financiamento da pesquisa e também pela concessão da bolsa de estudos. A empresa Cautex Florestal pela disponibilização das sementes.

À professora, pesquisadora e orientadora Dra. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pela orientação e apoio.

Ao pesquisador Dr. Antônio de Pádua Alvarenga pelo apoio e ajuda incondicional.

Ao professor Edgard Augusto de Toledo Picoli pelos ensinamentos e compreensão.

Ao professor Lisandro Tomas da Silva Bonome pelos conselhos e aprendizagem desde o início da minha caminhada, ainda na graduação.

Ao professor Eduardo Euclides de Lima e Borges pela ajuda e por disponibilizar o laboratório de Análise de Sementes Florestais para realização das análises. Aos laboratoristas Mauro Ferreira e Leacir Braz da Silva.

Ao professor Eduardo Alves da Universidade Federal de Lavras pela disponibilização do Laboratório de Microscopia eletrônica.

Aos colegas do Grupo de Estudos em Sementes (GSem), Laércio Junio da Silva, Glauter Lima Oliveira e Paulo César Hilst pela ajuda. Em especial a Amanda Ávila Cardoso e Marcelo Coelho Sekita, pela ajuda na execução do trabalho e o apoio.

Aos alunos de iniciação científica Fernando A. Brito e em especial a Thaline Pimenta pela imensa ajuda e bom humor, mesmo após horas de trabalho.

A minha amiga Raquel O. Pires, por me alegrar quando eu mesma, não achava possível. A Paola Andrea Harmonza pelo carinho e ajuda. A minha amiga Janaíne Lopes Machado pela amizade, ajuda e apoio. A minha amiga Aquidauana Miqueloto por tanto ter me ajudado e ensinado seja aqui ou em lugares mais distantes. A Luciene Fernandes por toda ajuda prestada no decorrer do curso.

A toda minha família pelo incentivo.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS | v |
| LISTA DE TABELAS | x |
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xiii |
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| <u>CAPÍTULO 1</u> | |
| REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 1.1. – A SEMENTE DE SERINGUEIRA..... | 4 |
| 1.2. – ALTERAÇÕES DURANTE A MATURAÇÃO DE SEMENTES | 5 |
| 1.3. – ARMAZENAMENTO DE SEMENTES RECALCITRANTES..... | 7 |
| 1.4. – ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO | 9 |
| 1.5. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 11 |
| <u>CAPÍTULO 2</u> | |
| ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DE SEMENTES DE SERINGUEIRA..... | 16 |
| RESUMO | 17 |
| ABSTRACT | 18 |
| 2.1. – INTRODUÇÃO | 19 |
| 2.2. – MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 2.3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 23 |
| 2.4. – CONCLUSÕES..... | 33 |
| 2.5. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |
| <u>CAPÍTULO 3</u> | |
| EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS DE RESERVA E ALTERAÇÕES ANATÔMICAS EM SEMENTES DE SERINGUEIRA | 37 |
| RESUMO | 38 |
| ABSTRACT | 39 |
| 3.1. – INTRODUÇÃO | 40 |
| 3.2. – MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| 3.3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 3.4. – CONCLUSÕES..... | 55 |
| 3.5. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |

CAPÍTULO 4

| | |
|--|----|
| ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM SEMENTES DE SERINGUEIRA DURANTE O ARMAZENAMENTO | 59 |
| RESUMO | 60 |
| ABSTRACT | 61 |
| 4.1. – INTRODUÇÃO | 62 |
| 4.2. – MATERIAL E MÉTODOS | 64 |
| 4.3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 68 |
| 4.4. – CONCLUSÕES..... | 86 |
| 4.5. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: | 87 |

CAPÍTULO 5

| | |
|--|-----|
| ALTERAÇÕES NOS COMPOSTOS DE RESERVA EM SEMENTES DE SERINGUEIRA DURANTE O ARMAZENAMENTO | 91 |
| RESUMO | 92 |
| ABSTRACT | 93 |
| 5.1. – INTRODUÇÃO | 94 |
| 5.2. – MATERIAL E MÉTODOS | 96 |
| 5.3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 99 |
| 5.4. – CONCLUSÃO | 125 |
| 5.5. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 126 |
| ANEXOS..... | 129 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1. Curva de crescimento para os frutos e sementes de seringueira, em diferentes épocas, DAA. A barra representa o desvio padrão23
- FIGURA 2. Matéria seca e umidade de frutos e sementes colhidos em diferentes épocas (DAA). A barra representa o desvio padrão24
- FIGURA 3. Registro das condições climáticas no local do experimento, de agosto de 2012 a março de 201324
- FIGURA 4. Germinação e índice de velocidade de emergência (IVE,) das sementes de seringueira colhidas a partir de 150 DAA. As médias acompanhadas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).25
- FIGURA 5. Condutividade elétrica das sementes de seringueira colhidas a partir dos 150 DAA25
- FIGURA 6. Perfil eletroforético de proteínas de choque térmico de baixo peso molecular (smHSPs), em embriões de sementes de seringueira colhidas aos 135,150, 165, 175, 180 dias após a antese26
- FIGURA 7. Atividade das enzimas do estresse oxidativo nas sementes e fruto de seringueira durante o desenvolvimento. As barras representam o desvio padrão27

CAPÍTULO 3

- FIGURA 1. Teor de Açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e sacarose em sementes (A) e frutos (B) de seringueira colhida em diferentes épocas. As barras representam o desvio padrão de três repetições.43
- FIGURA 2. Teor de amido nas sementes e nos frutos de seringueira colhidos em diferentes épocas. As barras representam o desvio padrão de três repetições44
- FIGURA 3. Teor de proteína nas sementes e nos frutos de seringueira colhidos em diferentes épocas. As barras representam o desvio padrão de três repetições44
- FIGURA 4. Sementes de *Hevea brasiliensis* colhidas em diferentes épocas (DAA). Fotomicrografias de seções transversais do endosperma coradas com Azul de Toluidina (A-C), xilydine Ponceau (D-F), Lugol (G-I) e Sudan Black B (J-L). DAA, Dias Após Antese. Barras: 5 μ m. As setas indicam divisão celular e as cabeças de seta deposição de composto de reserva46
- FIGURA 5. Sementes de *Hevea brasiliensis* colhidas em diferentes épocas (DAA). Fotomicrografias de seções transversais do cotilédone coradas com Azul de Toluidina (A-C), xilydine Ponceau (D-F), Lugol (G-I) e Sudan Black B (J-L). DAA, Dias Após

Antese. Barras: 5µm. As setas indicam divisão celular e as cabeças de seta deposição de composto de reserva47

FIGURA 6. Sementes de *Hevea brasiliensis* colhidas em diferentes épocas (DAA). Fotomicrografias de seções transversais do eixo embrionário coradas com Azul de Toluidina (A-C), xilydine Ponceau (G-F), Lugol (G-I) e Sudan Black B (J-L). DAA, Dias Após Antese. Barras: 5µm. As setas indicam divisão celular e as cabeças de seta deposição de composto de reserva48

FIGURA 7. Desenvolvimento da semente de *Hevea brasiliensis*. Eletromicrografias de varredura do endosperma. A, 15 DAA. B, 60 DAA. C, 90 DAA. D, 120 DAA. E, 135 DAA. F, 150 DAA. G, 165 DAA. H, 175 DAA. As setas indicam divisão celular e as cabeças de seta deposição de composto de reserva49

CAPÍTULO 4

FIGURA 1. Porcentagem de germinação das sementes de seringueira em relação aos tratamentos de controle de fungos e as temperaturas de armazenamento. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) dentro de cada período avaliado67

FIGURA 2. Índice de velocidade de emergência das sementes de seringueira submetidas a diferentes tratamentos para controle de fungos e armazenadas em diferentes temperaturas. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), dentro de cada período avaliado68

FIGURA 3. Condutividade elétrica das sementes de seringueira submetidas a diferentes tratamentos para controle de fungos e armazenadas em diferentes temperaturas. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), dentro de cada período avaliado69

FIGURA 4. Variação no grau de umidade nas sementes de seringueira submetidas a diferentes tratamentos para controle de fungos e armazenadas em diferentes temperaturas70

FIGURA 5. Variação na matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) da parte aérea de plântulas oriundas de sementes de seringueira submetidas a diferentes tratamentos para controle de fungos e armazenadas em diferentes temperaturas71

FIGURA 6. Variação na matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) da raiz de plântulas oriundas de sementes de seringueira submetidas a diferentes tratamentos para controle de fungos e armazenadas em diferentes temperaturas72

FIGURA 7. Conteúdo de MDA em embriões de sementes seringueira submetidas a diferentes tratamentos para controle de fungos e armazenadas em diferentes temperaturas73

FIGURA 8. Atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em embriões de sementes seringueira submetidas a diferentes tratamentos para controle de fungos e armazenadas em diferentes temperaturas74

FIGURA 9. Atividade da ascorbato peroxidase (APX) e peroxidases (POX) em embriões de sementes seringueira submetidas a diferentes tratamentos para controle de fungos e armazenadas em diferentes temperaturas75

CAPÍTULO 5

FIGURA 1. Teor de amido no endosperma de sementes de seringueira com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes temperaturas93

FIGURA 2. Teor de amido no embrião de sementes de seringueira com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes temperaturas95

FIGURA 3. Açúcares solúveis totais (AST) em sementes de seringueira com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes97

FIGURA 4. Teor de proteínas nas sementes de seringueira com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes temperaturas99

FIGURA 5. Teor de lipídios nas sementes de seringueira com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes temperaturas 101

FIGURA 6. Micrografias de luz de semente de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do endosperma, cotilédone e eixo embrionário. Antes do armazenamento (T0) e T1, T2, T3 (armazenadas a 10 °C; sem tratamento fungicida, tratamento químico e tratamento com alecrim, respectivamente) e T4 (armazenadas a 20 °C, sem tratamento fungicida), coradas com Azul de Toluidina. Barras:10µm. As setas indicam compartimentalização normal do núcleo e as cabeças de seta falta de compartimentalização e alterações estruturais 103

FIGURA 7. Micrografias de semente de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do endosperma, cotilédone e eixo embrionário, T5, T6 (armazenamento a 20 °C, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), e T7, T8 e T9 T6 (armazenamento a 25 ± 3 °C, sem tratamento para controle de fungos, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), coradas com Azul de Toluidina. Barras:10 µm.As setas indicam compartimentalização normal do núcleo e as cabeças de seta falta de compartimentalização e alterações estruturais 104

FIGURA 8. Micrografias de luz de semente de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do cotilédone. Antes do armazenamento (T0) e T1, T2, T3 (armazenadas a 10 °C; sem tratamento fungicida, tratamento químico e tratamento com alecrim, respectivamente) e T4 (armazenadas a 20 °C, sem tratamento fungicida), coradas com Xilidine Ponceau (1ª coluna), Lugol (2ª coluna) e Sudan Black B (3ª coluna). Barras:10µm (A,B,C,D,E,F,G,H,J,M,N), 5 µm (I,K,L,O). As setas

indicam alterações nos compostos de reserva e as cabeças de seta falta de compartimentalização e alterações estruturais106

FIGURA 9. Micrografias de luz de semente de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do cotilédone, T5, T6 (armazenamento a 20 °C, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), e T7, T8 e T9 T6 (armazenamento a 25 ± 3 °C, sem tratamento para controle de fungos, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), coradas com Xilidine Ponceau (1ª coluna), Lugol (2ª coluna) e Sudan Black B (3ª coluna). Barras: 10 µm (A,B,D,E,G,H,I,J,K,L,M,N), 5 µm (C,F,O). As setas indicam redução nos compostos de reserva107

FIGURA 10. Micrografias de luz de semente de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais eixo embrionário. Antes do armazenamento (T0) e T1, T2, T3 (armazenadas a 10 °C; sem tratamento fungicida, tratamento químico e tratamento com alecrim, respectivamente) e T4 (armazenadas a 20 °C, sem tratamento fungicida), coradas com Xilidine Ponceau (1ª coluna), Lugol (2ª coluna) e Sudan Black B (3ª coluna). Barras:10µm (A,B,D,E,G,J,K,M), 5 µm (C,F,H,I,L,N,O). As setas indicam redução nos compostos de reserva e as cabeças de seta coalescência108

FIGURA 11. Micrografias de luz de semente de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do cotilédone, T5, T6 (armazenamento a 20 °C, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), e T7, T8 e T9 T6 (armazenamento a 25 ± 3 °C, sem tratamento para controle de fungos, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), coradas com Xilidine Ponceau (1ª coluna), Lugol (2ª coluna) e Sudan Black B (3ª coluna). Barras: Barras:10 µm (1ª e 2ª colunas), 5 µm (3ª coluna).As setas indicam redução nos compostos de reserva e as cabeças de seta coalescência109

FIGURA 12. Micrografias de luz de semente de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do endosperma. Antes do armazenamento (T0) e T1, T2, T3 (armazenadas a 10 °C; sem tratamento fungicida, tratamento químico e tratamento com alecrim, respectivamente) e T4 (armazenadas a 20 °C, sem tratamento fungicida), coradas com Xilidine Ponceau (1ª coluna), Lugol (2ª coluna) e Sudan Black B (3ª coluna). Barras:10µm (1ª coluna), 5 µm (2ª e 3ª colunas).As setas indicam redução nos compostos de reserva e as cabeças de seta coalescência110

FIGURA 13. Micrografias de luz de semente de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do endosperma, T5, T6 (armazenamento a 20 °C, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), e T7, T8 e T9 T6 (armazenamento a 25 ± 3 °C, sem tratamento para controle de fungos, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), coradas com Xilidine Ponceau (1ª coluna), Lugol (2ª coluna) e Sudan Black B (3ª coluna). e as cabeças de seta coalescência111

FIGURA 14. Fotomicrografias eletrônicas de varreduras de seções transversais do cotilédone de sementes de seringueira durante o armazenamento. A – semente recém-

colhida; B, C e D – sementes armazenadas a 10°C (controle, químico e alecrim, respectivamente). E, F e G - sementes armazenadas a 20°C (controle, químico e alecrim, respectivamente). H, I e J - sementes armazenadas a 20°C (controle, químico e alecrim, respectivamente) 113

FIGURA 15. Comprimento de plântulas (parte aérea e raiz) oriundas de semente de seringueiras com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes temperaturas 114

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 5

- TABELA 1. Valores médios da porcentagem de germinação de sementes de seringueira submetidas a diferentes tratamentos, desdobradas dentro de cada temperatura de armazenamento.91
- TABELA 2. Resultados médios do teor de amido no endosperma de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento.93
- TABELA 3. Resultados médios do teor de amido em embriões de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento95
- TABELA 4. Resultados médios do teor de açúcares solúveis totais (AST) de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento97
- TABELA 5. Resultados médios do teor de proteínas solúveis totais de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento99
- TABELA 6. Resultados médios do teor de proteínas solúveis totais de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento99
- TABELA 7. Resultados médios do teor de lipídios em embriões de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento101
- TABELA 8. Resultados médios do teor de lipídios em embriões de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento101

RESUMO

SOUZA, Genaina Aparecida de. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (WILLD. EX ADR. DE JUSS.) MÜELL.-ARG.] durante o desenvolvimento e o armazenamento.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

Sementes recalcitrantes como as de seringueira não toleram baixas temperaturas no armazenamento e nem ser secas a baixos teores de umidade, o que dificulta o seu armazenamento. Além disso, há poucos estudos sobre o seu processo de desenvolvimento e maturação. Objetivou-se estudar as alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas durante o desenvolvimento das sementes de seringueira bem como seu comportamento durante o armazenamento. O estudo foi desenvolvido em duas etapas, a primeira relacionada ao desenvolvimento das sementes, que foi desenvolvido na Fazenda Experimental da Epamig em Oratórios-MG e nos Laboratórios de Anatomia, de Análise de Sementes da Universidade Federal de Viçosa. O desenvolvimento das sementes foi acompanhado pela marcação de flores durante a antese. A coleta dos frutos ocorreu a partir dos 15 dias após a antese (DAA), até a deiscência dos frutos. A cada 15 dias, foram feitas avaliações do tamanho dos frutos e das sementes, matéria seca, grau de umidade, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência, proteínas resistentes ao calor, enzimas do estresse oxidativo e teor de compostos de reserva das sementes. Os dados de germinação e índice de velocidade de emergência foram submetidos à análise de variância, teste de Tukey e regressão. A maturidade fisiológica das sementes de seringueira ocorreu aos 175 DAA, quando se obteve o máximo conteúdo de massa seca. Maiores porcentagem e velocidade de germinação foram obtidas em sementes colhidas aos 175 DDA e 180 DAA (sementes já dispersas). Aos 175 e 180 DAA, houve maior expressão de proteínas resistentes ao calor de baixo peso molecular (smHSP) e maior atividade das enzimas do estresse oxidativo. O maior acúmulo de compostos reserva nas sementes de seringueira ocorreu próximo à dispersão, tanto no endosperma quanto nos cotilédones e eixo embrionário. Foram observadas adaptações anatômicas que contribuem para manutenção de altas taxas metabólicas ao final do desenvolvimento das sementes, o que favoreceu o consumo dos compostos de reserva, fazendo com que o embrião não apresente dormência. Na etapa relacionada ao armazenamento, as sementes foram acondicionadas em embalagem de papel kraft colocadas em sacos plásticos e

armazenadas a 10 °C, 20 °C ou 25 °C, tratadas ou não com fungicidas químicos, Tecto 600 (35 g /100Kg semente), em associação ao Captan (75g/ 100Kg sementes) ou com alecrim (20g/Kg sementes), em delineamento fatorial 3x3x5 (tratamento, temperatura e período de armazenamento) . A cada 15 dias, foram realizadas avaliações quanto às alterações físicas, fisiológicas, bioquímicas e anatômicas. Os dados foram submetido a análise de variância, teste de Tukey e regressão, quando necessário. As sementes de seringueira armazenadas em temperatura de 10 °C apresentaram maior viabilidade e crescimento de plântulas do que aquelas armazenadas em temperaturas de 20 °C e 25 °C, possivelmente por apresentarem maior teor de compostos de reserva ao final do armazenamento. A redução na atividade das enzimas do estresse oxidativo afetou negativamente a viabilidade das sementes e o tratamento com fungicida químico apresentou fitotoxidez às sementes. Portanto, as sementes de seringueira utilizadas neste estudo, atingiram o ponto de maturação fisiológica aos 175 dias após antese (DAA) e quando armazenadas a 10 °C apresentaram viabilidade até 75 dias.

ABSTRACT

SOUZA, Genaina Aparecida de. Universidade Federal de Viçosa, July 2014. **Physiological and Biochemical alterations in rubber tree seeds [*Hevea brasiliensis* (WILLD. EX ADR. DE JUSS.) MÜELL.-ARG.] during the development and storage.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

Recalcitrant seeds like rubber tree seeds does not tolerate low temperatures in the storage and neither drying at low moisture content, what becomes difficult the storage of these seeds. There are few studies about the process of development and maturation. The objective was to study the biochemical, physiological and anatomical alterations during the development of rubber tree seeds, besides their behavior during the storage. The study was developed in two phases, the first related to the development of seeds, was developed at Eпамig experimental farm in Oratórios-MG and in the Anatomic Analyzes Laboratory and Seeds Analyzes Laboratory at Universidade Federal de Viçosa. The development of seeds was accompanied by the tagging of flowers during the anthesis. The gathering of the fruits occurs from 15 days after anthesis (DAA), until the dehiscence of fruits. Each 15 days, were realized evaluations of fruits and seeds size, moisture content, seedlings emergence, emergence speed index (ESI), heat resistant proteins, enzymes of the oxidative stress and the reserve compounds content. The dates of germination and ESI were submitted to the variance analyzes, Tukey test and regression. The physiological maturity of rubber tree seeds occurs at 175 DAA, when was not obtained the maximum content of dry mass. Higher percentage and speed of emergence were obtained in seeds gathering at 175 DAA and 180 DAA (seeds was already disperse). At 175 days and 180 DAA, there was higher expression of the heat resistant proteins with less molecular weight (smHSP) and higher activity of the enzymes of the oxidative stress. The greater accumulation of reserve compounds in rubber tree seeds occurs next to the dispersion, both in the endosperm and in the cotyledons and embryonic axis. Was observed anatomical adaptations which contributes to the maintenance of high metabolic taxes at the end of the development of seeds, what favored the consumption of reserve compounds, causing the non-dormancy of the embryo. At the step related to the storage, the seeds were conditioned in kraft paper that were placed inside polyethylene bags and stored at 10°C, 20°C or 25°C, treated or not with chemical fungicides Tecto 600 (35/100Kg seeds) in association with Captan (75g/100kg seeds) or with ground rosemary (20g/Kg), in factorial design 3x3x5 (treatment, temperature and storage period). Each 15 days, were realized evaluations about the physical, physiological, biochemical and anatomical alterations. The dates

were submitted to the variance analyzes, Tukey test and regression when necessary. The seeds of rubber tree stored in temperature of 10°C presented higher viability and seedling growth than those stored in temperatures of 20°C and 25 °C, possibly because the higher moisture content, contributes to preserve for longer, the reserve compounds at the end of the storage. The reduction in the activity of the enzymes of the oxidative stress affected negatively the viability of seeds and the treatment with chemical fungicide presented phytotoxicity to the seeds. Therefore, the rubber tree seeds used in this study, reached the physiological point maturity at 175 days after anthesis DAA and when stored at 10°C presented viability until 75 days.

INTRODUÇÃO GERAL

A seringueira *Hevea brasiliensis* (Willd.ex A. Juss.) Muell. Arg., pertencente à família Euphorbiaceae, tem como centro de diversidade a bacia amazônica e é a principal fonte de borracha natural comercial em todo o mundo. A borracha natural é sintetizada por aproximadamente 2.000 espécies de plantas pertencentes a 300 gêneros das famílias Euphorbiaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Moraceae, Papaveraceae e Sapotaceae (CORNISH et al., 1993). A borracha produzida a partir da seringueira apresenta grande importância econômica devido ao emprego de mão de obra durante todo o ano, oferecendo renda a trabalhadores rurais e pequenos produtores. Vale ressaltar que a borracha de alta qualidade e em grande quantidade é um biopolímero obtido exclusivamente da seringueira, apresenta importância estratégica e não pode ser substituído pela borracha sintética (VENKATACHALAM et al., 2013; MORENO et al., 2006).

No início do século passado, o Brasil era o maior produtor e exportador, hoje entretanto, devido a ocorrência da doença causada pelo fungo *Microcyclus ulei*, causador do mal das folhas da seringueira, é dependente da importação de borracha natural para suprir a demanda interna. Essa doença ocorre devido à alta umidade e temperatura da região de origem da seringueira e causa a queda das folhas da planta, reduzindo a área fotossinteticamente ativa e conseqüentemente reduz a produção de borracha. Dentro desse cenário, a região sudeste apresenta condições favoráveis à implantação de seringais, tais como: bioclima, relevo, solo, além de uma posição estratégica em relação aos principais centros consumidores de borracha natural no país. Minas Gerais ocupa um lugar de destaque, uma vez que possui amplo território para expansão da cultura, o que justifica o investimento neste estado e pode contribuir para a retomada da auto-suficiência da produção de borracha no Brasil.

Em termos sociais, a cultura da seringueira é adequada para pequenos e médios produtores, uma vez que o sistema de produção permite obtenção de renda o ano inteiro (FRANCISCO et al., 2009). Entretanto, apesar de a seringueira ser importante para o agronegócio nacional, cerca de 70% da borracha natural consumida no Brasil hoje é importada de países asiáticos. Dessa forma, a heveicultura pode ser considerada uma alternativa viável para mitigar problemas socioeconômicos e ambientais por ser adaptável às áreas degradadas, favorecendo sua estabilização e recuperação.

A característica recalcitrante das sementes implica em perda rápida de sua viabilidade, principalmente quando desidratadas a conteúdos de água inferiores a 30% (BONOME et al., 2009; CÍCERO, 1986). Este comportamento dificulta o seu armazenamento a médio e longo prazo, acarretando prejuízos à sua implantação e inviabilizando a instalação de viveiros nas regiões “escapes”, locais onde as condições climáticas não propiciam a incidência do mal das folhas. A recalcitrância das sementes de seringueira gera restrição de sua oferta em períodos adequados de semeadura, uma vez que dispersão na região sudeste ocorre por volta de fevereiro e março. A rápida perda de viabilidade durante o intervalo entre a colheita e a semeadura para a formação das mudas, gera um gasto de sementes em geral, quatro vezes maior do que uma cultura convencional, onerando os custos de produção (MOREIRA, 2009).

A colheita das sementes ocorre durante a deiscência do fruto, quando são dispersas e pouco se conhece sobre o processo de desenvolvimento e maturação destas sementes, especialmente sobre o período em que atingem a maturidade fisiológica. Neste momento, a planta cessa a translocação de assimilados para a semente e em geral a qualidade é máxima, proporcionando elevada porcentagem de germinação e vigor (MATA et al., 2013). Estudos relacionados ao desenvolvimento e maturação das sementes de seringueira visando a sua colheita em época adequada e alta qualidade fisiológica e sanitária são imprescindíveis. Entretanto, estes estudos, são escassos e, até o momento, inconclusivos. Dessa forma, o objetivo foi acompanhar e descrever as alterações anatômicas e fisiológicas durante o desenvolvimento das sementes de seringueira até a sua deiscência e avaliar condições para preservar sua viabilidade por maior período de tempo.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1.1. – A SEMENTE DE SERINGUEIRA

O cultivo da seringueira é justificado por ser uma espécie produtora de borracha natural de alta qualidade quando comparada às demais plantas produtoras de borracha (VENKATACHALAM et al., 2013), sendo empregada na indústria como matéria prima de mais de 50 mil produtos (MORENO et al., 2006). O cultivo da seringueira, quando comparado ao da maioria das culturas anuais com uso intensivo de mecanização tanto no preparo de áreas como na colheita, constitui um tipo de uso do solo extremamente desejável do ponto de vista ecológico (ALVARENGA et al., 2006).

As sementes de seringueira são consideradas grandes, apresentando peso de 3,5 a 6,0 g e forma oval ligeiramente achatada. O tegumento é duro e brilhante de cor marrom com numerosos matizes sobre a superfície dorsal. É possível identificar a árvore ou clone que deu origem as sementes pelas matizes do dorso e pelo seu formato, visto que, o tegumento é tecido maternal e o formato deste é determinado pela pressão externa da cápsula durante seu desenvolvimento (Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, 2004).

A grande maioria das pesquisas envolvendo seringueira destina-se a produção do látex, sendo pouca atenção destinada às demais fases do processo (BONOME et al., 2009), como a produção de sementes e mudas. Em geral, na região sudeste, as sementes de seringueira são coletadas nos meses de fevereiro e março, sendo imediatamente semeadas por perderem rapidamente seu poder germinativo. Assim, germinam quando as condições climáticas são menos favoráveis (início da incidência de baixas temperaturas e pouca chuva), logo a disponibilidade de sementes em qualidade e quantidade adequada se torna de fundamental importância para a exploração econômica dessa cultura (MOREIRA, 2009).

A característica recalcitrante dessas sementes faz com que percam rapidamente o poder germinativo, principalmente, quando as condições climáticas propiciam rápida redução do seu teor de água. Essas sementes, mesmo quando mantidas sob condições consideradas adequadas para o armazenamento, apresentam longevidade relativamente curta se comparadas às sementes ortodoxas (VIEIRA, 1991).

Moreira (2009) estudando o desenvolvimento de sementes de seringueira relata que estas apresentaram proteínas resistentes ao calor e que a maturidade fisiológica é alcançada aos 195 dias após a polinização. Segundo mesmo autor, o acúmulo de amido e proteínas solúveis no endosperma dessas sementes ocorre, principalmente, a partir dos

95 dias após ser polinizada. Porém, o fato das sementes de seringueira acumularem reserva e apresentarem o acúmulo de proteínas do tipo sHSPs (proteínas de choque térmico de baixo peso molecular), durante o seu desenvolvimento, não lhes confere tolerância à dessecação. Acredita-se que a tolerância à dessecação não possa ser atribuída a um simples mecanismo de proteção, ao contrário, ela parece ser um fenômeno multifatorial em que cada componente é igualmente crítico, agindo em sinergismo e controlado geneticamente (LEPRINCE et al. 1993).

Desta forma, conhecer as alterações anatômicas e fisiológicas que ocorrem durante o desenvolvimento e armazenamento de sementes de seringueira poderá auxiliar na elaboração de técnicas que prolonguem sua viabilidade.

1.2. – ALTERAÇÕES DURANTE A MATURAÇÃO DE SEMENTES

Alterações físicas, anatômicas e fisiológicas ocorrem nas sementes durante sua maturação, dentre elas a variação da cor e opacidade do tegumento, o teor de água e matéria seca, a capacidade de germinação e capacidade de produzir plântulas normais (BORGES et al. de 2005), alterações de sua composição química (MATA et al., 2013), e redução no tamanho e número de vacúolos (CACCERE et al., 2013). Essas alterações podem ser utilizadas para estimar o Ponto de Maturidade Fisiológico das Sementes (PMFS), onde em geral, as sementes apresentam maior porcentagem de matéria seca, o qual pode coincidir com maior germinação e vigor, ou seja, possivelmente o melhor momento para colheita, onde a qualidade fisiológica das sementes é máxima (BORGES et al., 2005, MATHEUS et al., 2011).

No início do desenvolvimento o conteúdo de água é muito alto, geralmente acima de 80% para a maioria das angiospermas (MARCOS FILHO, 2005). Durante a maturação o teor de água diminui até atingir valores próximos de 50%. Neste ponto, sementes classificadas como ortodoxas apresentam tolerância à dessecação e são dispersas com menor teor de água. Enquanto as recalcitrantes não apresentam tolerância à dessecação e são dispersas com conteúdo de água elevado, variando de acordo com a espécie e as condições de ambiente (BARBEDO et al., 2013).

Alterações nos metabólitos das sementes também são observadas, tais como a disponibilidade de açúcares que são fonte de energia para o crescimento e agem como substratos imediatos para o metabolismo e formação de moléculas de sinalização (EVELEND e JACKSON, 2012). Geralmente a disponibilidade de açúcar está ligada ao crescimento e ao desenvolvimento, mas não se sabe exatamente como a concentração e

o tipo de açúcar controlam o crescimento. Na literatura existem informações detalhadas do papel da glicose sobre os mecanismos de sinalização e seu envolvimento no crescimento e desenvolvimento de plantas. A sacarose, glicose e frutose são amplamente relacionadas com o fornecimento de substrato para a respiração, atuando como fonte de energia para manutenção do metabolismo. São também fonte de carbono para a produção de outros metabólitos, além de aminoácidos, lipídios, proteínas, celulose, amido, clorofilas, carotenoides e fito hormônio (BONOME et al., 2011). Estudos recentes associaram os açúcares à sinalização molecular, onde podem interagir com diferentes fito hormônios e causar alterações na expressão gênica (BONOME et al., 2011; MISHRA et al., 2009).

Outro composto de reserva de importância nas sementes são os lipídios. Em estudos relacionados à maturação de pinhão manso, Rubio et al. (2013) e Santos et al. (2012), relataram aumento neste composto de reserva a medida que a semente avançava na fase de maturação, acompanhando o aumento de matéria seca. Com relação às proteínas, em geral, observa-se um aumento na concentração ao longo do desenvolvimento das sementes (PAVITHRA et al., 2014). Além das proteínas solúveis em muitos casos, é observado o aumento da expressão de proteínas resistentes ao calor (HSP). Essa família de proteínas é encontrada em todos os organismos vivos. Em vegetais, já foram encontradas mais de 30 famílias dessas proteínas que são altamente conservadas (WALTERS, 2013), e sintetizadas durante o desenvolvimento do embrião e maturação dos frutos (KALEMBA et al., 2012). Apesar dessas proteínas estarem ligadas à tolerância dessecação em sementes ortodoxas, existem relatos de que estão presentes também em espécies recalcitrantes, principalmente no final da maturação (WALTERS, 2013).

No entanto somente o acúmulo dessa classe de proteína não é suficiente para que a semente de seringueira tolere a dessecação. Outras adaptações como as relacionadas à redução do tamanho dos vacúolos, redução do metabolismo, acúmulo de proteínas LEA, oligossacarídeos, açúcares solúveis (HOEKSTRA et al., 2001) são necessárias. E ainda incluem-se nessas modificações, mecanismos eficientes na remoção de espécies reativas de oxigênio (BAILLY, 1994).

Em relação à anatomia é possível observar redução no número de organelas que compõe as células e redução do tamanho dos vacúolos (CACCERE et al., 2013; MOURA et al., 2010), entre outras. Essas alterações são frequentemente observadas em sementes ortodoxas, porém em sementes recalcitrantes essas modificações são menos frequentes. Em sementes de *Inga vera* Caccere et al. (2013) verificaram menor

proporção de polissacarídeos contendo arabinose e aumento no número e tamanho dos vacúolos no embrião. Modificações que segundo este autor indica alta atividade metabólica com o objetivo de gerar energia até que a semente seja dispersa e possa germinar imediatamente.

1.3. – ARMAZENAMENTO DE SEMENTES RECALCITRANTES

As sementes ortodoxas podem ser dispersas da planta mãe com baixa ou alta umidade e toleram a dessecação (umidade entre 3-7%) e temperaturas inferiores a 0°C. Já as sementes recalcitrantes são dispersas da planta mãe com alta umidade e mecanismos adaptativos que proporcionam germinação rápida (OBROUCHEVA et al., 2012). O armazenamento de sementes recalcitrantes representa um desafio maior que o das sementes ortodoxas. Isso porque, as sementes recalcitrantes são altamente sensíveis à perda de água, o que faz com que seja necessário o armazenamento com alto grau de umidade. No entanto, essa elevada umidade favorece a manutenção do metabolismo alto que acarreta o maior consumo das reservas e o ataque de microrganismos e ainda a ocorrência de germinação durante o armazenamento. O uso de baixas temperaturas durante o armazenamento que poderia minimizar estes problemas, não é uma solução, pois as sementes recalcitrantes também sofrem injúrias por temperaturas próximas ou abaixo de zero (BARBEDO et al., 2013; CACCERE et al., 2013).

Muitas espécies economicamente importantes de árvores tropicais têm sementes recalcitrantes, e armazená-las com sucesso é ainda um problema (LAN et al., 2012). O tempo de armazenamento dessas sementes pode variar de duas semanas a vários meses (TOMPSETT e KEMP, 1996), e relaciona-se com a redução da umidade das sementes e da temperatura de armazenamento que dentre outros benefícios contribuem para reduzir a incidência de microrganismos (BARBEDO et al., 2013; PARISI et al., 2013), fato este que afeta a conservação das sementes durante o período de armazenamento.

Porém as sementes recalcitrantes são mantidas com alto teor de umidade e desta forma, devem ser mantidas em temperaturas acima de 0°C (PASQUINI et al., 2012) para evitar o congelamento da água interna e a formação de cristais de gelo que podem romper as membranas celulares levando a semente à morte. No final da maturação as sementes ortodoxas sofrem alterações que favorecem a tolerância à secagem e a baixas temperaturas (BARBEDO et al., 2013). Dentro dessas alterações, estão o aumento do número dos vacúolos e principalmente a redução no seu tamanho (CACCERE et al.,

2013), aumento na concentração de oligossacarídeos e acúmulo de proteínas resistentes ao calor.

Em sementes recalcitrantes essas alterações também ocorrem, porém no sentido de aumentarem a eficiência da respiração e produção de energia até que essas sementes sejam dispersas da planta-mãe (CACCERE et al., 2013). Este comportamento torna difícil a sua conservação. Vale destacar que o nível de recalcitrância varia entre sementes de diferentes espécies, entre sementes da mesma espécie e de acordo com as condições ambientais em que as sementes se desenvolvem (DELGADO e BARBEDO, 2012; LAMARCA et al., 2013).

Nessa classe de plantas que apresentam sementes, sensíveis a dessecação se encontra a seringueira. Suas sementes perdem a viabilidade rapidamente e poucas vezes o período de armazenamento excede alguns meses (CHIN et al. 1981). Segundo Roberts (1973) as alterações citológicas e metabólicas são os fatores que melhor se associam com a perda da viabilidade das sementes recalcitrantes. O armazenamento de sementes de seringueira vem sendo estudado com relação às condições adequadas para manutenção da viabilidade (BARRUETO et al., 1986; CÍCERO et al., 1986; CHIN et al., 1981).

No entanto, resultados contraditórios são observados na literatura em relação à temperatura de armazenamento de sementes de espécies recalcitrantes. Segundo Cruz et al. (2007), sementes de *Theobroma grandiflorum* não toleram condições de baixas temperaturas (10°C). Semelhante a esse resultado, temperaturas iguais ou inferiores a 15°C foram desfavoráveis ao armazenamento de sementes de *Myrciaria dubia* (FERREIRA e GENTIL, 2003) e de *Campomanesia adamantium* Camb. (MELCHIOR et al., 2006). porém, sementes de *Poncirus trifoliata* (OLIVEIRA et al., 2003) e de *Inga uruguensis* (BARBEDO; CÍCERO, 2000) foram bem conservadas sob baixa temperatura.

Segundo Pereira (1980) e Cícero (1986) as sementes de seringueira podem manter sua viabilidade por períodos de 5 a 6 meses, quando a umidade inicial estiver ao redor de 30%, em temperatura ambiente (27°C) e apresentar qualidade inicial adequada. Entretanto, a germinação dessas sementes pode cair para menos de 45% em um mês, e perder quase toda a viabilidade em 50 dias, após a dispersão, mesmo em condições ideais (DIJKMAN, 1951; PEREIRA, 1980; BERJAK, 1989). Ainda de acordo com Cícero et al. (1980) e Pereira (1980), sementes desta espécie não toleram temperaturas inferiores a 15°C. Por outro lado, Paula et al. (1997) verificaram que a condição de baixa temperatura, 5°C, foi mais eficiente em prolongar a viabilidade das sementes do

que a temperatura de 20°C. Em outro estudo Bonome et al. (2009) verificaram que o armazenamento em temperatura ambiente foi mais eficiente em prolongar a viabilidade das sementes de seringueira quando comparado com a temperatura de câmara fria (10°C).

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com intuito de prolongar o tempo de armazenamento de sementes recalcitrantes, mas poucos avanços foram obtidos (BARBEDO et al., 2013). Uma alternativa que vem sendo utilizada é a criopreservação do embrião (SERSHEN et al., 2012b; HAMILTON et al., 2013; WALTERS et al., 2013), mas este método não se configura como conservação de sementes propriamente dito. Desta maneira, para melhor estudar a manutenção da viabilidade das sementes de seringueira é importante conhecer detalhes do seu comportamento durante a maturação possibilitando maior entendimento acerca das alterações que ocorrem durante o armazenamento.

1.4. – ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) depende largamente do conteúdo de água das sementes, que é elevado nas fases iniciais do desenvolvimento (GOMES et al, 2013). No caso das sementes recalcitrantes há apenas uma redução parcial do teor de água no final da maturação, sendo dispersas com cerca de 50 % de umidade. Os compartimentos celulares como o glioxissomos, peroxissomos, mitocôndrias, cloroplasto e as membranas plasmáticas são fontes de EROS, mesmo em metabolismo normal (BAILLY, 2004).

Durante a reativação do metabolismo das sementes a geração de EROS é fundamental (GOMES et al., 2013). O aumento da produção de H₂O₂ durante o início da embebição, do óxido nítrico, dos radicais superóxido, por exemplo, são associados ao afrouxamento de barreiras mecânicas à germinação. E ainda desempenham papel como sinalizadores para a expressão de um grande número de genes associados ao processo germinativo (MULLER et al., 2009).

Entretanto, um recurso que as plantas utilizam para contornar a produção desses compostos em excesso que pode prejudicar o metabolismo celular levando a semente à morte é a ação das enzimas do estresse oxidativo. Dentre as enzimas do estresse oxidativo mais estudadas se encontram a superóxido dismutase (SOD), a peroxidase (POX), a catalase (CAT) e ascorbatoperoxidase (APX) (SELOTE et al., 2004), responsáveis por diminuir os efeitos deletérios da produção excessiva de EROS.

A APX e a CAT são consideradas as duas enzimas mais importantes na desintoxicação do H_2O_2 (BHATT e TRIPATHI, 2011). A CAT converte duas moléculas de H_2O_2 a H_2O e oxigênio molecular (DUBEY, 2011). Em concentrações elevadas de H_2O_2 , a CAT é altamente efetiva, sendo consideradas essenciais em condições de estresse severo, quando os níveis de H_2O_2 são maiores (DUBEY, 2011). A APX é uma heme-proteína, utiliza o ácido ascórbico como redutor. Tem alta afinidade com o H_2O_2 , o que permite a eliminação do H_2O_2 mesmo em baixas concentrações (SHARMA et al., 2012; LOCATO et al., 2010). Nos cloroplastos e mitocôndrias a APX atua no ciclo ascorbato-glutationa, no qual o H_2O_2 formado pela ação da SOD é reduzido pelo ascorbato (MITTLER, 2002; LOCATO et al., 2010).

As POXs utilizam o H_2O_2 como oxidante e compostos de natureza fenólica como doadores de elétrons. Dessa forma, o H_2O_2 formado pela ação da SOD também pode ser eliminado pelas POXs, além da CAT e APX (LOCATO et al., 2010). As POXs são amplamente distribuídas nas células vegetais, mas localizam-se principalmente na parede celular e no vacúolo. A atividade dessas enzimas pode ser utilizada como marcador bioquímico do estresse resultante de fatores bióticos e abióticos, e processos morfogênicos durante a diferenciação celular, crescimento e multiplicação de plantas (LOCATO, 2010; KIM e KWAN, 2010).

Já as SODs são metaloproteínas que catalisam a desmutação de radicais superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio. Essas enzimas são classificadas de acordo com seus cofatores: cobre e zinco (Cu/Zn- SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD) (GILL e TUJETA, 2010). São consideradas a primeira linha de defesa contra os EROS que catalisam a dismutação de dois radicais O_2 , gerando H_2O_2 e O_2 .

1.5. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, A. P. Sequestro de carbono: quantificação em seringueiras de cultivo e na vegetação natural. Viçosa (MG): EMBRAPA/UFMG/EPAMIG, 2006.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v.14, p. 93-107, 2004.
- BARBEDO, C.J.; CENTENO, D.C.C.; RIBEIRO, R.C.L.F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, v. 40, p. 583-593, 2013.
- BARBEDO, C.J.; CICERO, S.M. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. **Seed Science and Technology**, v. 28, p.793-808, 2000.
- BARUETO, L.P.; PEREIRA, L.P.; NEVES, M.A. Influência da maturação fisiológica e do período entre a coleta e o início do armazenamento sobre a viabilidade de sementes de seringueira (*Hevea sp.*). **Turrialbam**, v.36, n.1, p.65-75, 1986.
- BERJAK, P. Storage of seeds of *Hevea brasiliensis*. **Journal Natural Rubber Research**, v. 4, n. 3, p. 195-203, 1989.
- BHATT, I.; TRIPATHI, B.N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v.29, p.850-859, 2011.
- BONOME, L.T.S.; MOREIRA, S.A.F.; OLIVEIRA, L.E.M.; SOTERO, A. J. Metabolism of carbohydrates during the development of seeds of the Brazilian rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. De Juss) Muell.-Arg.]. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 211–219, 2011
- BONOME, L.T. DA S.; OLIVEIRA, L.E.M.; GRACIANO, M.H.P.; MATTOS, J.O.S.; MESQUITA, A.C. Influência do tratamento fungicida e da temperatura sobre a qualidade fisiológica de sementes de seringueira durante o armazenamento. **Agrarian**, v.2, n.5, p.97-112, 2009.
- BORGES, I.F.; BARBEDO, C.J.; RICHTER, A.A.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2006. Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of Brazil wood (*Caesalpinia chinata* Lam., Leguminosae). **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 475-482.
- CACCERE, R.; TEIXEIRA, S.P.; CENTENO, D.C.; FIGUEIREDO- RIBEIRO, R.C.L.; BRAGA, M.R. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 791-800, 2013.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5ed. Jaboticabal: Funep, 2012.
- CARNEIRO, J.G.A. & AGUIAR, I.B. Armazenamento de sementes. In *Sementes florestais tropicais* (Aguiar, I.B.; Piña-Rodrigues F.C.M.; Figliolia, M.B). Brasília: **Abrates**, p.333-350, 1993.

- CORNISH, K.; SILER, D.J.; GROSJEAN, O.K.; GODMAN, N. Fundamental similarities in rubber particle architecture and function in three evolutionarily divergent plant species. **Journal Natural Rubber Research**, v. 8, p. 275-285, 1993.
- CRUZ, D.E. Secagem e germinação de sementes de cupuaçu (The obromagrandidiflorum (Wiild. ex Spreng.) Schum. - STERCULIACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 197-201, 2007.
- DELGADO, L.F.; BARBEDO, C.J. Water potential and viability of seeds of Eugenia (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 583-590, 2012.
- DIKMAN, M. Líwea, flirty years of research in the Fax East. Florida, University of Miami Press, **Coral Gable**, p. 43, 1951.
- DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygenspecies and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, Chap.9, p.178-203, 2011.
- EVELAND, A.L.; JACKSON, D.P. Sugars, signalling, and plant development. **Journal of Experimental Botany**, 2011.
- FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK- WOCHNIAK, E.; FERNI, A.R.; GALILI, G. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. **Plant Physiology**, v.142, p. 839-854, 2006.
- FERREIRA, S. A. N.; GENTIL, D. F. O. Armazenamento de sementes de camucamu (Myrciaria dúbia) com diferentes graus de umidade e temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 440-442, 2003.
- FRANCISCO, V.L.F.S.; BUENO, C.R.F.; FILHO, E.P.C.; VICENTE, M.C.M.; BAPTISTELLA, C.S.L. Análise comparativa da heveicultura no estado de são paulo, 1995/96 e 2007/08. **Informações Econômicas**, SP, v.39, n.9, 2009.
- GIL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p. 909-930, 2010.
- GOMES, M.P.; GARCIA, Q.S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia**, Section Botany, v. 68/3, p. 351—357, 2013.
- HAMILTON, K.N.; OFFORD, C.A.; CUNEO, P.; DESEO, M.A. A comparative study of seed morphology in relation to desiccation tolerance and other physiological responses in 71 Eastern Australian rainforest species. **Plant Species Biology**, v. 28, p. 51-62, 2013.
- HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends Plant Sciences**, v. 6, p.431–438, 2001.
- KALEMBA, E.M.; JANOWIAK, F.; PUKACKA, S. Association of Protective Proteins with Dehydration and Desiccation of Orthodox and Recalcitrant Category Seeds of

- Three Acer Genus Species. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 31, p.351–362, 2012.
- KIDD, F. The controlling influence of carbon dioxide in the maturation, dormancy and germination of seeds. Part II. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 87, p. 609-625, 1914.
- KIM, Y.H.; KWAK, S.S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: **Science Publishers**, p.129-150, 2010.
- LAMARCA, E.V.; PRATAVIERA, J.S.; BORGES, I.F.; DELGADO, L.F.; TEIXEIRA, C.C.; CAMARGO, M.B.P.; FARIA, J.M.R.; BARBEDO, C.J. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and termal conditions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p. 223-233, 2013.
- LAN, Q.Y.; LUO, Y.L.; MA, S.M.; LU, X.; YANG, M.Z.; TAN, Y.H.; JIANG, X.N.; TAN, Y.P.; WANG, X.F. and LI, Z.Y. Development and storage of recalcitrant seeds of *Hopea hainanensis*. **Seed Science & Technology**, v. 40, p. 200-208, 2012.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A.F.; McKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Walling ford, v.3, p.231-246, 1993.
- LOCATO, V. Reactive oxygen species and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: **Science Publishers**, p.45-64, 2010.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. FEALQ, Piracicaba, 2005.
- MATA, M.F.; SILVA, K.B.; BRUNO, R.L.A.; FELIX, L.P.; MEDEIROS FILHO, S.; ALVES, E.U. Maturação fisiológica de sementes de ingazeiro (*Inga striata* Benth). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p.549-566, 2013.
- MATHEUS, M.T.; LOPES, J.C.; CORRÊA, N.B. Maturação fisiológica de sementes de *Erythrina variegata* L. **Ciência Florestal**, v. 21, p. 619-627, 2011.
- MELCHIOR, S.J.; CUSTÓDIO, C.C.; MARQUES, T.A.; MACHADO NETO, N.B. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb. Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.141-150, 2006.
- MISHRA B.S.; SINGH, M.; AGRAWAL, P.; LAXMI, A. Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. **PLOS ONE**, v.4 (2): e4502, 2009.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

- MOREIRA, S.A.F. Caracterização morfo-anatômica, fisiológica e bioquímica do desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira (*Hevea* spp.). 124p. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, 2006.
- MORENO, R.M.B.; MEDEIROS, E.S.; FERREIRA, F.C.; ALVES, N.; GONÇALVES, P. S.; MATTOSO, L. H. C. **Plastic Rubber Composites: Materials Technology**, v. 35, p.15-21, 2006.
- MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeate* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v. 67, p. 399-407, 2010.
- MULLER, K.; CARSTENS, A.C.; LINKIES, A.; TORRES M.A.; LEUBNER-METZGER, G. The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in Arabidopsis seed after-ripening. **New Phytologist**, v. 184, p. 885– 897, 2009.
- OBROUCHEVA, N.V.; LITYAGINA, S.V.; NOVIKOVA, G.V.; SIN'KEVICH, I.A. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination. **Annals of Botany Plants**, v. 12, p. 1-14, 2012.
- OLIVEIRA,R.P.; SCIVITTARO,W.B.; RADMANN, E.B. Procedimentos para o armazenamento de sementes de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 461-463, 2003.
- PARISI, J.J.D.; BIAGI, J.D.; BARBEDO, C.J.; MEDINA, P.F. Viability of *Inga vera* Willd. subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. embryos according to the maturation stage, fungal incidence, chemical treatment and storage. **Journal of Seed Science**, v. 35, p. 70-76, 2013.
- PASQUINI, S.; MIZZAU, M.; PETRUSSA, E.; BRAIDOT, E.; PATUI, S.; GORIAN, F.; LAMBARDI, M.; VIANELLO, A. Seed storage in polyethylene bags of a recalcitrante species (*Quercus ilex*): analysis of some bio-energetic and oxidative parameters. **Acta Physiologia Plantarum**, v.34, p. 1963-1974, 2012.
- PAULA, N. F.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; PAULA, R. C. Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 326-333, abr. 1997.
- PAVITHRA, H.R.; GOWDA, B.; SHIVANNA, M. B. Biochemical changes in the composition of developing seeds of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. **Industrial Crops and Products**, v.53, p. 199– 208, 2014.
- PEREIRA, J. P. Conservação da viabilidade do poder germinativo da semente de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 237- 244, 1980.
- PERGO E.M.; ISHII-IWAMOTO, E.L. Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L.

- and the responses to allelochemicals. **Journal Chemistry Ecology**. v.37, p. 500–513, 2011.
- RHOADS, D.M.; UMBACH, A.L.; SUBBAIAH, C.C.; SIEDOW, J.N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. **Plant Physiology**, v.141, p. 357–366, 2006.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499-514, 1973.
- RUBIO, F.; MENEGHEL, A.P.; GOMES, L.F.S.; MALAVASI, M. M. Estádios de maturação do fruto no desempenho germinativo e teor de óleo de sementes de *Jatropha curcas* Linn. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 663-668, mar./abr. 2013.
- SANTOS, S.B.; MARTINS, M.A.; AGUILAR, P.R.M.; CANESCHI, A. L.; ANGÉLICA, C. O.; CARNEIRO, A.C.O.; DIAS, L. A. Acúmulo de matéria seca e óleo nas sementes de pinhão-mansão e qualidade do óleo extraído. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v.16, n.2, p. 209–215, 2012.
- SELOTE, D.S.; BHARTI, S.; CHOPRA, R. K. Drought acclimation reduces O²-accumulation and lipidperoxidation in wheat seedlings. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.314, p.724-729, 2004.
- SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012, p.1-26, 2012.
- SERSHEN; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; WESLEY- SMITH, J. Rate of dehydration, state of subcellular organisation and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. **Protoplasma**, v. 249, p. 171-186, 2012b.
- TOMPSETT, P.B.; KEMP, R. Database of tropical tree seed research, **Royal Botanic Gardens**, Kew, Richmond, Surrey, 1996.
- VENKATACHALAM, P.; GEETHA, N.; SANGEETHA, P.; THULASEEDHARAN, A. Natural rubber producing plants: An overview. **African Journal of Biotechnology**, v. 12(12), p. 1297-1310, 2013.
- WALTERS, C.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.; KENNEDY, K.; RAVEN, P. Preservation of recalcitrant seeds. **Science**, v. 339, p. 915-916, 2013.

CAPITULO 2

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DE SEMENTES DE SERINGUEIRA

RESUMO

SOUZA, Genaina Aparecida de. Universidade Federal de Viçosa, July 2014. **Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o desenvolvimento e maturação de sementes de seringueira.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

O objetivo foi avaliar as alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas durante o desenvolvimento de sementes de seringueira até a sua deiscência, com intuito de estimar o ponto de maturidade fisiológica e obter sementes de elevada qualidade. O experimento foi desenvolvido na Fazenda experimental da Epamig em Oratórios-MG e nos Laboratórios de Pós Colheita e Análise de Sementes da Universidade Federal de Viçosa. Foram selecionadas 30 plantas nos diferentes pontos de uma área de plantio comercial de seringueira. As flores foram marcadas durante a antese e a cada 15 dias, após a marcação, foram realizadas colheitas de frutos e sementes para análises do grau de umidade, matéria seca, crescimento (diâmetro e comprimento). Também foram avaliadas a condutividade elétrica, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência, proteínas resistentes ao calor e enzimas do estresse oxidativo (Catalase-CAT; peroxidase – POX; peroxidase do ascorbato – APX e superóxido dismutase – SOD). Os dados de germinação e índice de velocidade de emergência foram submetidos ao teste de Tukey e regressão, para os demais utilizou-se estatística descritiva. Foi possível observar que os frutos atingiram o tamanho máximo aos 120 dias após a antese (DAA), e as sementes aos 150 DAA. As sementes adquiriram a capacidade de germinação a partir dos 150 DAA. Aos 175 DAA elas apresentaram máxima porcentagem de matéria seca e menor de umidade, além de maior porcentagem de geminação e vigor. Portanto foi possível concluir que a maturidade fisiológica das sementes de seringueira ocorre aos 175 DAA, e coincide com sua máxima qualidade fisiológica. Maiores porcentagem e velocidade de germinação são obtidas em sementes colhidas aos 175 e 180 DAA. Aos 175 e 180 DAA, há maior expressão de proteínas resistentes ao calor de baixo peso molecular (smHSP) e maior atividade das enzimas do estresse oxidativo.

Palavras chaves: Maturidade fisiológica, germinação, enzimas do estresse oxidativo

ABSTRACT

SOUZA, Genaina Aparecida de. Universidade Federal de Viçosa, July 2014. **Biochemical and physiological alterations in rubber tree seeds during the development and maturation.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

The objective of this study was to evaluate the biochemical, physical and physiological alterations during the development of rubber tree seeds until the dehiscence aiming to estimate the point of physiological maturity of seeds (PPM) and to obtain seeds with high quality. The experiment was conducted at Epamig experimental farm in Oratórios-MG and in the Post-harvest Laboratory and Seeds Analyzes Laboratory at Universidade Federal de Viçosa. Were selected 30 plants in different points of rubber tree commercial planting. The flowers were tagged during the anthesis and each 15 days. After the tagging were realized the gathering of fruits and seeds for analyses of the moisture content, dry mass, growth (diameter and length). Was also evaluated the electric conductivity, seedlings emergence, emergence speed index (ESI), heat resistant proteins and enzymes of the oxidative stress; catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POX) and superoxide dismutase (SOD). The dates of germination and ESI were submitted to Tukey test and regression, for the others dates were used descriptive statistic. Was possible to observe that the fruits reached the maximum size at 120 days after anthesis (DAA) and seeds at 150 DAA. The seeds reached the germination capacity from 150 DAA. At 175 DAA they presented maximum percentage of dry mass and less percentage of moisture content, besides higher percentage of germination and vigour. Therefore, was possible to conclude that the physiological maturity of rubber tree seeds occurs at 175 DAA and coincides with their maximum physiological quality. Higher percentage and germination speed are obtained in seeds gathering at 175 and 180 DAA. At 175 and 180 DAA, there are higher expression of heat resistant proteins of less molecular weight (smHSP) and higher activity of the enzymes of the oxidative stress.

Key words: Physiological maturity, germination, oxidative enzymes stress.

2.1. – INTRODUÇÃO

Durante a maturação e o desenvolvimento das sementes, ocorrem alterações físicas e fisiológicas como a mudança na cor e opacidade do tegumento, teor de água e matéria seca, capacidade de germinação, capacidade de produzir plântulas normais (BORGES et al., 2005) e composição química (MATA et al., 2013). Essas alterações podem ser utilizadas para estimar o Ponto de Maturidade Fisiológico das Sementes (PMFS), que normalmente ocorre quando há maior porcentagem de matéria seca, o que pode coincidir com a maior germinação e vigor, e possivelmente a qualidade fisiológica das sementes é máxima (MATHEUS et al., 2011; BORGES et al., 2005).

No início do desenvolvimento o conteúdo de água é muito alto, geralmente acima de 80% para a maioria das angiospermas (MARCOS FILHO, 2005). Durante a maturação o teor de água diminui até atingir valores próximos de 50%. A partir deste momento a umidade varia de acordo com as condições ambientais e da espécie. O teor de água (BARBEDO et al., 2013) e a porcentagem de matéria seca (CACCERE et al., 2013) são considerados bons índices para estimar o PMFS. Além das alterações nesses parâmetros, em algumas espécies, o tamanho das sementes pode ser considerado. Porém, para a maioria das espécies, o tamanho máximo é alcançado no início do desenvolvimento e mantém-se relativamente inalterada, até o final do processo, bem como a capacidade de germinação, (LAMARCA et al., 2013; BORGES et al., 2005).

O comportamento geral do processo de maturação pode ser previsível, porém para estimar a maturidade de uma determinada semente é necessário avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento em associação às condições climáticas nas quais as sementes se desenvolveram. Como exemplos citam-se alterações no teor de compostos de reserva, aumento na expressão de proteínas resistentes ao calor e maturação dos frutos (WALTERS, 2013; KALEMBA et al., 2001). Essas alterações podem estar relacionadas ao ponto de maturação de sementes recalcitrantes e o aumento na expressão dessas proteínas (MOREIRA, 2009), assim como alterações no conteúdo de amido e açúcares durante o desenvolvimento de sementes de seringueira (BONOME et al., 2011), já foram relatados.

O conhecimento a respeito das alterações físicas e fisiológicas que ocorrem durante o desenvolvimento de sementes de seringueira podem ser relevantes para obtenção de sementes de alta qualidade fisiológica. Portanto o objetivo desse estudo foi monitorar as principais alterações que ocorrem ao longo do desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira e caracterizar o ponto de maturidade fisiológica.

2.2. – MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido na fazenda experimental da EPAMIG, município de Oratórios, MG, em um plantio comercial de seringueira *Hevea brasiliensis*, coordenadas 20°24'39.46''S e 42°49'13.91'' O, e altitude de 530m. O experimento foi desenvolvido entre agosto de 2012 e fevereiro de 2013.

As inflorescências foram marcadas e identificadas com marcadores tipo fita impermeáveis durante a abertura das flores para o acompanhamento do número de dias após a antese (DAA). Foram selecionadas flores em diferentes posições em um total de 30 plantas selecionadas em diferentes pontos no plantio. Durante o período entre a abertura das flores e a dispersão dos frutos foram feitas coletas a cada 15 dias, realizando-se os seguintes testes e determinações:

O Comprimento e diâmetro dos frutos e das sementes foram determinados a cada 15 dias até 175 DAA, iniciando-se a partir de 15 DAA (frutos), e de 45 DAA (sementes). As medições foram realizadas em 30 frutos (não retirados da planta) e em 90 sementes, com a ajuda de um paquímetro digital.

Teor de água das sementes e frutos foi determinado pelo método da estufa a 105°C, por 24 horas (BRASIL, 2009), utilizando-se quatro repetições de 10 sementes e de três frutos, quebrados para facilitar a secagem. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Massa seca das sementes foi determinada utilizando quatro repetições de 10 sementes que foram mantidas em estufa a 70°C até obtenção de peso constante.

A condutividade elétrica foi obtida com quatro repetições de 10 sementes para cada tratamento. Sementes de cada repetição foram pesadas em balança com precisão de 0,001g e, a seguir, colocadas em copos de plástico contendo 200 ml de água destilada, permanecendo por um período de 24 horas à temperatura constante de 25°C. A condutividade elétrica da solução contendo as sementes foi medida com um condutivímetro de massa, e obtida dividindo-se, para cada repetição dos tratamentos, o valor da condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$) lida no condutivímetro, subtraída do valor da condutividade da água destilada, pela massa (g) das 10 sementes, sendo seu valor expresso em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$, o resultado final foi obtido pela média dos valores determinados em cada repetição.

O teste de emergência foi realizado em casa de vegetação com quatro repetições de 50 sementes, semeadas a 1,0 cm de profundidade em bandejas contendo areia umedecida, com reposição de água quando necessário.

O Índice de velocidade de emergência (IVE) foi realizado em conjunto com o teste de germinação. Foram feitas contagens diárias do número de plântulas emersas (parte aérea com 1 cm ou mais), até a estabilização e o IVE foi calculado conforme Maguire (1962).

Análises das enzimas do estresse oxidativo em frutos e sementes foram realizadas. Para isso foram preparados extratos enzimáticos brutos para as determinações da atividade da catalase (CAT), da peroxidase (POX), da peroxidase do ascorbato (APX), da superóxido dismutase (SOD). Para isso utilizaram-se 0,3 g de sementes ou de frutos que foram macerados, adicionando-se 2 mL de meio de homogeneização, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (PEIXOTO et al., 1999), seguido de centrifugação a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C.

Para a determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) foram utilizados 30 µL do extrato enzimático bruto a 2,97mL de 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 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (DEL LONGO et al., 1993). A reação foi conduzida a 25°C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi determinada pela medição da absorvância a 560 nm. O branco foi obtido nas mesmas condições, porém, sem a presença de luz (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971).

Para a determinação da atividade da catalase (CAT), 100 µL do extrato enzimático bruto foram adicionados a 2,9 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (HAVIR e MCHALE, 1987). Durante o primeiro minuto de reação, mantida a 25°C, foi medido o decréscimo na absorvância a 240 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (ANDERSON et al., 1995) e expressa em µmol.min⁻¹mg⁻¹de proteína.

A atividade da peroxidase (POX) foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 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). O incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C, determinou a produção de purpurogalina. 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⁻¹de proteína.

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 2,9mL de meio de reação constituído de ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1,0 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0. Foi observado o decréscimo na absorvância a 290 nm, a 25°C, durante o primeiro minuto de reação (NAKANO e ASADA, 1981; KOSHIBA, 1993). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹cm⁻¹ (NAKANO e ASADA, 1981) e expressa em μmol min⁻¹mg⁻¹de proteína.

Para análise das proteínas resistentes ao calor utilizou-se do método de perfil de eletroforese, onde 0,3 g de embriões extraídos das sementes colhidas aos 135, 150, 165, 175, 180 DAA, foram macerados e adicionados a 2 mL de meio de homogeneização, tampão fosfato de potássio 0,1M, pH6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (PEIXOTO et al., 1999), seguido de centrifugação a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C. Posteriormente, este foi incubado em 85° C e centrifugado novamente. O sobrenadante foi coletado e utilizado para realização da eletroforese. Foram aplicados 16μL da amostra (extrato + tampão da amostra) por canaleta no gel de poliacrilamida SDS-PAGEa 12,5% (gel separador). A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por 4 horas e os géis foram corados durante 12 horas em Coomassie Blue Brilliant a 0,05%, conforme Alfenas et al. (1991) e descorados em solução de ácido acético 10%.

Utilizou-se estatística descritiva para as características relacionadas ao desenvolvimento dos frutos e sementes. Os dados obtidos nos testes de avaliação da qualidade das sementes de cada período de colheita foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5%.

2.3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comprimento e diâmetro dos frutos aumentaram de forma expressiva dos 15 dias após antese (DAA) até aos 120 DAA, quando foram atingidos os valores máximos. Houve aumento gradativo no diâmetro e no comprimento das sementes, a partir do início da avaliação aos 45 DAA até 150 DAA, sendo mais expressivo o aumento em comprimento (Figura 1). Em muitas espécies, o tamanho da semente atinge o seu máximo no início da maturação, mantendo-se relativamente inalterada, até o final do processo (BARBEDO et al., 2013), entretanto neste caso, o tamanho máximo foi obtido em fases mais adiantadas (150 DAA).

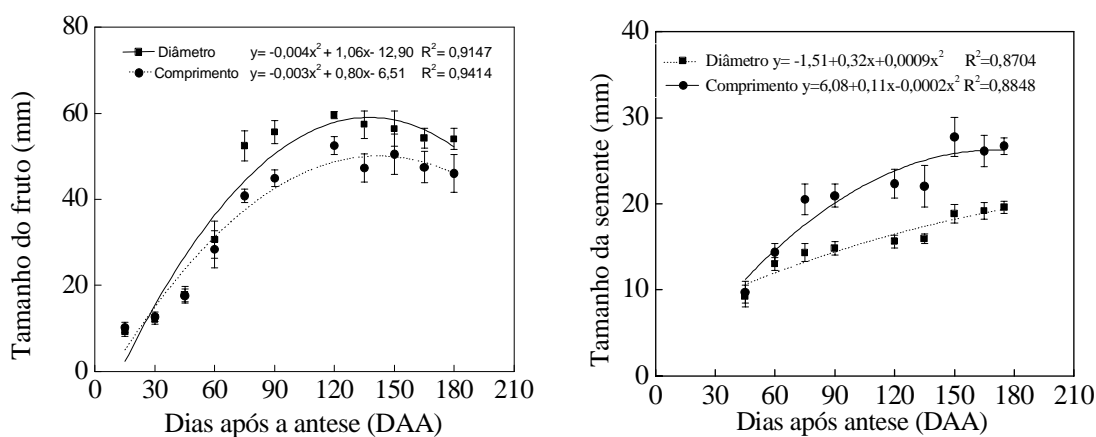


Figura 1. Curva de crescimento para os frutos e sementes de seringueira, durante o desenvolvimento, DAA. As barras exibem o desvio padrão da média.

Mata et al. (2013), com sementes de *Inga striata* encontraram maiores valores para tamanho de sementes próximo aos 140 até 155 DAA e maiores incrementos na matéria seca das sementes após este período. Os valores máximos de crescimento podem estar associados ao alongamento das células que constituem a estrutura da semente, para comportar o aumento na deposição de reservas e o crescimento do embrião (Figuras 2 e 3).



Figura 2. Frutos de *Hevea brasiliensis* durante o desenvolvimento. Da esquerda para a direita, frutos aos 15, 30, 60, 75, 90 e 120 DAA (Dias Após Antese).

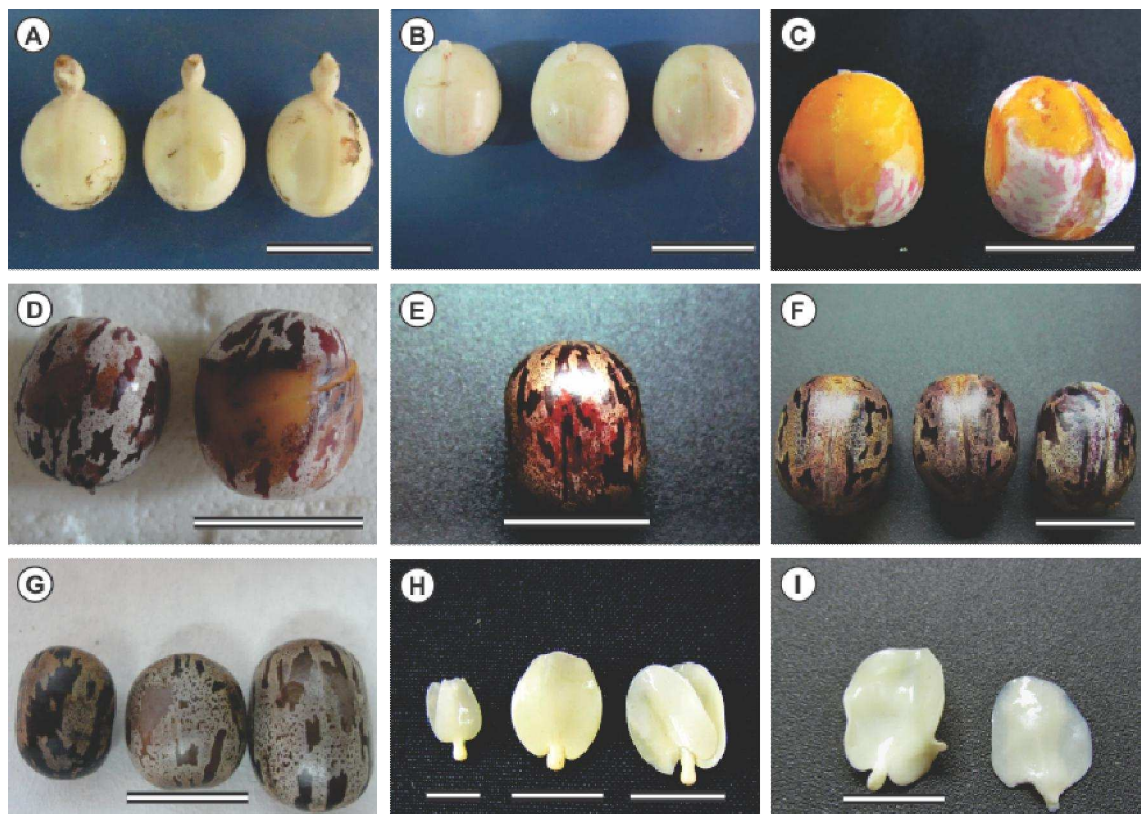


Figura 3. Semente de *Hevea brasiliensis* durante o desenvolvimento. A – G, sementes; H e I, detalhe do embrião. A, 60 DAA. B, 90 DAA. C, 120 DAA. D, 150 DAA. E, 165 DAA. F, 175 DAA. G, 180 DAA. H, 150 DAA, 165 DAA e 175 DAA. I, 180 DAA. DAA – Dias Após Antese. Barra: A, 1,5 cm; B – F, 2,5 cm; G, 2,7 cm; H, 0,8 cm, 1,3 cm, 1,3 cm; I, 1,3 cm.

O conteúdo de matéria seca (MS) dos frutos e das sementes manteve-se estável até cerca de 90 DAA, a partir desta data, houve um aumento atingindo maiores valores a partir dos 150 DAA, com máximo aos 175 DAA. O grau de umidade inicialmente alto tanto nas sementes (73%), como dos frutos (80%), mantiveram-se elevado até aproximadamente 90 DAA. Com redução significativa a partir deste ponto, atingindo os menores valores aos 175 DAA, ou seja, 46% (sementes) e 25% (frutos). Foi possível verificar também que o período de redução no teor de água das sementes coincidiu com o período de maior acúmulo de massa seca aos 175 DAA (Figura 4).

A redução na umidade das sementes e dos frutos ao final da maturação está relacionada ao final do desenvolvimento. Comportamento semelhante foi observado também em sementes de seringueira ao longo do desenvolvimento por Moreira (2009). Este autor encontrou altos valores de umidade nas sementes até aos 95 dias após a polinização (DAP), aproximadamente 85% e após este período, e declínio até atingir 45 % aos 195 DAP. Vale ressaltar que estes estudos foram realizados em locais distintos, com variações climáticas diferentes, e que em sementes recalcitrantes há queda no teor de umidade, porém não tão acentuada quanto nas sementes ortodoxas. Segundo Barbedo et al. (2013), sementes recalcitrantes são sementes ortodoxas que não completaram o seu amadurecimento, podendo ser dispersas antes do fim deste processo. O que poderia explicar o alto teor de umidade com o qual as sementes de seringueira são dispersas, e a ausência da aquisição de tolerância a dessecação, adquirida ao final do processo de maturação que dificulta o armazenamento das sementes de seringueira por longos períodos.

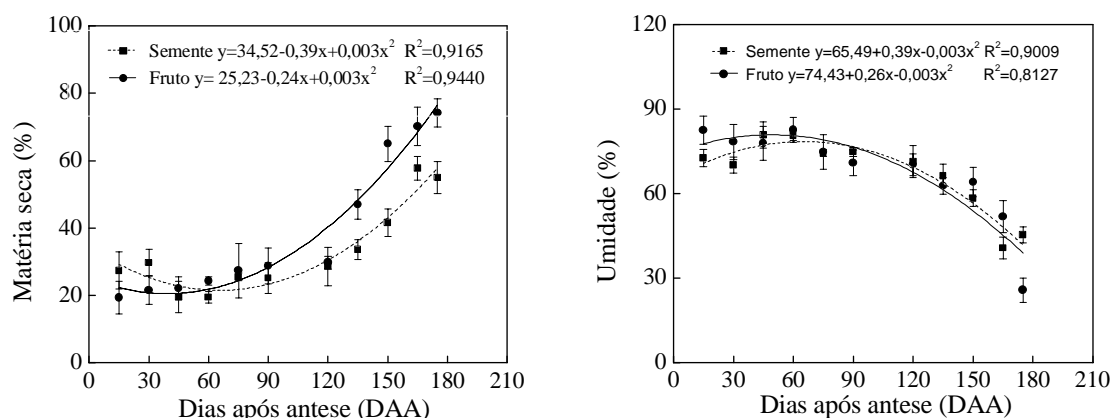


Figura 4. Matéria seca e grau de umidade de frutos e sementes colhidos em diferentes épocas (DAA). A barra representa o desvio padrão.

As condições climáticas do ambiente onde as sementes são formadas interferem diretamente no seu comportamento durante o desenvolvimento, contribuindo para acelerar ou atrasar esse processo. No presente estudo, é possível que as condições ambientais tenham favorecido a redução na umidade do fruto e da semente. Uma vez que nesta fase, fevereiro de 2013, ocorreu menor precipitação e umidade relativa do ar, e maior temperatura e radiação. As maiores precipitações locais ocorreram nos meses de dezembro e janeiro de 2013 e em fevereiro de 2013, período em que ocorreu a dispersão das sementes, houve baixa precipitação, coincidindo com a maior incidência de radiação. A umidade relativa do ar neste período também foi baixa e a temperatura foi considerada normal para este período (Figura 5).

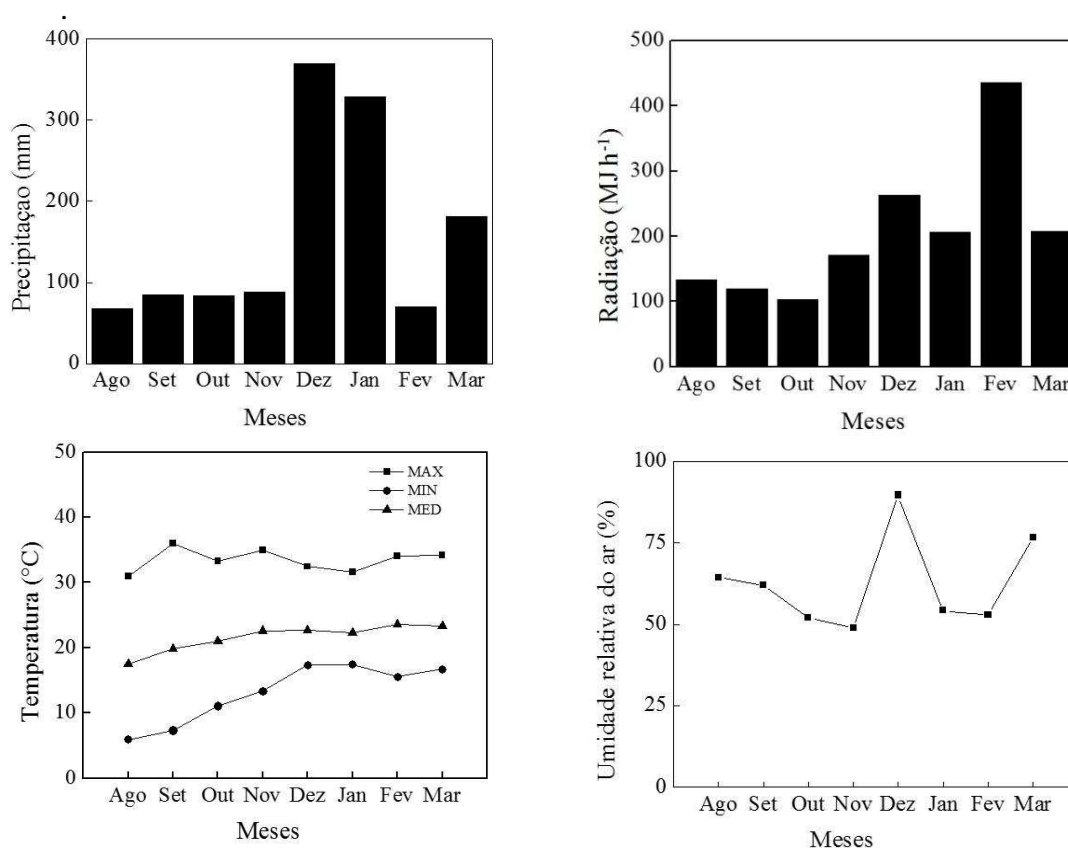


Figura 5. Registro das condições climáticas no local do experimento, de agosto de 2012 a março de 2013.

O teor de água (BARBEDO et al., 2013) e a porcentagem de matéria seca (CACCERE et al., 2013) são considerados bons índices para estimar o ponto de maturidade fisiológica da semente (PMFS). Mesmo o teor de água das sementes variando amplamente entre as espécies, idade ou local de origem, pode ser usado para as comparações entre ciclos diferentes de maturação das sementes (LAMARCA et al., 2013). A maturidade fisiológica pode ser caracterizada pelo máximo conteúdo de massa

seca, quando cessa a translocação de assimilados da planta para a semente. Porém, a utilização de apenas um ou dois parâmetros não oferece confiabilidade suficiente para definir o estágio de maturidade de uma semente, sendo necessária para dar maior confiabilidade a utilização de outros fatores, como a germinação e o índice de velocidade de emergência (IVE), entre outros.

As sementes adquiriram a capacidade de germinação a partir dos 150 DAA (Figura 6). E a partir dos 150 DAA houve aumento na germinação e IVE obtendo-se valores máximos aos 175 DAA, valores semelhantes àqueles obtidos para sementes já dispersas (180 DAA).

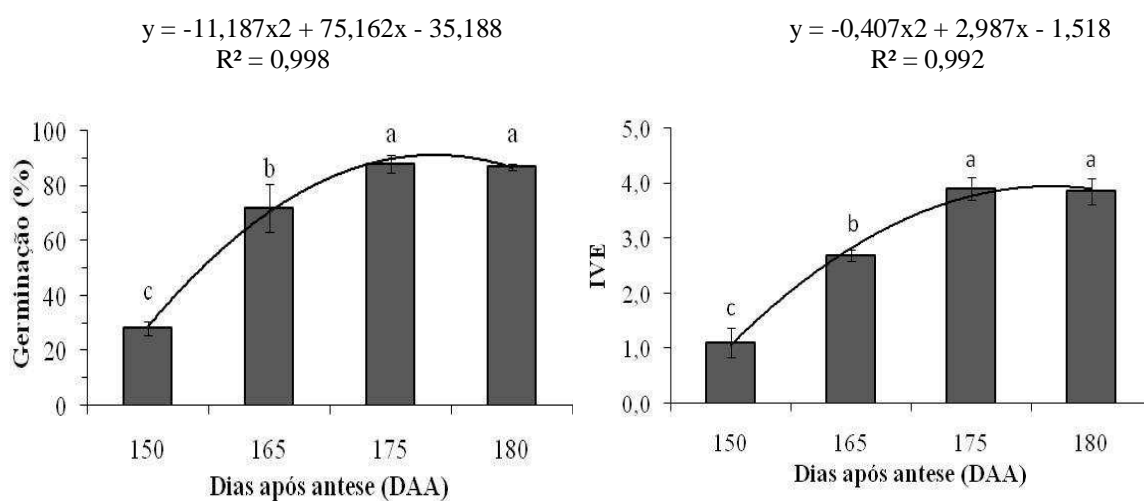


Figura 6. Germinação e índice de velocidade de emergência (IVE,) das sementes de seringueira colhidas a partir de 150 DAA. As médias acompanhadas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A aquisição da capacidade de germinação de algumas espécies pode ocorrer no início do desenvolvimento da semente (BORGES et al., 2005; LAMARCA et al., 2013), o que não ocorreu neste estudo. A germinação aos 175 DAA, antes da dispersão, e aos 180 DAA, após a dispersão, foi significativamente superior aos demais períodos avaliados ($P < 0,05$). Vale ressaltar que antes dos 150 DAA não foi observada germinação nas sementes coletadas e aos 150 DAA, apenas 28% delas germinaram. Os maiores valores de emergência e os maiores valores de IVE coincidiram com os menores teores de umidade e maior porcentagem de matéria seca. Isto sugere que o PMFS de seringueira coincide com a maior qualidade fisiológica das sementes. Portanto, tais parâmetros podem auxiliar na identificação do PMFS dessa espécie. Estes dados se assemelham aos encontrados em outro estudo com sementes de seringueira, onde o PMFS foi atingido aos 195 DAP (MOREIRA, 2009), e neste estudo aos 175

DAA. A diferença na estimativa do PMFS entre estes estudos pode ser atribuída a variações ocorridas no ambiente de desenvolvimento das sementes, bem como variações nas características genéticas da própria semente. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos com sementes de *Erythrina variegata* L., por Matheus et al. (2011) e em sementes de *Inga striata*, por Mata et al. (2013). A eficiência do conteúdo de matéria seca e do teor de água, como marcadores para estimar o PMFS estão intimamente relacionados às alterações bioquímicas e fisiológicas como acúmulo de compostos de reserva e redução da umidade.

A redução do teor de água na semente favorece a posterior expressão de genes que controlam o conteúdo de Giberelinas (GA) e ácido abscísico (ABA). Estes fitormônios estão relacionados à expressão de enzimas como as expansinas que proporcionam o afrouxamento da parede celular e as hidrolases, que participam da degradação de compostos de reserva do endosperma. A ação dessas enzimas promove o reajuste osmótico, favorecendo a germinação. Além disso, a maior síntese dessas enzimas favorecendo o afrouxamento do endosperma e do tegumento diminuindo a força contrária exercida por estas estruturas ao embrião, facilitando a protrusão da radícula (NONOGAKI et al., 2010).

Durante a maturação das sementes observou-se redução contínua da condutividade elétrica (CE) das sementes, de aproximadamente 6,6 para 2,3 $\mu\text{S}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{g}^{-1}$, no último período avaliado (180 DAA), em sementes já dispersas (Figura 7).

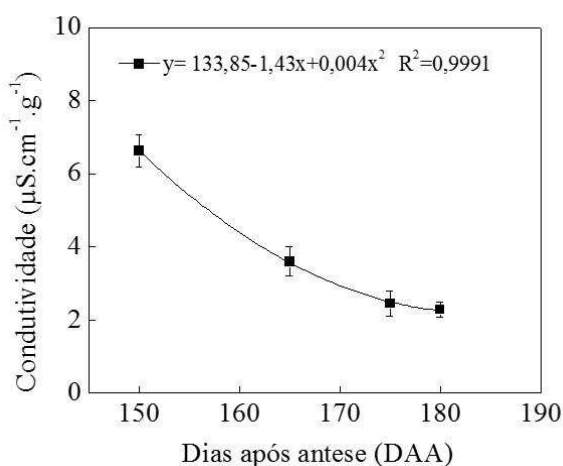


Figura 7. Condutividade elétrica das sementes de seringueira durante o desenvolvimento.

O teste de CE fornece informações indiretas a cerca da integridade das membranas celulares. Altos valores de condutividade nos estádios iniciais do desenvolvimento se relacionam com a baixa integridade das membranas celulares e um decréscimo nesses valores indica maior organização das membranas celulares e da deposição de material de reserva (PAVITHRA et al., 2014). Neste estudo observou-se, redução na CE da solução de embebição das sementes a partir dos 150 DAA, onde as sementes já apresentavam germinação, estabilizando-se ao final da maturação (175 DAA). Resultados semelhantes foram obtidos por Pavithra et al. (2014), ao avaliar o desenvolvimento de sementes de *Pongamia pinnata* (L) Pierre, onde os menores valores de CE coincidiram com o PMFS.

A redução na CE, neste caso, pode ser atribuída a maior estruturação do tegumento das sementes, como deposição de lignina e ceras, bem como ao final da formação das estruturas como embrião. A maior estruturação do tegumento em muitos casos pode ser associada à cor, em geral quanto maior o número de camadas depositadas mais escuro é o tegumento. As sementes de seringueira aos 175 e aos 180 DAA apresentaram tegumento mais escuro e rígido (Figura 3), provavelmente proporcionando uma maior barreira a entrada de água afetando a CE. Além disso, nessa fase, o embrião já estava completamente formado, sendo assim provavelmente a deposição de lipídios nos tecidos tanto do embrião quanto do endosperma também podem ter afetado a redução da CE, por não apresentarem afinidade à água. Essas variáveis podem ter dificultado a entrada rápida de água nas sementes.

Além da redução na CE, o acúmulo de proteínas resistentes ao calor (HSP), ocorreu no final da maturação nas sementes de seringueira, onde foi possível observar aumento na intensidade das bandas aos 175 DAA em comparação aos períodos anteriores, e padrão semelhante aos 180 DAA, (sementes já dispersas), principalmente das proteínas com peso molecular entre 21 e 45 KDa (Figura 8). Essas proteínas foram inicialmente identificadas com base na expressão induzida durante estresse térmico. Porém pesquisas recentes evidenciam sua existência em células não expostas a esse estresse (WALTERS, 2013). Além disso, as proteínas de baixo peso molecular são altamente reguladas em resposta a outros fatores de estresses, como a redução no grau de umidade, que neste caso ocorreu no final do desenvolvimento das sementes favorecida pelas condições climáticas locais (Figuras 4 e 5).

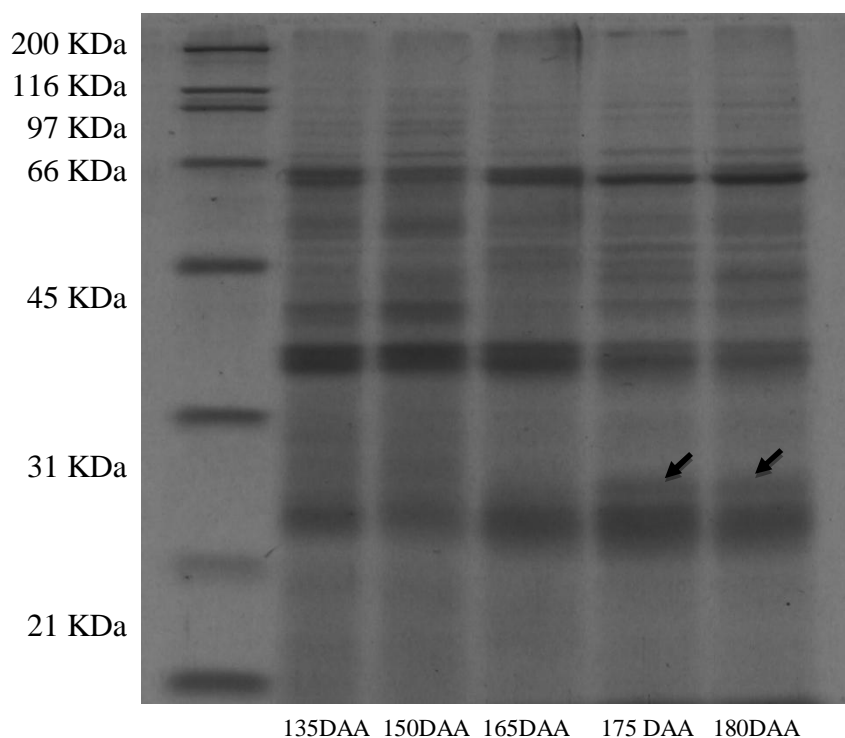


Figura 8. Perfil eletroforético de proteínas de choque térmico de baixo peso molecular (smHSPs), em embriões de sementes de seringueira colhidas aos 135,150, 165, 175, 180 dias após a antese.

Apesar dessa classe de proteínas estarem relacionadas ao desenvolvimento da tolerância à dessecação em espécies ortodoxas, elas também são encontradas em sementes recalcitrantes, onde apresentam pesos moleculares de 46, 35, e 23 kDa (VORNAM et al., 2011; KALEMBA e PUKACKA, 2012). Segundo os mesmos autores, a regulação da expressão dessas proteínas é feita por fatores ambientais, tais como acúmulo de horas de calor durante o desenvolvimento, perda de água e pluviosidade. A maior radiação e menor pluviosidade observada em fevereiro de 2013 coincidiram com o final da maturação das sementes amostradas e pode ter influenciado a expressão dessas proteínas. As proteínas de baixo peso molecular podem funcionar como antioxidantes e estabilizadores de membranas e de outras proteínas durante períodos de estresse hídrico ou como chaperonas moleculares (TUNNACLIFFE e WISE, 2007), colaborando para manutenção da viabilidade das sementes recalcitrantes, mesmo por curto período de tempo.

Nas análises das enzimas do estresse oxidativo como SOD, CAT, POX e APX, maior atividade foi observada no início e no final do desenvolvimento das sementes. Por outro lado, para o fruto, a atividade dessas enzimas foi menor ao final da maturação (Figura 9).

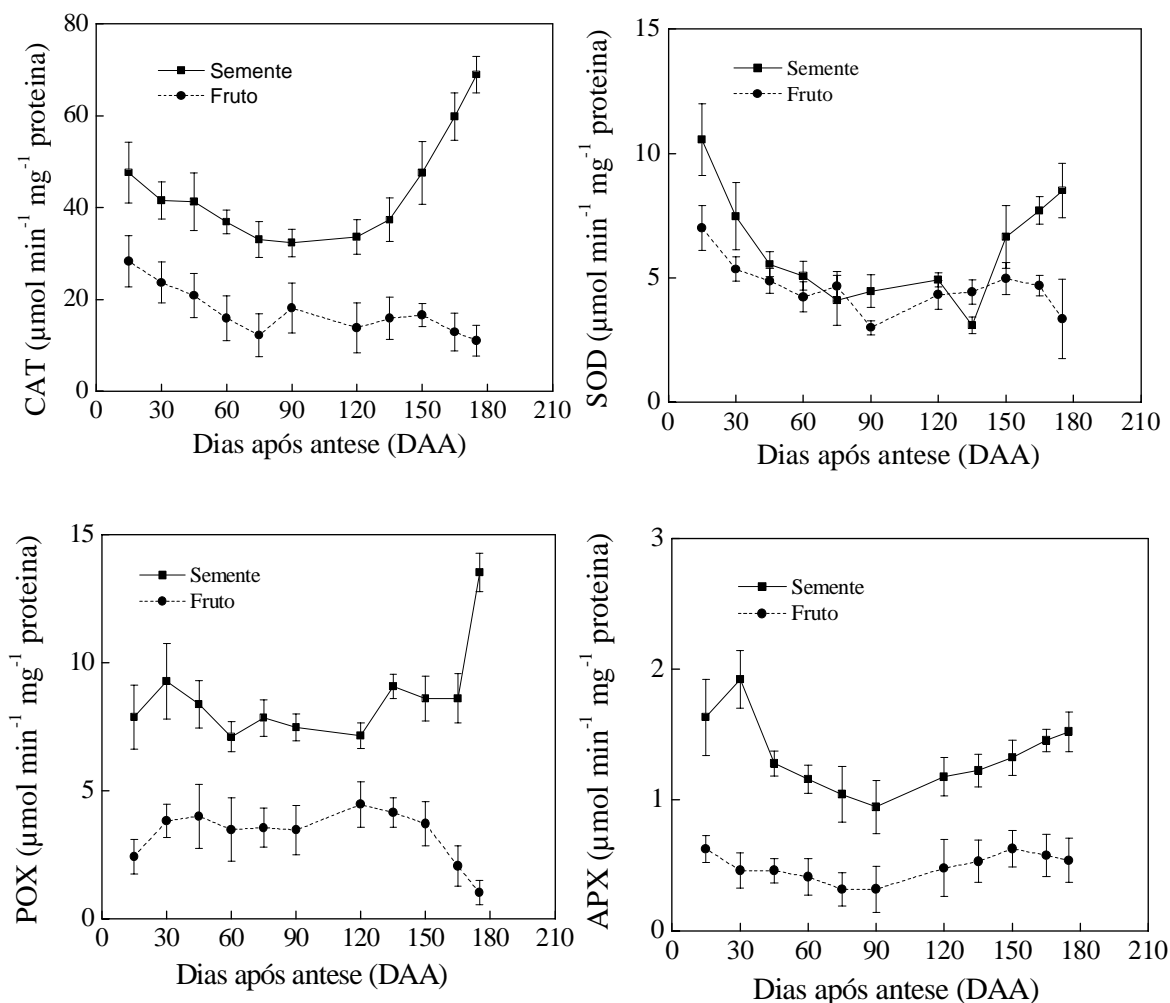


Figura 9. Atividade das enzimas do estresse oxidativo nas sementes e fruto de seringueira durante o desenvolvimento. As barras representam o desvio padrão.

A alta atividade no início, pode estar relacionada com o alto teor de água (GOMES et al., 2013), e com as diversas reações metabólicas associadas a histodiferenciação e respiração. No final da maturação houve novamente maior atividade dessas enzimas nas sementes que, neste caso, pode estar relacionada a eventos preparatórios para a germinação. O desenvolvimento de sementes de muitas espécies recalcitrantes prossegue diretamente da maturação para a germinação, escapando da fase de desidratação. Schopfer et al. (2001) sugerem um papel facilitador da germinação exercido pelos EROS, favorecendo o enfraquecimento do endosperma e tegumento, e/ou também, como proteção para a radícula contra microrganismos patogênicos do solo. Pode ser observado também que enquanto a atividade enzimática das sementes aumentava no final do desenvolvimento a do fruto reduzia, sugerindo uma redução no metabolismo do fruto e aumento no metabolismo das sementes.

Uma vez que sementes recalcitrantes estão aptas a germinar logo após sua formação, os mecanismos preparatórios para a germinação, possivelmente iniciam antes mesmo da dispersão. Um desses mecanismos pode ser a produção de EROS que influenciam na atividade das enzimas do estresse oxidativo. Tais enzimas apresentaram aumento na atividade a partir dos 135 DAA, indicando maior produção de EROS a partir desta data. Em estudos com avaliação de enzimas do estresse oxidativo em frutos e sementes de ervilha, Matamoros et al. (2010), observaram aumento na atividade da SOD e estabilidade na atividade da APX, no final da maturação. Estes autores associaram o comportamento da APX com a estabilização da produção de EROS por esta espécie e declínio no conteúdo de água. No presente estudo foi observada maior atividade de todas as enzimas avaliadas (SOD, APX, POX, CAT), no final do desenvolvimento das sementes de seringueira. Esse aumento na atividade enzimática, muito provavelmente se deu devido ao alto teor de umidade, portanto, ao metabolismo acelerado com o qual as sementes de seringueira são dispersas, além do estresse ambiental como a alta incidência de radiação ao final do desenvolvimento.

Associando todos os fatores avaliados conclui-se que o PMFS das sementes de seringueira avaliadas neste estudo foi atingido aos 175 DAA. Como não houve diferença significativa na germinação e no IVE das sementes entre os períodos de 175 e 180 DAA, a coleta das sementes antes da deiscência dos frutos poderia ser uma alternativa para evitar a perda de viabilidade das sementes. Uma vez que as sementes que entraram em contato com o solo apresentaram maior contaminação por micorganismos patogênicos (dados não mostrados) ou por estarem expostas as condições ambientais que afetam o aumento da atividade de enzimas antioxidantes indicando aumento na produção de EROS, que com o tempo podem conduzir a semente à deterioração.

2.4. – CONCLUSÕES

A maturidade fisiológica das sementes de seringueira ocorre aos 175 DAA, e coincide com sua máxima qualidade fisiológica.

Maiores porcentagem e velocidade de germinação são obtidas em sementes colhidas aos 175 e 180 DAA.

Aos 175 e 180 DAA, há maior expressão de proteínas resistentes ao calor de baixo peso molecular (smHSP) e maior atividade das enzimas do estresse oxidativo.

2.5. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 370p.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, p.1247-1257, 1995.
- BARBEDO, C.J.; CENTENO, D.C.C.; RIBEIRO, R.C.L.F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehe**, v. 40, p. 583-593, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 399 p, 2009.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.
- BONOME, L.T.S.; MOREIRA, S.A.F.; OLIVEIRA, L.E.M.; SOTERO, A.J. Metabolism of carbohydrates during the development of seeds of the brazilian rubber tree [Hevea brasiliensis (Willd. Ex Adr. de Juss) Muell.-Arg.]. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.211–219, 2011.
- BORGES, I.F.; BARBEDO, C.J.; RICHTER, A.A.; FIGUEIREDO- RIBEIRO, R.C.L. Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (Caesalpinia chinata Lam., Leguminosae). **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 475-482, 2006.
- CACCERE, R.; TEIXEIRA, S.P.; CENTENO, D.C.; FIGUEIREDO- RIBEIRO, R.C.L.; BRAGA, M.R. Metabolic and structural changes during early maturation of Inga vera seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 791-800, 2013.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1995.
- DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.1023-1028, 1993.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.
- GOMES, M.P.; GARCIA, Q.S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia, Section Botany**, 68/3, p. 351—357, 2013.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p.450-455, 1987.

- KALEMBA, E. M.; JANOWIAK, F.; PUKACKA, S. Association of Protective Proteins with Dehydration and Desiccation of Orthodox and Recalcitrant Category Seeds of Three Acer Genus Species. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, p.351–362, 2012.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p.315-319, 1976.
- LAMARCA, E.V.; PRATAVIERA, J.S.; BORGES, I.F.; DELGADO, L.F.; TEIXEIRA, C.C.; CAMARGO, M.B.P.; FARIA, J.M.R.; BARBEDO, C.J. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p.223-233, 2013.
- MAGUIRE, J.D. Seeds germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176, 1962.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 496p.
- MATA, M.F.; SILVA, K.B.; BRUNO, R.L.A.; FELIX, L.P.; MEDEIROS FILHO, S.; ALVES, E.U. Maturação fisiológica de sementes de ingazeiro (*Inga striata* Benth). **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, p. 549-566, 2013.
- MATHEUS, M.T.; LOPES, J.C.; CORRÊA, N.B. Maturação fisiológica de sementes de *Erythrina variegata* L. **Ciência Florestal**, v. 21, p.619-627, 2011.
- MOREIRA, S.A.F. Caracterização morfo-anatômica, fisiológica e bioquímica do desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira (*Hevea* spp.)124p. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, 2006.
- KALEMBA, E.M.; JANOWIAK, F.; PUKACKA, S. Association of Protective Proteins with Dehydration and Desiccation of Orthodox and Recalcitrant Category Seeds of Three Acer Genus Species. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, p.351–362, 2012.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.
- NONOGAKI, H. et al. Germination still a mystery. **Plant Science**, v.179, n.1, p.574-581, 2010.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.713-721, 1993.
- MATAMOROS, M.A.; LOSCOS, J.; DIETZ, K.J.; APARICIO-TEJO, P.M.; BECANA M. Function of antioxidant enzymes and metabolites during maturation of pea fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 87–97, 2010.
- PAVITHRA, H.R.; GOWDA, B.; SHIVANNA, M.B.; Biochemical changes in the composition of developing seeds of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 199– 208, 2014.

- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.137-143, 1999.
- SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1591–1602, 2001.
- TUNNACLIFFE, A.; WISE, M.J. The continuing conundrum of the LEA proteins. **Natur wissenschaften**, v.94, p.791–812, 2007.
- VORNAM, B.; GAILING, O.; DERORY, J.; PLOMION, C.; KREMER, A.; FINKELDEY, R. Characterization and natural variation of a dehydrin gene in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. **Plant Biology**, 2011.
- WALTERS, C.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.; KENNEDY, K.; RAVEN, P. Preservation of recalcitrant seeds. **Science**, v. 339, p. 915-916, 2013.

CAPÍTULO 3

EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS DE RESERVA E ALTERAÇÕES ANATÔMICAS EM SEMENTES DE SERINGUEIRA

RESUMO

SOUZA, Genaina Aparecida de. Universidade Federal de Viçosa, July 2014. **Evolução dos compostos de reserva e alterações anatômicas em sementes de seringueira.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

O objetivo foi acompanhar e descrever as alterações bioquímicas e anatômicas dos compostos de reservas de sementes de seringueira durante o desenvolvimento. O experimento foi desenvolvido na Fazenda experimental da Epamig em Oratórios-MG e nos Laboratórios de Pós Colheita e Anatomia da Universidade Federal de Viçosa. Foram selecionadas 30 plantas nos diferentes pontos do plantio comercial de seringueira. As flores foram marcadas durante a antese e a cada 15 dias após a marcação foram realizadas análises bioquímicas do conteúdo de amido, açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e proteínas nas sementes. Ao final da maturação (150, 165 e 175 dias após antese) foram realizados testes histoquímicos para proteínas, amido, lipídios bem como para alterações estruturais. Foi possível observar acúmulo de AST e sacarose e redução nos AR durante a maturação das sementes, as alterações nesses açúcares coincidem com a mudança da fase de histodiferenciação para a fase de maturação das sementes. No fruto foi observada redução tanto nos AR como nos AST e sacarose. O teor de amido nas sementes aumentou, nitidamente, a partir dos 135 DAA (dias após antese), mantendo-se assim até o final da maturação. Já no fruto, não foi observado incrementos. Comportamento semelhante foi observado para proteínas totais, nas sementes houve aumento substancial a partir dos 120 DAA, permanecendo até o final da maturação da semente. Foi possível observar aumento no tamanho das células e aumento na concentração dos compostos de reserva, principalmente nos dois últimos períodos avaliados tanto para as análises bioquímicas quanto para as análises histoquímicas e de microscopia eletrônica de varredura. Portanto, conclui-se o maior acúmulo de compostos reserva nas sementes de seringueira ocorre próximo a dispersão, tanto no endosperma quanto nos cotilédones e eixo embrionário. Alterações anatômicas que contribuem para manutenção de altas taxas metabólicas ao final do desenvolvimento das sementes também foram observadas, possivelmente favorecendo o consumo dos compostos de reserva, fazendo com que o embrião não apresente dormência. A mudança de fase de histodiferenciação para a de acúmulo de compostos de reserva parece ocorrer próximo aos 100 DAA.

Palavras chave: Compostos de reserva, alterações anatômicas e histoquímica

ABSTRACT

SOUZA, Genaina Aparecida de. Universidade Federal de Viçosa, July 2014. **Evolution of the reserve compounds and anatomical alterations in rubber tree seeds.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

The objective of this study was to monitor and describe the biochemical and anatomical alterations in rubber tree seeds with emphasis in the reserve compounds during the development. The experiment was conducted at Epamig experimental farm in Oratórios-MG and in the Anatomic Analyzes Laboratory and Post-harvest Laboratory at Universidade Federal de Viçosa. Were selected 30 plants in different points of rubber tree commercial planting. The flowers were tagged during the anthesis and each 15 days. After the tagging were realized biochemical of the starch content analyzes, proteins in the seeds, total soluble sugars (TSS), and reducing sugars (RS). In the end of the maturation (150, 165 and 175 days after anthesis), were realized histochemical tests for proteins, starch and lipids. Was possible to observe the accumulation of TSS and sacarosis and the reduction in the RS during the maturation of seeds. The alterations in these sugars coincides with the change of the phase histodifferentation for the phase of seeds maturation. In the fruit was observed the reduction even in RS like in TSS and sacarosis. The content of starch in seeds increased clearly from 135 DAA (days after anthesis), keeping like this until the end of the maturation. But in the fruits was not observed increments. Similar behavior was observed for total proteins, in the seeds there were huge increase from the 120 days DAA, remaining until the end of seeds maturation. Was possible to observe increase in the cells size and increase in the concentrations of reserve compound, mainly in the two last evaluated periods, even for the biochemical like as histochemical and scanning electronic microscopy analyzes. Therefore it is concluded that the higher accumulation of reserve compounds in rubber tree seeds occurs next to the dispersion, even in the endosperm as the cotyledons and embryonic axis. Anatomical alterations that contributes to the maintenance of the high metabolic taxes at the end of the development was also observed, possibly favoring the consumption of reserve compounds, contributing for the no-dormancy of the embryo. The change of the histodifferentation phase to the accumulation of reserve compounds looks like to occurs next to the 100 DAA.

Key words: Reserve compounds, anatomical alterations, histochemical alterations.

3.1. – INTRODUÇÃO

O processo de desenvolvimento das sementes envolve várias etapas, como divisão celular, histodiferenciação, acúmulo de material de reserva e maturação. Um desenvolvimento que englobe todas as etapas de forma adequada é essencial para a qualidade e sobrevivência das sementes (PAVITHRA et al., 2014). Neste processo estão inseridas as modificações anatômicas e bioquímicas que ocorrem em função da maturação das sementes.

Os aspectos anatômicos de sementes têm sido investigados em várias espécies de diferentes famílias, a exemplo de *Styraxcamporum* (Styracaceae), *Tecomastans* (L.) Kunth (Bignoniaceae), *Podocarpussellowii* Klotz (Podocarpaceae) e *Oneocarpusminor* Mart. (Arecaceae), (MENDONÇA et al., 2008; JULIO; OLIVEIRA, 2007; RENÓ et al., 2007; GARCIA et al., 2006;). As características anatômicas não só estruturais, mas histoquímicas e ultra estruturais podem fornecer importantes informações à respeito do comportamento de determinada espécie durante seu desenvolvimento.

Algumas dessas características têm sido associadas à maturação das sementes, e algumas delas são largamente relacionadas às sementes recalcitrantes (BARBEDO et al., 2013; BRYANT et al., 2001). Nessas alterações anatômicas, incluem-se mudanças estruturais que colaboram com a desidratação, como redução do tamanho dos vacúolos, além de alterações na parede celular (VICRÉ et al., 2004), redução no número de organelas das células e até mesmo ausência de vacúolos, como observado em embriões zigóticos, de *Acrocomia aculeata* (Jacq.)(MOURA et al., 2010). Essas alterações são frequentemente observadas em sementes ortodoxas, porém em sementes recalcitrantes são menos frequentes. Em sementes de *Inga vera*, espécie recalcitrante, uma menor proporção de polissacarídeos contendo arabinose, que reforçam a parede celular e aumento no número e tamanho dos vacúolos foram observados por Caccere et al. (2013), indicando alta atividade metabólica no embrião dessas sementes.

Alterações no conteúdo de reserva das sementes também são importantes, como a concentração e os tipos de açúcares e aumento na deposição de proteína, amido e lipídios. Essas modificações podem e devem ser utilizadas para acompanhar o ponto de maturidade ou desenvolvimento de uma semente. Maior acúmulo de compostos de reserva e modificações referentes a aquisição da tolerância a dessecação, como acúmulo de LEA proteínas e oligossacarídeos são associadas à sementes ortodoxas. Em sementes recalcitrantes, como as de *Ingá* ao final da maturação também foi observado um aumento no número e no tamanho dos grânulos de amido (CACCERE et al., 2013).

Assim como o acúmulo de amido e açúcares solúveis totais observados em sementes de seringueira (BONOME et al., 2011).

Os açúcares desempenham papel essencial no metabolismo das plantas. Eles podem funcionar como fonte de energia para a respiração, fornecendo carbono para a produção de metabolitos essenciais, incluindo aminoácidos, lipídios, proteínas, hidratos de carbono mais complexos, tais como celulose e amido (BONOME et al., 2011). Já as proteínas são as principais fontes de aminoácidos das células (CACCERE et al., 2013). As reservas das sementes pode também desempenhar papel importante na sua sobrevivência durante períodos impróprios a germinação, fornecendo energia até que a plântula se torne autotrófica (SORIANO et al., 2011). Além disso, mudas jovens dependem da disponibilidade de reservas, tais como carboidratos, lipídios, proteínas e outros nutrientes minerais até se estabelecerem (KITAJIMA e MYERS, 2008).

O objetivo deste trabalho foi verificar e descrever as alterações dos compostos de reserva e as modificações anatômicas que ocorrem durante o desenvolvimento e a maturação das sementes de seringueira.

3.2. – MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido na fazenda experimental da EPAMIG, município de Oratórios, MG, em um plantio comercial de seringueira *Hevea brasiliensis*, com o clone RRIM 600, coordenadas 20°24'39.46''S e 42°49'13.91'' O e altitude média de 530m. O experimento foi desenvolvido entre agosto de 2012 e fevereiro de 2013.

As inflorescências foram marcadas e identificadas com marcadores tipo fita impermeáveis durante a abertura das flores, para o acompanhamento do número de dias após a antese (DAA). Foram selecionadas flores em diferentes posições em um total de 30 plantas selecionadas ao acaso. Durante o período entre a abertura das flores e a dispersão dos frutos foram feitas coletas a cada 15 dias, com exceção aos 105 dias, onde as condições climáticas impossibilitaram a coleta, realizando-se os seguintes testes e determinações: teor de amido, açúcares redutores e solúveis totais, proteínas e anatomia (histoquímica e estrutural).

Os extratos brutos para as determinações de amido, açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR), foram obtidos através da pesagem de cerca de 1,0 g de material vegetal moídos em nitrogênio líquido e o extrato obtido a partir de 10 mL de etanol 80% aquecido (60-70 °C), após centrifugados a 2.000 xg por 10 minutos, etapa repetida três vezes. O sobrenadante foi retirado para a quantificação de AST e AR. O “pellet” foi seco para posterior quantificação de amido pelo método proposto por McCready et al. (1950).

A determinação de amido foi feita como proposto McCready et al. (1950), 2,5 mL de água deionizada e 3,25mL de ácido perclórico 52% foram adicionados ao pellet permanecendo em descanso por 30 min. A mistura foi centrifugada durante 15 min a 2000 xg, sendo o sobrenadante recolhido para quantificação de amido. Uma alíquota de 250 µL do extrato, 250 µL de fenol 5%, e 1,25 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado foram colocadas em tubo de ensaio, os quais foram levados para banho-maria a 30 °C, por 20 min. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm.

Para a determinação de AR, foi utilizado o método de Somogy-Nelson (1944), utilizando o extrato bruto reservado. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. A determinação (AST) foi realizada pelo método Fenol-sulfúrico proposto por Dubois et al. (1956). Colocou-se em um tubo de ensaio uma alíquota de 250 µL do extrato reservado com 250 µL de fenol 5% e adicionou-se à mistura 1,25 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado e então os tubos foram

colocados em banho-maria a 30 °C por 20 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm.

As concentrações de sacarose foram determinadas pela diferença entre os teores de açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR), multiplicada pelo fator 0,95 conforme Martim (2003).

Para a determinação de proteínas solúveis totais, utilizou-se 0,3 g de material vegetal, maceradas e adicionados a 2mL de meio de homogeneização, tampão fosfato de potássio 0,1M, pH6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (PEIXOTO et al., 1999), seguido de centrifugação a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C. A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método proposto por Bradford (1976), com 100 µL de extrato juntamente com 1mL de reagente de Bradford. Após 20 min, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

Para as análises anatômicas, amostras de endosperma e embrião foram fixados em FAA₅₀ (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50%, na proporção de 5:5:90, v:v:v), por 48 horas e estocadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). As amostras foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin – Leica), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram seccionadas, embrião e endosperma, transversal e longitudinalmente, em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica) com 5 µm de espessura, corado com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964). Após este procedimento as lâminas foram montadas com resina sintética (Permout®). Foram utilizados os testes histoquímicos para a identificação in situ dos compostos de reserva no material incluído em resina: reagente de Lugol (JOHANSEN, 1940) para amido e xilydine Ponceau (VIDAL, 1970) para proteína. Para a detecção de lipídios, o material fixado foi seccionado em criomicrotomo com 40µm de espessura e submetido ao teste Sudan Black B. As imagens estruturais e histoquímicas foram realizadas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan), acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss Axio CamHRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Cinco sementes foram coletadas a cada período e fixadas em Karnovisk modificado, pH 7,2 por 24h. Em seguida, foram transferidas para um líquido crio-protetor (glicerol 30%) por 30 min e cortadas transversalmente em nitrogênio líquido. As secções obtidas foram

transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 h e após desidratadas em uma série de acetona (30, 50, 70 e 100% por três vezes). Em seguida as secções foram levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, stubs, com a ajuda de uma fita de carbono colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 90 XVP.

3.3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações dos açúcares redutores (AR), no início do desenvolvimento das sementes apresentaram acréscimos até aos 75 DAA. Após, a concentração deste açúcar decresceu rapidamente até aos 120 DAA, provavelmente indicando o final do período de intensa ocorrência de histodiferenciação. A partir dos 135 DAA a concentração desse açúcar foi estável, atingindo valor mínimo em torno de $22,9 \pm 2,7$ mg.g⁻¹ MF. Em geral, altos níveis de monossacarídeos e baixos níveis de oligossacarídeos são encontrados durante os estádios iniciais de desenvolvimento. Contudo, ocorre redução no conteúdo de monossacarídeos nas fases finais (PAVITHRA et al., 2014), caracterizando alterações no metabolismo preparatório para um período de criptobiose, principalmente em sementes ortodoxas.

Em estudos relacionados a alterações bioquímicas durante o desenvolvimento e maturação, também foi observado redução nos teores de AR em sementes de *Pongamia pinnata* L Pierre (PAVITHRA et al., 2014) e em *Aesculus chinensis* (YU; CHEN, 2012). Com relação às sementes de seringueira, comportamento semelhante também foi observado até o final da maturação por Bonome et al. (2011). Entretanto, no presente estudo houve redução, porém, esta foi menos intensa a partir dos 150 DAA. A ligeira redução no teor de AR neste período poderia ser atribuída à característica recalcitrante desta espécie, uma vez que, o metabolismo se mantém alto durante o final do processo de maturação. Caccere et al. (2013) observaram em sementes de *Inga vera*, outra espécie recalcitrante, além de redução nas taxas de AR, altas taxas metabólicas durante toda a fase de maturação e ao final do desenvolvimento e ausência da fase de redução no metabolismo.

Os açúcares, além de fornecerem carbono para o crescimento celular, podem atuar como moléculas de sinalização, além de desempenharem papel de reguladores da expressão de diferentes genes (EVELAND; JACKSON, 2011; SMEEKENS et al., 2010). Durante o desenvolvimento de embriões de leguminosas as concentrações de glicose (um açúcar redutor), se relacionava com o aumento da mitose (BORISJUK et al., 2003), sugerindo uma ligação entre hexoses e o ciclo celular. A relação entre os açúcares e o controle da divisão celular está na modulação da expressão gênica da cyclin D (proteína envolvida na regulação do ciclo celular) (GAUDIN et al., 2000). Sendo assim, as maiores concentrações de AR observadas no início do desenvolvimento das sementes de seringueira podem estar relacionadas à histodiferenciação e à divisão celular.

Em relação à sacarose (SAC) e aos açúcares solúveis totais (AST) houve aumento progressivo a partir dos 75 DAA. O aumento mais expressivo nas concentrações de SAC e AST ocorreram a partir dos 120 DAA, com valores máximos de $62,6 \pm 6,0 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ de SAC e de $91,8 \pm 7,5 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ de AST aos 175 DAA. Em relação ao fruto, houve aumento nos teores de AST, AR e SAC até 90 DAA, após este período verificou-se redução gradativa para todos os açúcares avaliados (Figura 1). Resultados semelhantes foram verificados em sementes de seringueira (BONOME et al., 2011), de Ingá (CACCERE et al., 2013), e de Pongamia (PAVITHRA et al., 2014). O aumento mais expressivo na concentração de SAC e AST a partir dos 120 DAA, possivelmente foi devido a maior demanda de energia pela semente, para o acúmulo de compostos de reserva, uma vez que a SAC é largamente associada a maturação. Como a forma mais comum de transporte de açúcares nas plantas é via SAC o aumento verificado no teor deste açúcar é justificado.

Outra possibilidade seria a variação nos teores de açúcares do fruto, que reduziram ao final da maturação, possivelmente por serem drenados para as sementes, via transporte de sacarose. O transporte destes açúcares inicialmente se faz através do floema para o tegumento que é um tecido materno, porém como este tecido não está vascularmente conectado com o embrião e/ou endosperma, o transporte se faz através de uma via apoplástica (BONOME et al., 2011).

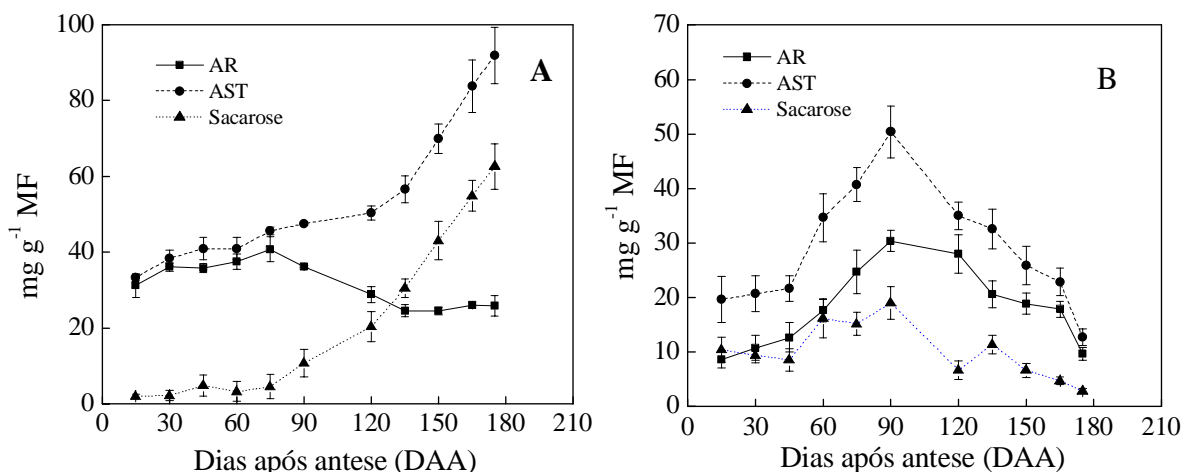


Figura 1: Teor de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e sacarose (SAC) em sementes (A) e frutos (B) de seringueira durante o desenvolvimento. As barras representam o desvio padrão de três repetições.

O teor de amido nas sementes manteve-se sem grandes alterações até 120 DAA ($14,5 \pm 1,6 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$). Entretanto, a partir desta época, foi observado aumento na

concentração até o final da maturação, aos 175 DAA, com valores de até $31,4 \pm 1,6$ mg. g^{-1} MF. Para o fruto, não foram observadas grandes alterações ao longo de todo período avaliado, mantendo-se em torno de $4,83 \pm 1,2$ mg. g^{-1} MF (Figura 2). As micrografias de luz referentes a proteínas e amido sustentam os resultados encontrados nos testes bioquímicos (Figuras 2 e 3), onde houve aumento destes compostos de reserva ao final da maturação das sementes, sendo evidente o aumento aos 175 dias.

O acúmulo de amido no final da maturação das sementes pode ser confirmado pelas imagens de microscopia de luz, onde fica evidente o aumento no número e no tamanho dos corpos de amido a partir dos 165 DAA. Esse aumento também pode ser associado a uma possível preparação para a germinação, uma vez que a semente necessita de disponibilização rápida de energia e a quebra de lipídios é mais lenta e demanda maior gasto energético, bem como aumento no tamanho das células que compõem o cotilédone e principalmente o endosperma (Figuras 4 e 5 A-C). Ou ainda uma adaptação, para acomodar o incremento de material de reserva ao final do desenvolvimento. Uma vez que o aumento em tamanho dos corpos proteicos e o grânulos de amido foi evidente (Figuras 4D -F e 5D-F), nas três estruturas avaliadas (endosperma, cotilédones e eixo embrionário). Porém, os maiores incrementos em relação aos períodos avaliados ocorreram nos cotilédones (Figura 5).

Resultados semelhantes foram observados por Pavithra et al. (2014) e Sangwan et al. (2010) em sementes de *Pongamia pinnata* (L.), e por Caccere et al. (2013) em sementes de Ingá. Neste último trabalho, os autores observaram aumento em tamanho e número de grãos de amido no eixo embrionário e também nos cotilédones, como verificado no presente estudo. Apesar de o amido não ser a principal reserva das sementes de seringueira, o acúmulo de material de reserva indica a maturação das sementes. A sacarose produzida pode ser temporariamente armazenada na forma de amido e, posteriormente, ser utilizada como fonte de carbono para a síntese de outros compostos de reserva como proteínas e lipídios (ANDRIOTIS et al., 2010), ou ainda como fonte de energia para o metabolismo celular.

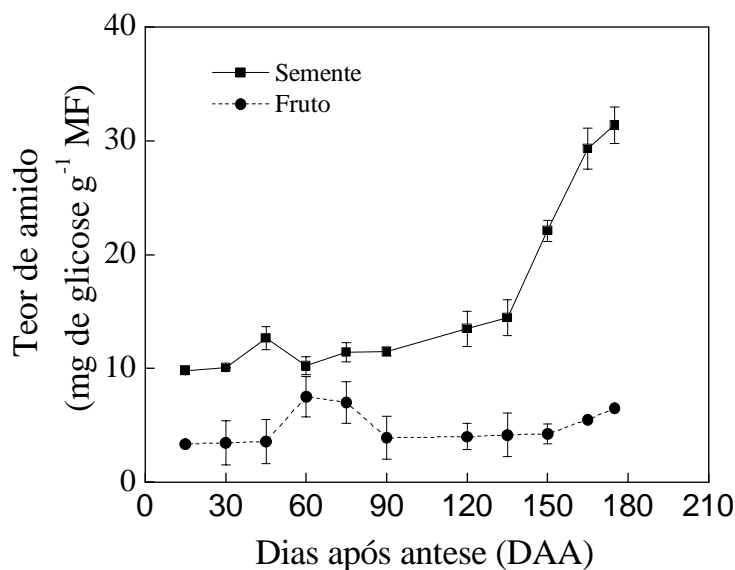


Figura 2. Teor de amido nas sementes e nos frutos de seringueira durante o desenvolvimento. As barras representam o desvio padrão de três repetições.

Com relação às proteínas totais, no fruto de seringueira houve ligeira variação ao longo do desenvolvimento. Já nas sementes, foram observados incrementos expressivos a partir dos 120 DAA, variando de aproximadamente 6,31 mg g⁻¹ MF nesta época a 21,59 mg g⁻¹ MF aos 175 DAA (Figura 3). Neste período, foi notada a maior concentração de proteínas, e ainda um possível consumo, pois nota-se alguma coalescência dos corpos protéicos no endosperma e cotilédones (Figuras 4 D-F e 5 D-F). O acúmulo de compostos de reserva durante o desenvolvimento de algumas sementes ocorre principalmente nos cotilédones (BOREK et al., 2013; BOREK et al., 2011), e este comportamento também pode ser observado para a sementes de seringueira principalmente com relação às proteínas. Segundo Pavithra et al. (2014), as proteínas podem se associar à corpos lipídicos prevenindo sua coalescência pela ação de enzimas hidrolíticas.

Além deste possível papel de proteção, o acúmulo de proteínas nas sementes se associa a maturação, por este composto estar associado à síntese de material genético e a reações enzimáticas essenciais ao metabolismo celular. Estes dados coincidem com os reportados por Wang et al. (2001), em sementes de *Olea europaea* e Kesari e Rangan et al. (2011) em sementes de *Pongamia pinnata*, onde houve aumento na concentração de proteínas nos últimos períodos de desenvolvimento das sementes.

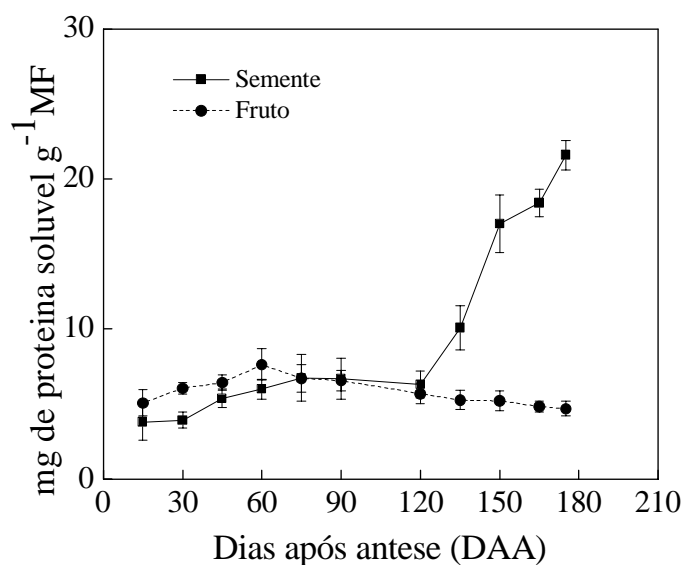


Figura 3. Teor de proteína nas sementes e nos frutos de seringueira durante o desenvolvimento. As barras representam o desvio padrão de três repetições.

Nas análises anatômicas realizadas nas sementes de seringueira durante seu desenvolvimento, foi observado reduzido número de vacúolos, porém ocupando grande parte do espaço intracelular aos 165 e 175 DAA, principalmente no endosperma e nos cotilédones (Figuras 4B-C e 5B-C), em relação aos 150 DAA (Figuras 4A e 5A). Além disso, ainda pode-se observar divisão celular, principalmente no eixo embrionário. Ainda, foi possível observar aumento no tamanho das células (Figuras 4A-C e 5A-C), mais evidente no endosperma que nos cotilédones. Maior acúmulo de amido foi observado nos dois últimos períodos de avaliação, porém com maior deposição no endosperma (Figuras 4G-I).

Com relação aos lipídios foi observada deposição principalmente no endosperma e no eixo embrionário para as sementes colhidas aos 150 e 165 DAA (Figuras 4J-L e 6J-L). Já aos 175DAA observou-se aumento no conteúdo de lipídios nos cotilédones (Figuras 4J-L, 5J-L e 6J-L). A maior organização das células e a deposição de compostos de reserva podem ser confirmadas pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura realizada ao longo de todo período experimental no endosperma das sementes (Figura 7). Os lipídios são considerados a principal reserva das sementes oleaginosas como a seringueira. Incremento no teor de lipídios também foi relatado por Rubio et al. (2013) em sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e por Moreira 2009 em sementes de seringueira.

A importância dos lipídios se dá pela sua participação na composição das membranas celulares, tendo relação direta com a qualidade das sementes, e por ser fonte de reserva energética durante a germinação. As sementes de seringueira são ricas em lipídios, porém sua utilização só ocorre após o esgotamento das reservas que disponibilizam energia (açúcares), de forma mais imediata, como o amido. A utilização dos lipídios necessita de maior demanda de energia, uma vez que várias etapas metabólicas estão envolvidas. Sua disponibilização ocorre através do ciclo do glioxilato, onde os lipídios insolúveis das sementes são convertidos a açúcares solúveis (sacarose), que são deslocados aos pontos onde há demanda de energia e clivada pelas enzimas sacarolíticas e disponibilizadas.

Associados ao acúmulo de compostos de reserva, alguns estudos têm relatado uma série de adaptações anatômicas no final da maturação das sementes ortodoxas, principalmente nas membranas celulares e nas organelas (MOURA et al., 2010). Alterações que provocam mudanças no metabolismo também ocorrem em sementes recalcitrantes, visando aumentar eficiência metabólica (CACCERE et al., 2013; BARBEDO et al., 2013).

Além das alterações nos compostos de reserva nas sementes de seringueira, como mencionado anteriormente, houve aumento no tamanho dos vacúolos aos 165 e 175 DAA, que passaram a ocupar grande parte do volume celular, o que pode ser considerada uma adaptação de sementes recalcitrantes para manutenção de altas taxas metabólicas ao final da maturação. Foi observada também divisão celular, no eixo embrionário, indicando que há uma preparação para que a germinação ocorra imediatamente após à dispersão. Caccere et al. (2013) também observaram aumento no número e no tamanho dos vacúolos, nos cotilédones e no eixo embrionário em sementes de Ingá.

Desta forma, é possível concluir que há grande acúmulo de compostos de reserva nas sementes de seringueira ao final da maturação. As alterações nestes compostos, como a coalescência das proteínas e as alterações anatômicas observadas podem ser associadas à característica recalcitrante desta espécie, ou seja, essas sementes podem germinar prontamente após a dispersão.

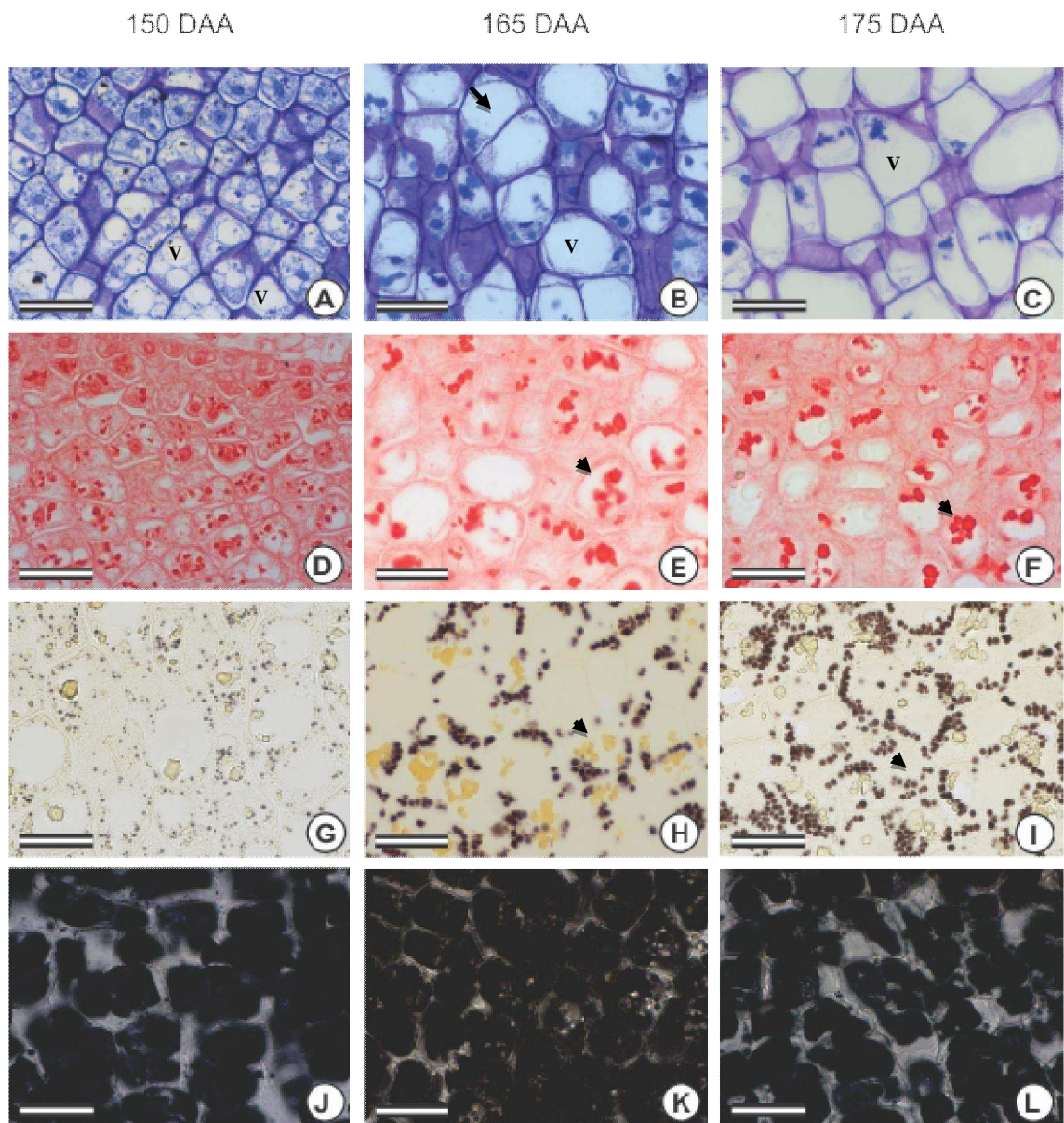


Figura 4. Sementes de *Hevea brasiliensis* colhidas em diferentes épocas (DAA). Fotomicrografias de seções transversais do endosperma coradas para visualização estrutural (A-C), proteínas (D-F), amido (G-I) e lipídios (J-L). DAA, Dias Após Antese. Barras: 5µm. As setas indicam divisão celular e as cabeças de seta deposição de composto de reserva. v=vaúolo.

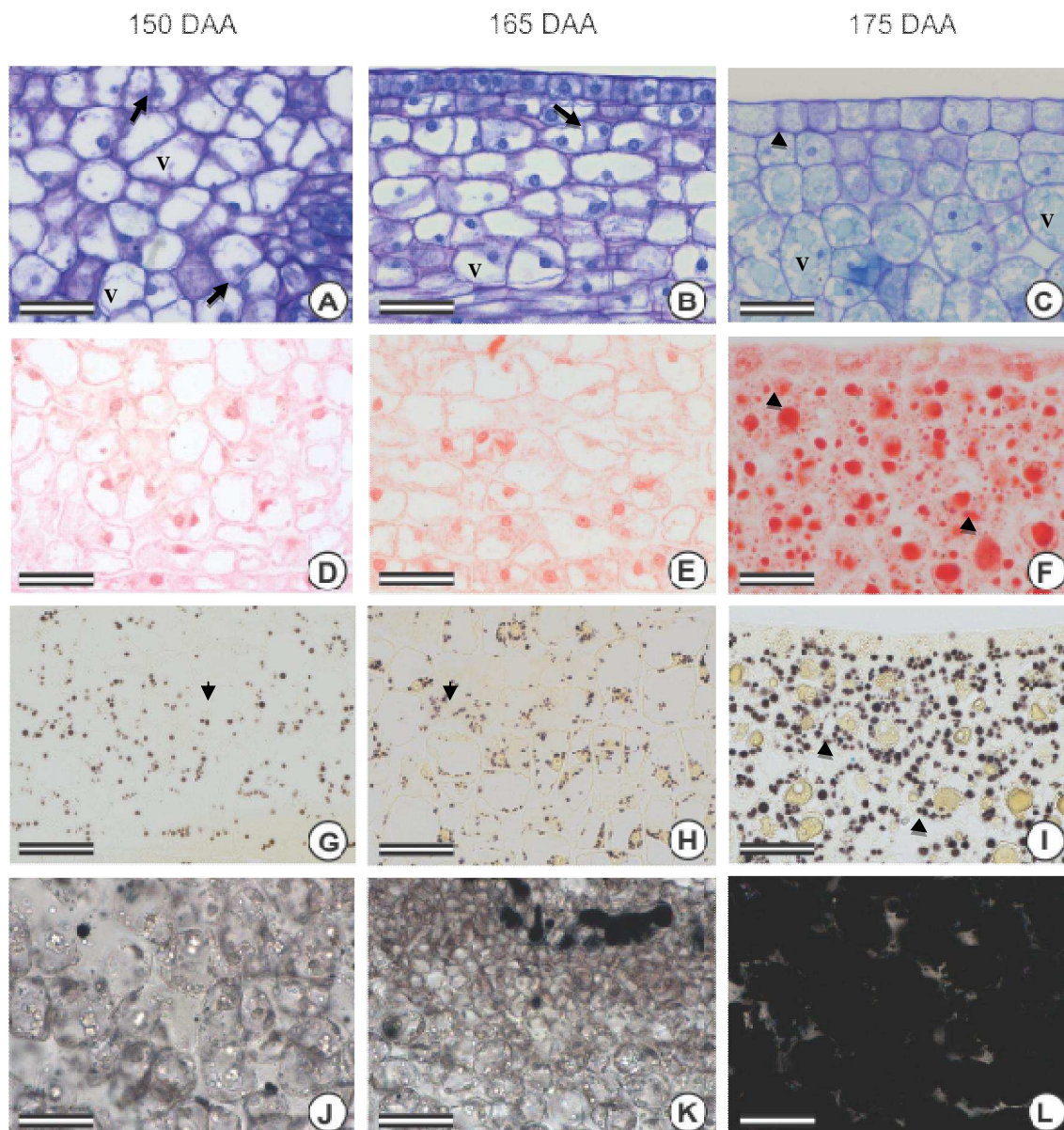


Figura 5. Sementes de *Hevea brasiliensis* colhidas em diferentes épocas (DAA). Fotomicrografias de seções transversais do cotilédone coradas para visualização estrutural (A-C), proteínas (D-F), amido (G-I) e lipídios (J-L). DAA, Dias Após Antese. Barras: 5µm. As setas indicam divisão celular e as cabeças de seta deposição de composto de reserva. v=vaúolo.

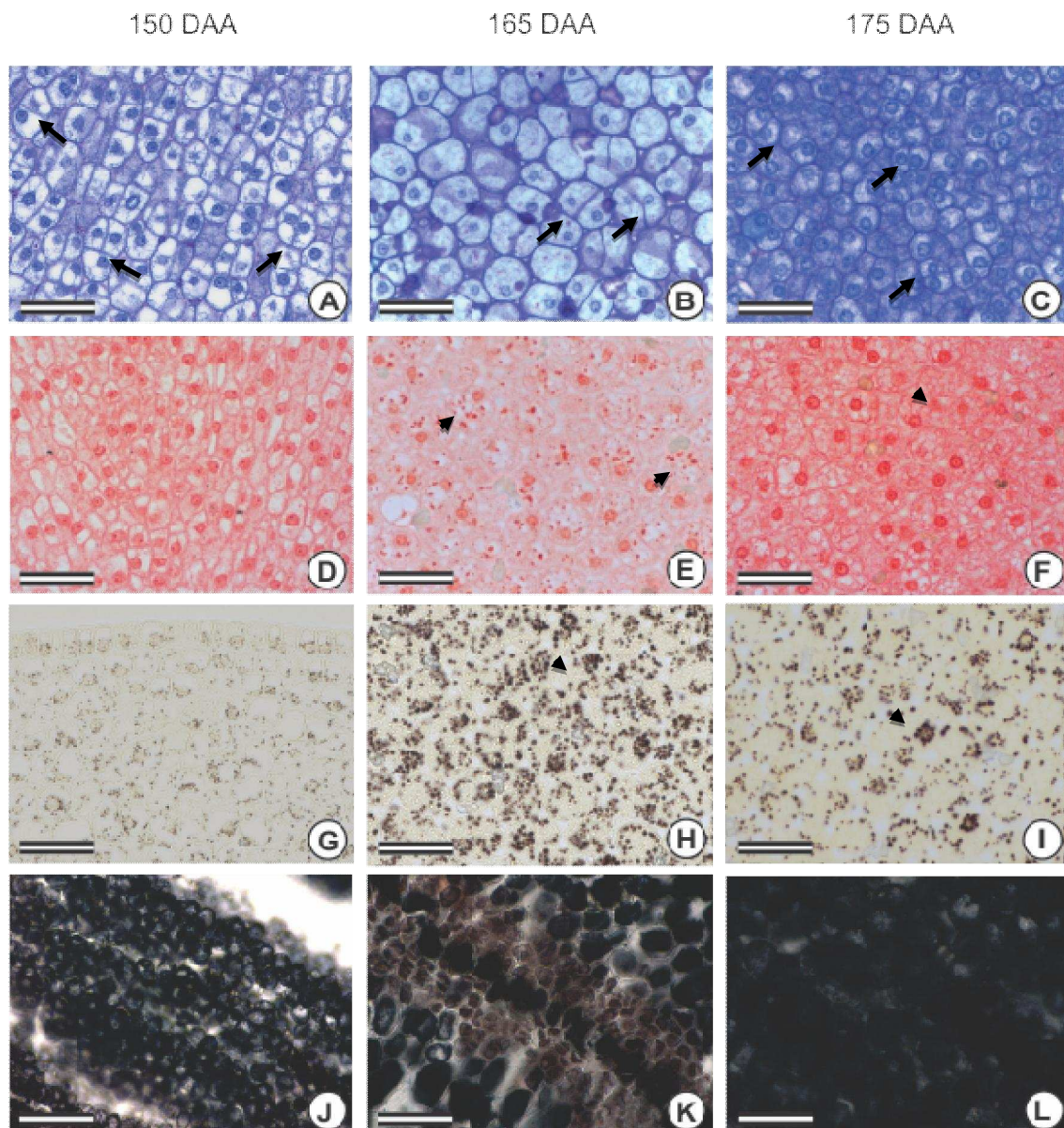


Figura 6. Sementes de *Hevea brasiliensis* colhidas em diferentes épocas (DAA). Fotomicrografias de seções transversais do eixo embrionário coradas para visualização estrutural (A-C), proteínas (G-F), amido (G-I) e lipídios (J-L). DAA, Dias Após Antese. Barras: 5 μ m. As setas indicam divisão celular e as cabeças de seta deposição de composto de reserva.

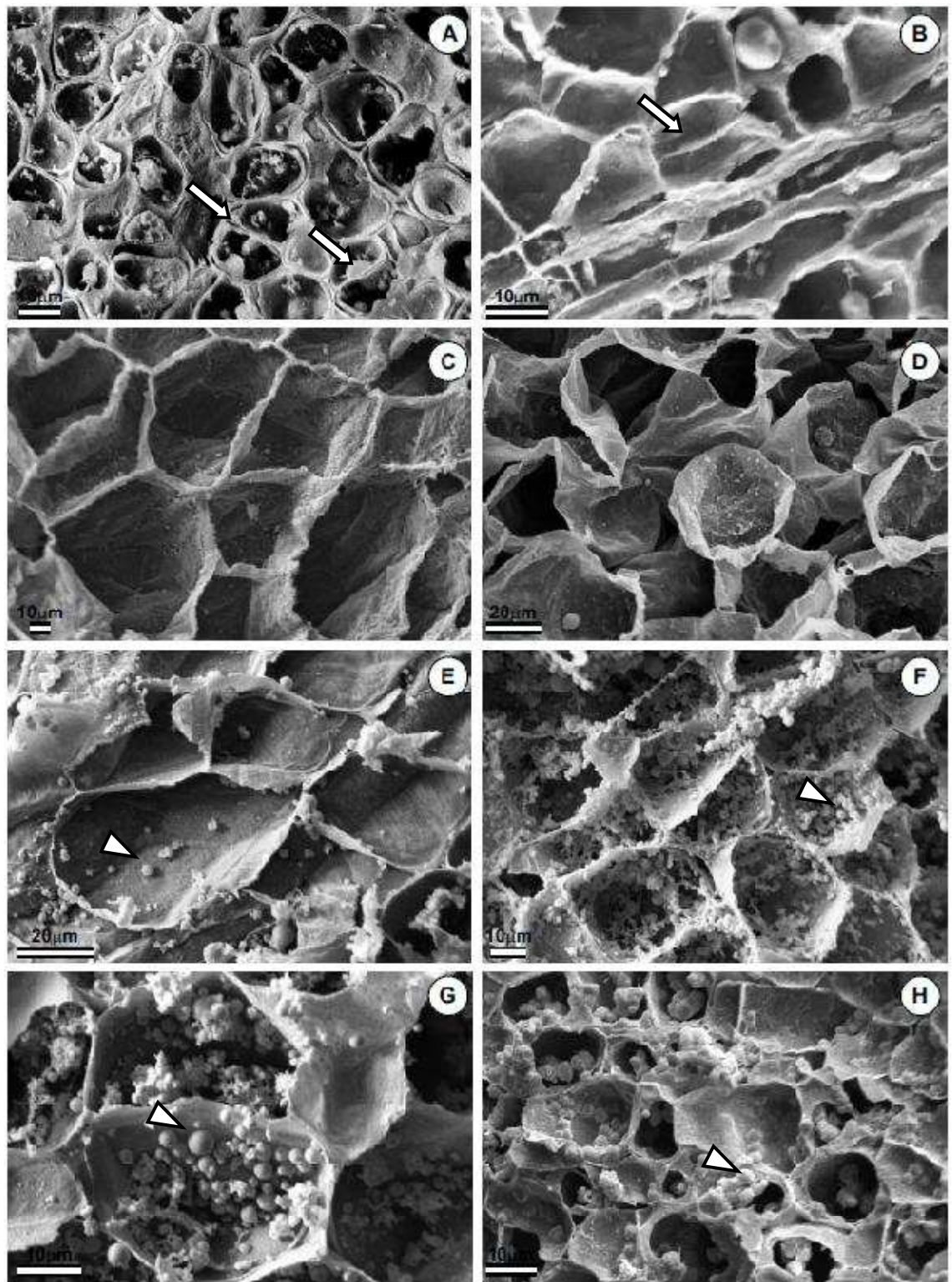


Figura 7. Desenvolvimento da semente de *Hevea brasiliensis*. Eletromicrografias de varredura do endosperma. **A**, 15 DAA. **B**, 60 DAA. **C**, 90 DAA. **D**, 120 DAA. **E**, 135 DAA. **F**, 150 DAA. **G**, 165 DAA. **H**, 175 DAA. As setas indicam divisão celular e as cabeças de seta deposição de composto de reserva.

3.4. – CONCLUSÕES

O maior acúmulo de compostos reserva nas sementes de seringueira ocorre próximo a dispersão, tanto no endosperma quanto nos cotilédones e eixo embrionário.

Foram observadas adaptações anatômicas que contribuem para manutenção de altas taxas metabólicas ao final do desenvolvimento das sementes, o que favorece o consumo dos compostos de reserva, fazendo com que o embrião não apresente dormência.

A mudança de fase de histodiferenciação para a de acúmulo de compostos de reserva parece ocorrer próximo aos 100 DAA.

O acúmulo de amido no endosperma ocorre principalmente a partir dos 135 DAA e o acúmulo de proteínas a partir dos 120 DAA.

3.5. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIOTIS, V.M.E.; PIKE, M.J.; KULAR, B.; RAWSTHORNE, S.; SMITH, A.M. Starchturnover in developingoilseedembryos. **New Phytologist**, v. 187, p.791–804, 2010.
- ARAÚJO, J. M. A. **Oxidação de lipídios**. Viçosa: UFV. Imprensa Universitária, 22p, 1994.
- BORISJUK, L.; ROLLETSCHEK, H.; WOBUS, U.; WEBER, H. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport to seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 503–512, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BARBEDO, C.J.; CENTENO, D.C.C.; RIBEIRO, R.C.L.F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, v. 40, p. 583-593, 2013.
- BONOME, L.T.S.; MOREIRA, S.A.F.; OLIVEIRA, L.E.M.; SOTERO, A.J. Metabolism of carbohydrates during the development of seeds of the brazilian rubber tree [Hevea brasiliensis (Willd. Ex Adr. de Juss) Muell.-Arg.]. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.211–219, 2011.
- 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.
- BOREK, S.; NUC, K. Sucrose controls storage lipid breakdown on gene expression level in germinating yellow lupine (*Lupinusluteus* L.) seeds. **Journal of Plant Physiologist**, v.168, p.1795–1803, 2011.
- BRYANT, G.; KOSTER, K.L.; WOLFE, J. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. **Seed Science Research**, v. 11, p. 17-25, 2001.
- CACCERE, R.; TEIXEIRA, S.P.; CENTENO, D.C.; FIGUEIREDO- RIBEIRO, R.C.L.; BRAGA, M.R. Metabolic andstructural changes during early maturation of *Inga veraseeds* are consistent with the lack of a desiccation phase. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p.791-800, 2013.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DUNLOP, R. A.; RODGERS, K. J.; DEAN, R. T. Recentdevelopment in theintracellulardegradationofoxidizedproteins. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, p.894–906, 2002.

- EVELAND, A.L.; JACKSON, D.P. Sugars, signalling, and plant development. **Journal of Experimental Botany**, 2011.
- FANGYUAN, Y.U.; CHEN, S. Morphological and biochemical changes of *Aesculus chinensis* seeds in the process of maturation. **New Forests**, v. 43, p. 429–440, 2012.
- GARCIA, L. C.; NOGUEIRA, A. C.; ALQUINI, Y. Aspectos morfo-anatômicos de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotz. E *Podocarpus sellowii* Klotz. – Podocarpaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.129-130, 2006.
- GAUDIN, V.; LUNNESS, P.A.; FOBERT, P.R.; TOWERS, M.; RIOU-KHAMLI, C.; MURRAY, J.A.H.; COEN, E.; DOONAN, J.H. The expression of *D-cyclin* genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristem and is locally regulated by the *cycloidea* gene. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1137–1148, 2000.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book. 523p. 1940. (O'Brien et al., 1964).
- JULIO, P. G. S.; OLIVEIRA, D. M. T. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Styrax camporum* Pohl. (Styracaceae), espécie de cerrado do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.30, n.2, p.189-190, 2007.
- KESARI, V.; RANGAN, L. Coordinated changes in storage proteins during development and germination of elite seeds of *Pongamia pinnata*, a versatile biodiesel legume. **AOB Plants**, 2011.
- KITAJIMA, K.; MYERS, J.A. Seedling ecophysiology; strategies toward achievement of positive net carbon balance. In: Leck MA, Parker TV, Simpson RL, eds. Seedling ecology and evolution. Cambridge: **Cambridge University Press**, p. 172–188, 2008.
- KOCH, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 235–246, 2004.
- MENDONÇA, M. S.; OLIVEIRA, A.B.; ARAÚJO, M.G.P.; ARAÚJO, L.M. Morfoanatomia do fruto e semente de *Oenocarpus minor* Mart. (Arecaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.1, p.91-98, 2008.
- McCREADY, R. M.; GUGGOLZ, A.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 22, p. 1156-1158, 1950.
- MISHRA, B.S.; SINGH, M.; AGRAWAL, P.; LAXMI, A. Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. **PLOS ONE**, v. 4, p. 4502, 2009.
- MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v. 67: p. 399-407, 2010.

- NELSON, N. A. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380. 1944.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatics taining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, p. 367-373, 1964
- PAVITHRA, H.R.; GOWDA, B.; SHIVANNA, M.B. Biochemical changes in the composition of developing seeds of Pongamia pinnata (L.) Pierre. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 199– 208, 2014.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.
- RENÓ, L. R.; MOSCHETA, I. S.; BRACCINI, A. L. Morfo-anatomia do fruto e semente de amarelinho (Tecomastans (L.) Kunth – Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p. 18-30, 2007.
- RUBIO, F.; MENEGHEL, A.P.; GOMES, L.F.S.; MALAVASI, M.M. Estádios de maturação do fruto no desempenho germinativo e teor de óleo de sementes de Jatropha curcas Linn. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 663-668, mar./abr. 2013.
- SANGWAN, S.; RAO, D.V.; SHARMA, R.A. A review on Pongamia pinnata (L.) Pierre: a great versatile leguminous plant. **Nature and Science**, v. 8, p. 130–139, 2010.
- SMEEKENS, S. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 49–81, 2000.
- SORIANO, D.; SEGOVIA, A. O.; GUZMAN, J. M.; KITAJIMA, K.; BUEN, A.G.; HUANTE, P. Seed reserve composition in 19 tree species of a tropical deciduous forest in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. **Annals of Botany**, v. 107, p. 939–951, 2011.
- VICRÉ, M.; FARRANT, J.M.; DRIOUICH, A. Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. **Plant Cell Environment**, v.27, p.1329–40, 2004.
- VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xylidine Ponceau 2R. **Analytical Histochemistry**, v. 15. n.4, p. 289-296, 1970.
- WANG, W.; DE-DIOS-ALCHE, J.; CASTRO, A.J.; RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.; Characterization of seed storage proteins and their synthesis during seed development in Olea europaea. **International Journal Development Biology**, v. 45, p. 63–64, 2001.
- YU, F; CHEN, S. Morphological and biochemical changes of Aesculus chinensis seeds in the process of maturation. **New Forests**, v. 43, p. 429–440, 2012.

CAPÍTULO 4

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM SEMENTES DE SERINGUEIRA DURANTE O ARMAZENAMENTO

RESUMO

SOUZA, Genaina Aparecida de. Universidade Federal de Viçosa, July 2014. **Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de seringueira durante o armazenamento.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

O objetivo do estudo foi avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de seringueira durante o armazenamento sob diferentes condições de temperatura. O experimento foi conduzido nos laboratórios de Análise de Sementes, Laboratório de Sementes Florestais e Laboratório de Pós Colheita da Universidade Federal de Viçosa. As sementes foram obtidas na empresa Cautex Florestal- SP, no mês de março de 2013 e separadas em três partes para tratamento contra microrganismos com os fungicidas Tecto 600 (35/100Kg sementes) e Captan 50 (75g/100kg sementes); com Alecrim moído (20g/Kg), e sementes sem tratamento (controle). Amostras de 600g de cada tratamento foram acondicionadas em sacos de papel Kraft que foram colocados dentro de sacos de polietileno, lacrados e perfurados. Após armazenadas em temperaturas de 10 °C, 20 °C e 25 °C e a cada 15 dias, foram retiradas amostras para avaliações fisiológicas e bioquímicas. A porcentagem de germinação das sementes decresceu ao longo do armazenamento. Para as sementes armazenadas a 10 °C, não houve diferença significativa ($P < 0,05\%$) entre a emergência quando tratadas com alecrim e o controle (37% e 35% respectivamente), aos 75 dias. Para as sementes armazenadas a 20 °C foi possível observar rápida perda de viabilidade, independente dos tratamentos, com germinação somente até aos 60 dias. Nas sementes armazenadas a 25 °C foi observada germinação aos 75 dias somente para o controle (20%). O IVE (índice de velocidade de emergência) apresentou comportamento semelhante ao da germinação e a condutividade elétrica (CE), inverso, ou seja, tratamentos que apresentaram maiores valores de germinação apresentaram, conseqüentemente, menores valores de CE. Em relação à variação da umidade, foi observada redução somente nas sementes armazenadas a 20 °C, independentes dos tratamentos. A peroxidação de lipídios aumentou ao longo do armazenamento, e este aumento foi menos intenso nas sementes armazenadas a 10 °C. Portanto, conclui-se que, neste caso, as sementes de seringueira foram melhor preservadas quando armazenadas a 10 °C, sem tratamento para controle de microrganismos ou quando tratadas com alecrim.

Palavras chave: Germinação, temperatura e viabilidade

ABSTRACT

SOUZA, Genaina Aparecida de. Universidade Federal de Viçosa, July 2014. **Biochemical and physiological alterations in rubber tree seeds during the storage.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

The objective of this study was to evaluate the biochemical and physiological alterations in rubber tree seeds during the storage under different conditions of temperature. The experiment was conducted at Analyze Seeds Laboratory, Forest Seeds Laboratory and Anatomic Analyzes Laboratory, at Universidade Federal de Viçosa. The seeds was obtained from the CautexFlorestal- SP company, in March 2013 and separated in three lots for treatment against microorganisms with fungicide Tecto 600 (35/100Kg seeds) and Captan 50 (75g/100kg seeds); with ground rosemary (20g/Kg), and seeds without treatment (control). Samples of 600g were conditioned in kraft paper that were placed inside polyethylene bags, sealed and perforated. After stored under temperatures of 10°C, 20°C and 25°C were removed samples for biochemical and physiological evaluations by each 15 days. The percentage of seeds germination decreases during the storage. For seeds stored at 10°C, there was no significant difference ($P < 0,05\%$) between the emergence when treated with ground rosemary and the control (37% and 35% respectively), at 75 days. For seeds stored at 20°C was possible to observe fast loose of viability, independent of the treatments, with germination only until the 60 days. In the seeds stored at 25°C was observed germination at 75 days only for control (20%). The ESI (emergence speed index) presented behavior similar to the emergence and inverse of the electric conductivity (EC), what means that the treatments which presented higher values of emergence presented consequently, less values of CE. In relation to the moisture variation, was observed reduction only in seeds stored at 20°C, independently of the treatments. The lipid peroxidation increases during the storage, and this increase was less intense in seeds stored at 10 °C. Therefore it is concluded in this case, that the rubber tree seeds were better conserved when stored at 10°C without treatment to control microorganism, and when treated with rosemary.

Key words: temperature, viability, emergence, lipid peroxidation.

4.1. – INTRODUÇÃO

Com base na tolerância à dessecação e na capacidade de sobreviver a baixas temperaturas, as sementes são classificadas como ortodoxas ou recalcitrantes (ROBERTS 1973). As sementes ortodoxas desenvolveram mecanismos evolutivos que lhes permitem reduzir o metabolismo, e assim tolerar baixas temperaturas de armazenamento e a dessecação a baixos teores de água. Enquanto as sementes recalcitrantes, não apresentam essas características, sendo armazenadas, em geral, com alto teor de água e não suportando baixas temperaturas (próximas de zero). Uma hipótese discutida para que sementes recalcitrantes não resistam a condições ideais de armazenamento, seria que essas sementes seriam na verdade sementes ortodoxas que não terminaram seu desenvolvimento (BARBEDO et al., 2013). Pesquisas relacionadas à conservação de sementes recalcitrantes vêm sendo desenvolvidas desde sua classificação, porém, pouco avanço tem sido obtido em relação à prorrogação do período de viabilidade dessas sementes (BARBEDO et al., 2013).

Normalmente, as sementes perdem sua viabilidade ou capacidade germinativa ao longo do tempo devido a diversas reações metabólicas que ocorrem durante o armazenamento. Essas reações podem ser retardadas, diminuindo-se a temperatura do ambiente de armazenamento e o teor de água das sementes (BEWLEY et al., 2013, REIS et al., 2012), procedimento este importante também para controlar a proliferação de fungos (PARISI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011). No entanto, sementes recalcitrantes são armazenadas com alto conteúdo de água e sob temperaturas elevadas (acima de 25 °C) (PASQUINI et al., 2012; SERSHEN et al., 2012a; BARBEDO, 1998). Essas condições geralmente permitem que as sementes mantenham elevado metabolismo celular (SERSHEN et al., 2012b), afetando sua viabilidade.

A peroxidação de lipídios decorrente da presença de radicais livres é uma das causas da deterioração das sementes, cujos produtos resultantes desse processo levam à desnaturação do DNA, afeta a transcrição de RNAs, tradução de proteínas e causam a desestruturação das membranas celulares e a oxidação dos aminoácidos (POPOVIĆ et al., 2006). Por consequência, há queda na germinação e vigor, além de afetar o desenvolvimento de plântulas oriundas dessas sementes.

A redução na atividade de enzimas do estresse oxidativo pode estar ligada ao aumento na peroxidação de lipídios, afetando a capacidade antioxidante e o vigor das sementes (BAILLY et al., 2002). A ação de enzimas como a catalase, a peroxidase e a

superóxido dismutase foi relacionada com a perda de viabilidade em sementes (LOYCRAJOU et al., 2008; GOEL et al., 2003), durante o armazenamento.

Atualmente, a criopreservação de eixos embrionários (HAMILTON et al., 2013; SERSHEN et al., 2012b; WALTERS et al., 2010) vêm sendo utilizados como alternativa de conservação de material genético de sementes recalcitrantes. Contudo, é caro e sensível, não sendo considerado um método de conservação de sementes propriamente dito.

Para sementes de seringueira resultados contraditórios são encontrados quanto à condição mais adequada para o armazenamento. A utilização de baixas temperaturas (5°C) foi recomendada por Paula et al. (1997) contrariando a recomendação de armazenamento em temperaturas de 25 °C (BONOME et al., 2009) e 27 °C (CICERO, 1986).

Esforços na obtenção de maiores informações sobre o comportamento das sementes de seringueira sob diferentes condições de armazenamento são importantes para a conservação e manutenção da sua viabilidade. Ademais, pode fornecer subsídios que contribuam para ampliar o período de disponibilidade dessas sementes com alta germinação e vigor, de modo que mudas possam ser continuamente produzidas em qualidade satisfatória (GUEDES et al., 2012).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de seringueira sob diferentes condições de armazenamento.

4.2. – MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Anatomia Vegetal e Laboratório de Pós-colheita da Universidade Federal de Viçosa. As sementes foram obtidas na empresa Cautex Florestal-SP, no mês de março de 2013. As sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos:

1. Químico: com os Fungicidas Tecto 600 (35/100Kg sementes) e Captan 50 (70g/100kg sementes), metade da dosagem utilizada por Bonome et al. (2009).
2. Alecrim moído (20g/Kg sementes), segundo recomendações de Ribeiro (2013).
3. Controle: sementes sem tratamento

Para cada tratamento, foram utilizadas, amostras de 600g de sementes que foram acondicionadas em sacos de papel Kraft colocados dentro de sacos de polietileno, lacrados e perfurados para permitir o fluxo de oxigênio dentro da embalagem, como recomendado por Pereira (1980).

Em seguida, as sementes de cada tratamento foram armazenadas nas seguintes condições de ambiente: câmara fria a 10 °C, com 60 % de umidade relativa; laboratório a 20 °C (± 2), com umidade relativa em torno de 35 % e condições de ambiente 25 °C ± 3 , sem controle de umidade relativa.

A cada 15 dias durante 75 dias, período no qual foi observada viabilidade das sementes, foram retiradas amostras para a realização das seguintes avaliações:

Determinação o teor de água das sementes: por meio do método de estufa a 105 °C ± 3 °C, por 24 horas (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem.

Os testes de emergência de plântulas foram realizados em casa de vegetação com quatro repetições de 25 sementes, semeadas a 1,0 cm de profundidade em bandejas contendo areia e umedecida quando necessário.

Os Índice de velocidade de emergência (IVE) foi obtido realizando-se a contagem diária das plântulas emergidas, até a estabilização, sendo esses dados aplicados em fórmula proposta por Maguire (1962) para obter-se o IVE.

A condutividade elétrica foi obtida com 4 repetições de 10 sementes para cada tratamento. As sementes de cada repetição foram pesadas com precisão de 0,01 g e, a seguir, colocadas em copos de plástico contendo 200 ml de água deionizada, permanecendo por um período de 24 h à temperatura constante de 25°C. A

determinação da condutividade elétrica foi realizada com um condutivímetro de massa e os resultados expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$. As sementes tratadas com produto químico foram lavadas em água corrente e secas imediatamente antes da realização do teste de condutividade elétrica.

Para a determinação da atividade das enzimas do estresse oxidativo (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase total (POX) e ascorbato peroxidase (APX), os extratos enzimáticos brutos foram obtidos pela maceração de 0,1 g de embrião liofilizado em gelo, seguido da adição de 2,0 mL do seguinte meio de homogeneização: tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 15.000 g por 15 min a 4°C.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,8, metionina 50 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 1 mM, EDTA 5 mM e riboflavina 10 mM (DEL LONGO et al., 1993). A reação foi conduzida a 25°C em câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15W mantida no interior de uma caixa internamente revestida com papel alumínio. Após cinco minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi determinada pela absorção a 560 nm em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA) (Giannopolitis e Ries, 1977). As leituras foram realizadas em triplicata. Considerou-se como branco o valor de absorbância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro pelo mesmo tempo, sendo subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir a fotorredução do NBT em 50% (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). A atividade da SOD foi expressa em $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, quantificada pelo método de Bradford 1956.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela adição de 30 μL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL do meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 100 mM e pH 7,0 e peróxido de hidrogênio 75 mM (HAVIR; MCHALE, 1987). O decréscimo na absorbância a 240 nm foi medido em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA) durante os dois primeiros minutos da reação, que foi realizada à temperatura constante de 25 °C, sendo a atividade da CAT

determinada com base na inclinação da reta. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M cm^{-1} (Anderson et al., 1995) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da peroxidase total (POX) foi determinada pela adição de 30 μL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 100 mM (KAR; MISHRA, 1976). O incremento na absorvância durante os dois primeiros minutos da reação a 420 nm em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA) e temperatura constante de 25 °C determinou a produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHANCE; MAEHLI, 1955) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 2,9mL de meio de reação constituído de ácido ascórbico 0,8 mM e H_2O_2 1,0 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0. Foi observado o decréscimo na absorvância a 290 nm, à 25°C, durante o primeiro minuto de reação (NAKANO e ASADA, 1981; KOSHIBA, 1993). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (NAKANO e ASADA, 1981) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Avaliação da peroxidação de lipídios: Amostras de 0,3g de sementes moídas foram homogeneizadas com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) e centrifugadas a 13.000 xg por 15 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5mL de ácido tiobarbitúrio (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20%. A mistura foi incubada em água fervente por 20 min, e a reação foi interrompida em banho de gelo por 2 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 xg durante 4 min. A leitura foi realizada a 532 nm e 600 nm. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para quantificar a concentração do complexo entre o aldeído malônico/TBA (MDA/TBA), sendo os resultados expressos em nmol MDA g^{-1} de matéria seca (HEATH; PACKER, 1968).

A identificação dos fungos presentes nas sementes foi realizada pelo método do Blotter test, onde 4 repetições de 5 sementes desinfestadas (1 min em álcool 70%, 3 min em hipoclorito de sódio 1% e 3 min em água autoclavada, nesta ordem sob agitação constante) e 4 repetições de 5 sementes não desinfestadas, foram colocadas em gerbox com três folhas de papel germitex e umedecidas com água autoclavada e mantidas em

BOD a 25°C por 7 dias (BRASIL, 2009b). Após a observação da incidência de fungos, foi feito o isolamento em placa de Petri e identificação dos gêneros.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições, em esquema fatorial (3x3x5), sendo 3 ambientes de armazenamento (10, 20 e 25 °C), 3 tratamentos de sementes (controle, químico, alecrim), 5 épocas de avaliação. As análises dos dados foram realizadas pelo sistema de Análise de Variância, SISVAR, (FERREIRA, 2008). As médias obtidas para os tratamentos de sementes e ambientes de armazenamento foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Os dados referentes às épocas de armazenamento foram submetidos à análise de regressão.

4.3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação tripla para os fatores estudados. Dessa forma, as temperaturas de armazenamentos (10 °C, 20 °C e 25 °C) foram comparadas dentro de cada tratamento (controle, fungicidas químicos ou alecrim) e período de armazenamento (15, 30, 45, 60 e 75 dias). Para os dados de germinação, realizou-se também o desdobramento dentro de cada temperatura de armazenamento e período de armazenamento.

No início do armazenamento, o teor de água das sementes de seringueira utilizadas neste estudo era de 31%, entretanto, foi possível observar variações ao longo do armazenamento. Estas variações foram semelhantes para as sementes armazenadas nas temperaturas de 10°C e 25°C, que não apresentaram grandes oscilações em relação à umidade inicial. Entretanto, para as sementes armazenadas a 20°C foi observada redução no teor de umidade ao longo de todo armazenamento (Figura 1).

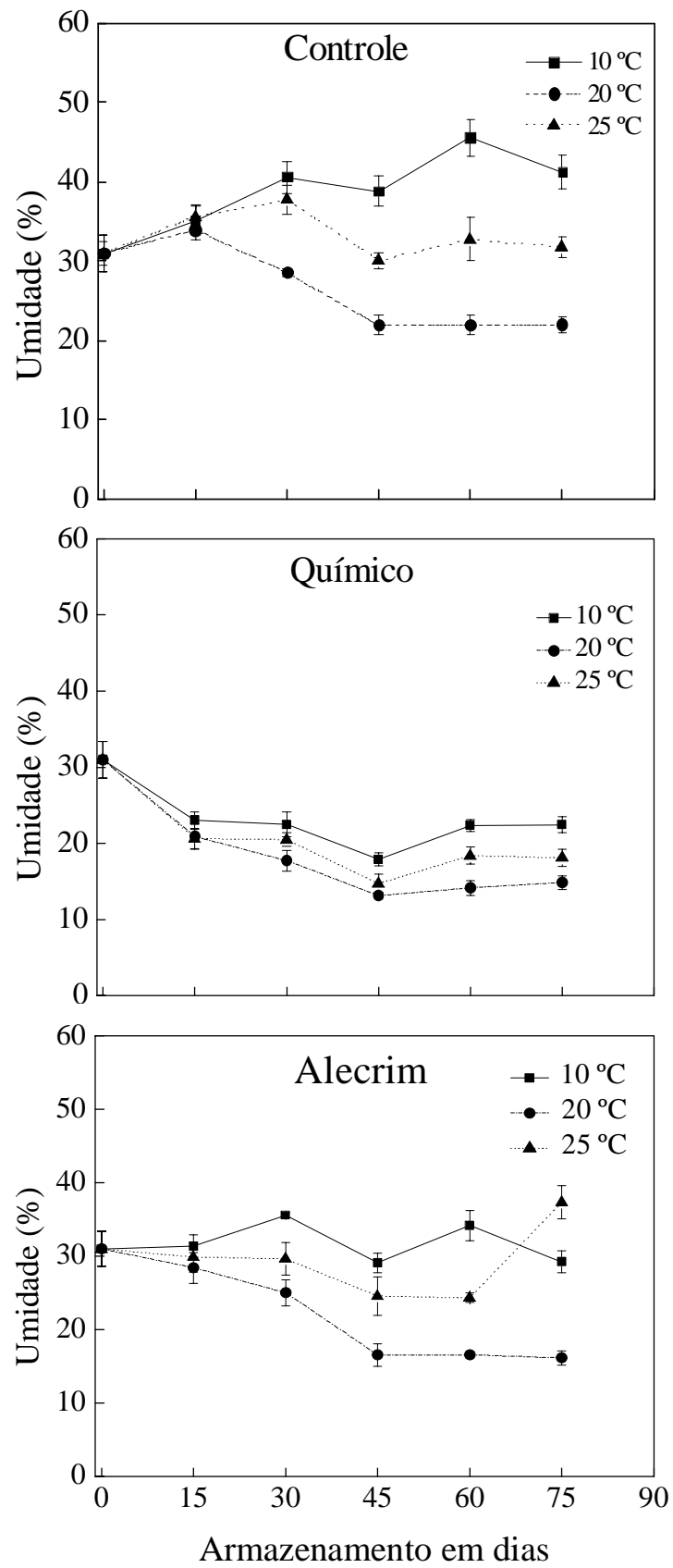


Figura 1. Variação no grau de umidade nas sementes de seringueira em função do tratamento para de patógenos e da temperatura.

Diversos estudos associam a queda no teor de umidade das sementes recalitrantes com a redução da sua viabilidade (BARBEDO et al., 2013; PASQUINI et al., 2012; SERSHEN et al., 2012a), no caso da seringueira, a viabilidade não é mantida com teores de água inferiores a 30 % (CÍCERO, 1986) ou 15 a 20 % (CHIN et al., 1981), o que pode explicar a perda da capacidade germinativa apresentada pelas sementes armazenadas a 20°C. Uma vez que, esta temperatura era mantida por um sistema de ar condicionado que retira umidade do ambiente. A umidade mantida nesta condição foi de cerca de 35%, bem inferior a mantida na câmara fria, 10°C (60%) e provavelmente contribui para a queda na umidade das sementes. Chin et al., 1981 reforçam ainda que mesmo quando armazenadas sob condições favoráveis, o tempo de vida dessas sementes é relativamente curto e apenas, ocasionalmente, excede poucos meses (BEWLEY; BLACK, 1994 e CHIN, 1978).

O potencial fisiológico das sementes durante o armazenamento é afetado por diversos fatores, como a qualidade inicial das sementes, variações no ambiente de armazenamento como temperatura, umidade relativa do ar, oxigênio e as características inerentes à espécie estudada (ABREU et al., 2012). Os resultados obtidos nos testes de emergência, condutividade elétrica, peso fresco e seco de plântulas, determinações de atividade enzimática, peroxidação de lipídios, revelaram queda na viabilidade das sementes ao longo armazenamento.

No armazenamento a 10°C, não houve diferença significativa ($P < 0,05\%$), entre a germinação das sementes tratadas com alecrim e do controle, na maior parte do período avaliado, e ambos os tratamentos apresentaram germinação superior à obtida com o tratamento químico, 37%, 35% e 3 %, respectivamente aos 75 dias após ao armazenamento (DAR). Foi possível observar também, nas sementes tratadas com fungicidas químicos, menor porcentagem de germinação independente das temperaturas de armazenamento, indicando possível fitotoxicidade destes fungicidas às sementes de seringueira ao longo do armazenamento (Figura 2). A 20°C, a germinação das sementes sem tratamento (controle) e das tratadas com alecrim foi superior as tratadas com fungicidas químicos. Além disso, pode ser observado que quando armazenadas nesta temperatura, perderam rapidamente sua viabilidade, independente dos tratamentos. Para a temperatura de 25°C, a germinação das sementes do controle foi superior a dos demais tratamentos, exceto aos 15 DAR, sendo o controle o único tratamento que proporcionou germinação aos 75 DAR, nesta condição.

Ao comparar as temperaturas de armazenamento dentro do tratamento controle, pode-se observar maior germinação das sementes armazenadas a 10°C em relação aquelas armazenadas a 20°C e 25°C, aos 75 DAR. Em períodos inferiores, não houve diferença significativa quando armazenadas em temperatura de 10°C ou 25°C. Entretanto, nestas duas temperaturas de armazenamento foi observada germinação superior à obtida a 20°C, aos 75 DAR (Figura 2).

Para as sementes tratadas com alecrim e armazenadas a 10°C foi possível observar porcentagem de germinação significativamente superior às armazenadas a 20°C ou 25°C, já a partir dos 30 DAR. Foi possível observar que o tratamento com fungicidas químicos afetou negativamente a germinação das sementes em todas as temperaturas de armazenamento, sendo observada porcentagem de germinação inferior a 40% desde os 15 DAR.

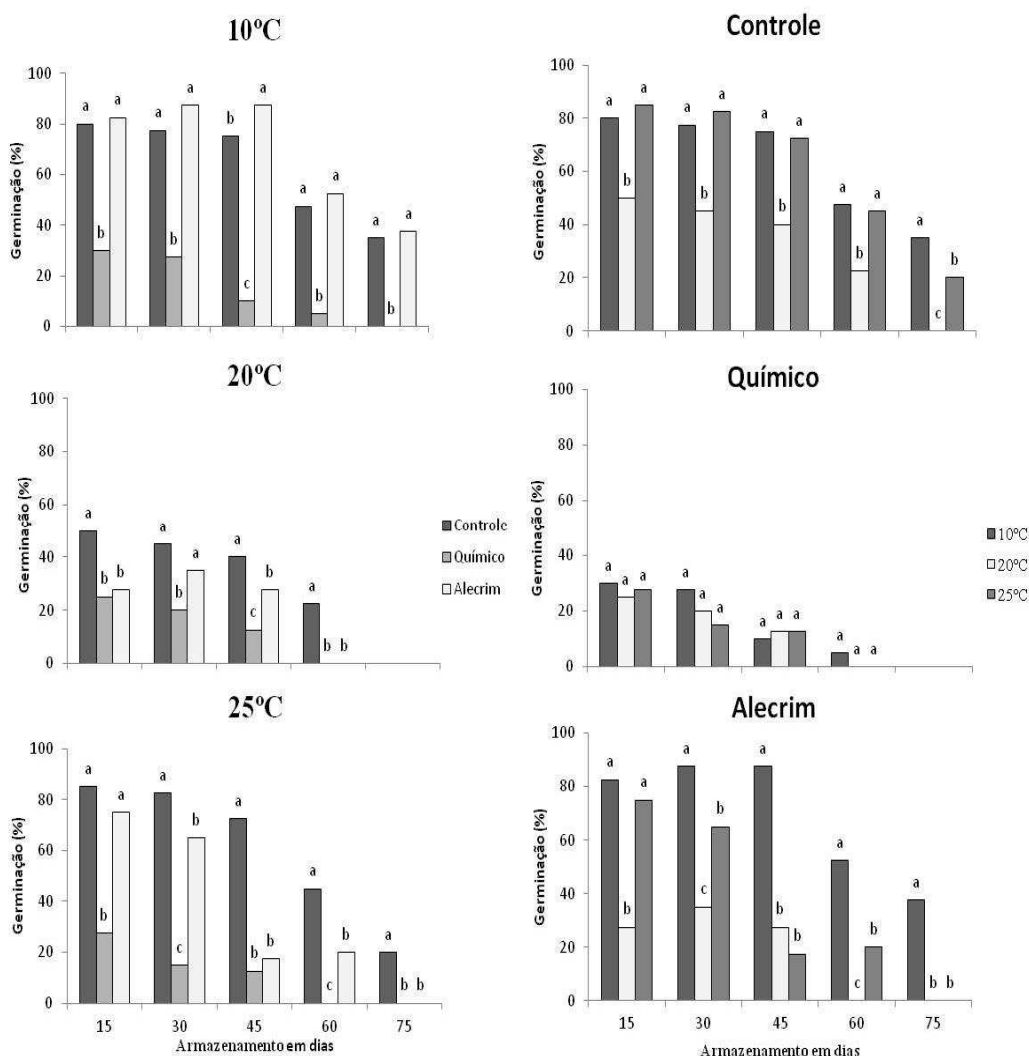


Figura 2. Porcentagem de emergência de plântulas oriundas de sementes de seringueira em função dos tratamentos de controle de fungos e das temperaturas de armazenamento. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) dentro de cada período avaliado.

Uma tendência de redução na germinação das sementes ao longo do tempo foi evidente, independentemente das condições de armazenamento. Este comportamento é tido como normal, uma vez que durante o armazenamento as sementes passam por alterações bioquímicas e fisiológicas que levam a deterioração, afetando negativamente a germinação. Nessas alterações incluem variação no teor de umidade, peroxidação de lipídios, desestruturação de membranas celulares e queda na atividade de enzimas, principalmente a catalase. Redução na atividade de enzimas do estresse oxidativo, como a catalase foram obtidos em sementes de girassol também submetidas ao armazenamento, independente dos tratamentos (ABREU et al., 2012 e GRISI; SANTOS et al., 2007), como no presente estudo.

A eficiência da temperatura de 10°C em manter a viabilidade das sementes diferem parcialmente daqueles encontrados por Bonome et al. (2009), onde a temperatura ambiente foi mais eficiente em preservar a germinação das sementes de seringueira, por um período de 210 dias. Neste caso essa diferença pode ser atribuída a umidade das sementes armazenadas neste estudo, 31 % e por Bonome et al. (2009), acima de 35 % e por Pereira (1980) e Cícero (1986), que obtiveram germinação de 64 e 61% após 135 e 180 dias de armazenamento, respectivamente, em temperatura ambiente ($\pm 27^{\circ}\text{C}$). Em geral, temperaturas menores são mais recomendadas para o armazenamento de sementes, por proporcionarem redução no metabolismo celular, na degradação de compostos de reserva das sementes e de eventos que levam a deterioração, como respiração excessiva (BARBEDO et al., 2013). O resultado encontrado neste estudo pode estar relacionado a essa redução de metabolismo celular proporcionado pela temperatura mais baixa (10°C) aos 75 DAR.

Beng (1976), relata que apesar da seringueira ser uma planta de origem tropical suas sementes são melhor armazenadas sob temperaturas mais baixas, com recomendações em torno de 7°C a 10°C. Resultados semelhantes também foram observados por Paula et al. (1997), onde a baixa temperatura de armazenamento (5°C) foi mais eficaz do que a temperatura ambiente de 20°C. De forma semelhante, neste estudo, a temperatura de 20°C proporcionou a menor germinação. Provavelmente, o menor grau de umidade das sementes armazenadas nesta temperatura, cerca de 35 % tenha afetado negativamente a qualidade fisiológica das sementes.

No entanto, o tratamento químico foi eficiente em controlar os microrganismos nas sementes durante o armazenamento. Nas sementes tratadas com alecrim foi observada a presença de *Aspergillus* spp, apesar da redução na incidência de *Penicillium*

spp e *Fusarium* spp, sendo este último, o mais danoso para sementes armazenadas. A presença de *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Fusarium* spp, *Botrytis* spp e, em alguns casos, bactérias foram observadas nas sementes sem tratamento (controle), principalmente aos 75 DAR.

Os resultados obtidos para o índice de velocidade de emergência (IVE) foram semelhantes aos de germinação, ou seja, redução dos valores ao longo do armazenamento. Durante todo o período experimental, o IVE foi semelhante para as sementes sem tratamento (controle), quando armazenadas a 10°C ou a 25°C. Além disso, os valores de IVE das sementes armazenadas nestas temperaturas foram superiores às aquelas armazenadas a 20°C. Já as sementes tratadas com fungicida químico, o valor de IVE foi baixo ao longo de todo período de armazenamento, independente das temperaturas de armazenamento. Nas sementes tratadas com alecrim, foi observado a 10 °C valor de IVE significativamente superior ao daquelas armazenadas a 20 °C ou 25 °C (Figura 3). Estes resultados podem ser atribuídos à queda de umidade das sementes armazenadas a 20 °C, devido à menor umidade relativa mantida no ambiente de armazenamento.

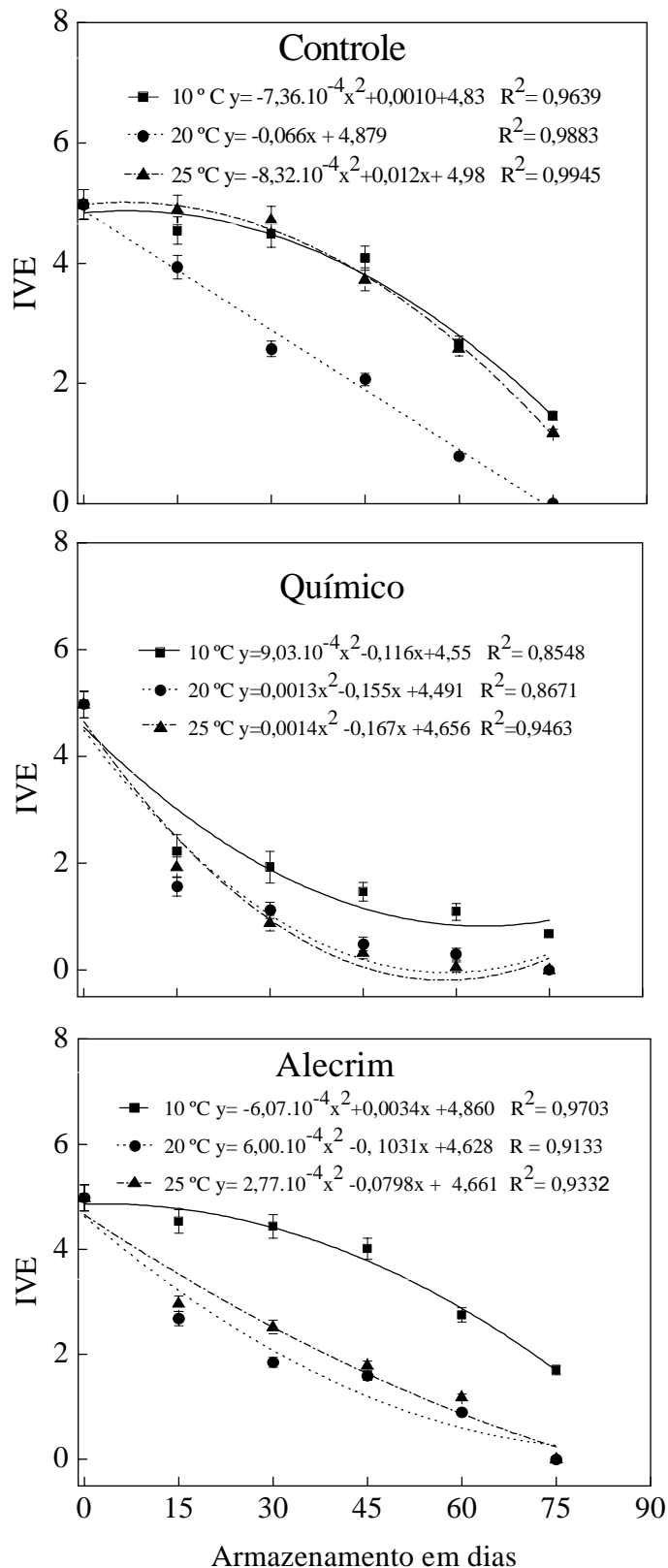


Figura 3. Índice de velocidade de emergência (IVE), de plântulas oriundas de sementes de seringueira em função dos tratamentos de controle de fungos e das temperaturas de armazenamento. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), dentro de cada período avaliado.

Quanto à condutividade elétrica, foi observado que as sementes sem tratamento (controle) e armazenadas a 20°C apresentaram valores significativamente superiores daquelas armazenadas a 10°C ou 25°C, a partir dos 60 DAR. Para as sementes tratadas com fungicidas químicos foram observados valores de condutividade elétrica mais elevada somente aos 75 DAR, não apresentando diferença significativa entre as temperaturas de armazenamento avaliadas. E quando tratadas com alecrim, as sementes armazenadas a 10°C, a partir dos 30 DAR, apresentaram os menores valores de condutividade elétrica (Figura 4).

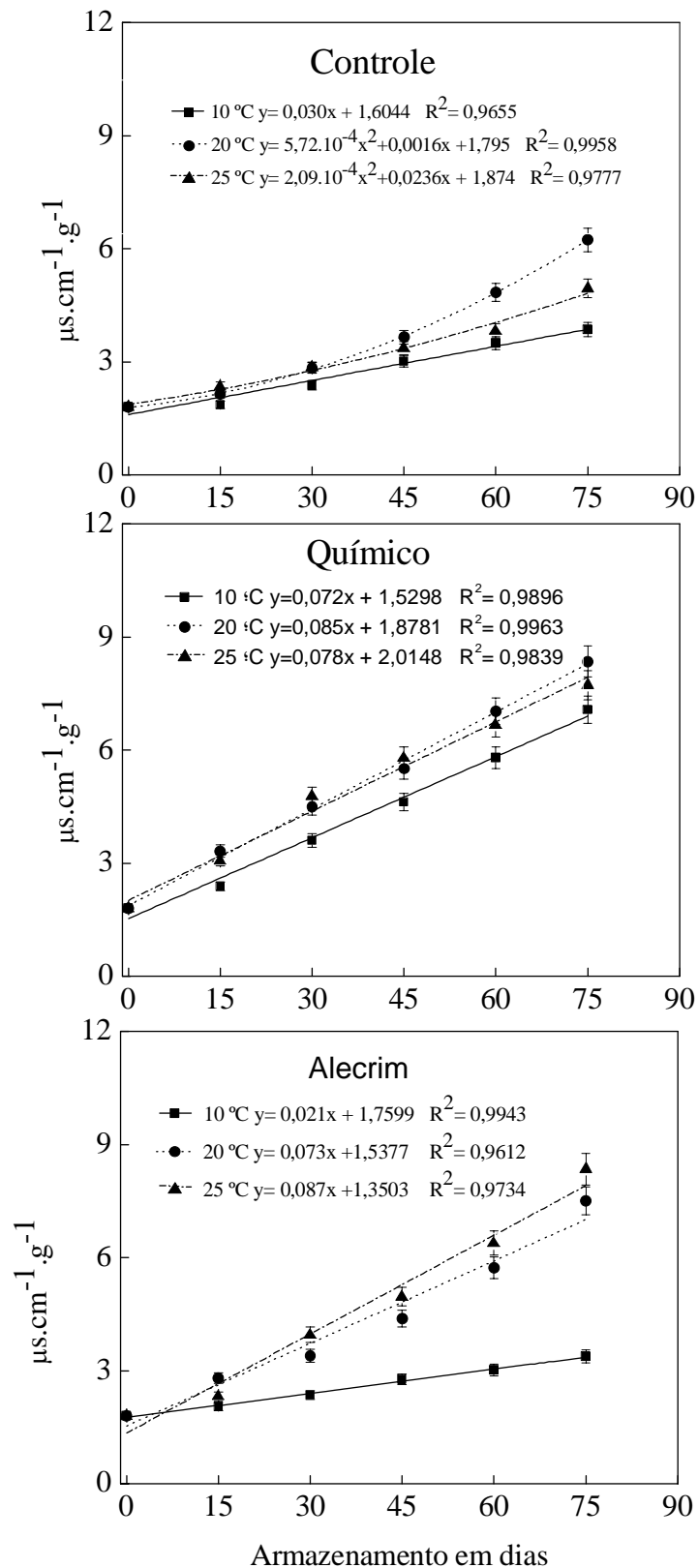


Figura 4. Condutividade elétrica das sementes de seringueira em função dos tratamentos de controle de fungos e das temperaturas de armazenamento. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), dentro de cada período avaliado.

Possivelmente o menor teor de umidade das sementes afetou de forma negativa a estrutura das membranas celulares, prejudicando sua viabilidade. Essa hipótese é reforçada pelos resultados observados nas avaliações de condutividade elétrica, onde as sementes armazenadas a 20 °C apresentaram valores de condutividade elétrica superiores às demais. A desestruturação das membranas celulares é considerada o primeiro passo da deterioração de sementes (DELOUCHE; BASKIN, 1973). A proporção de exsudados 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 ainda mais a deterioração das sementes (NASCIMENTO et al., 2010).

A proliferação de fungos também pode ter afetado negativamente a germinação das sementes não tratadas e das tratadas com alecrim, armazenadas em temperatura de 25°C aos 75 dias, período em que foi observada grande quantidade de fungos dos gêneros *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp e *Botritis* spp, além da presença de bactérias.

Com relação à matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) da parte aérea das plântulas, foi observado maior valor destas variáveis nas plântulas provenientes de sementes armazenadas a 10 °C, no controle e principalmente nas sementes tratadas com alecrim (Figura 5). Para as sementes tratadas com fungicidas químicos, foram observados valores de MF e MS semelhantes entre as temperaturas avaliadas.

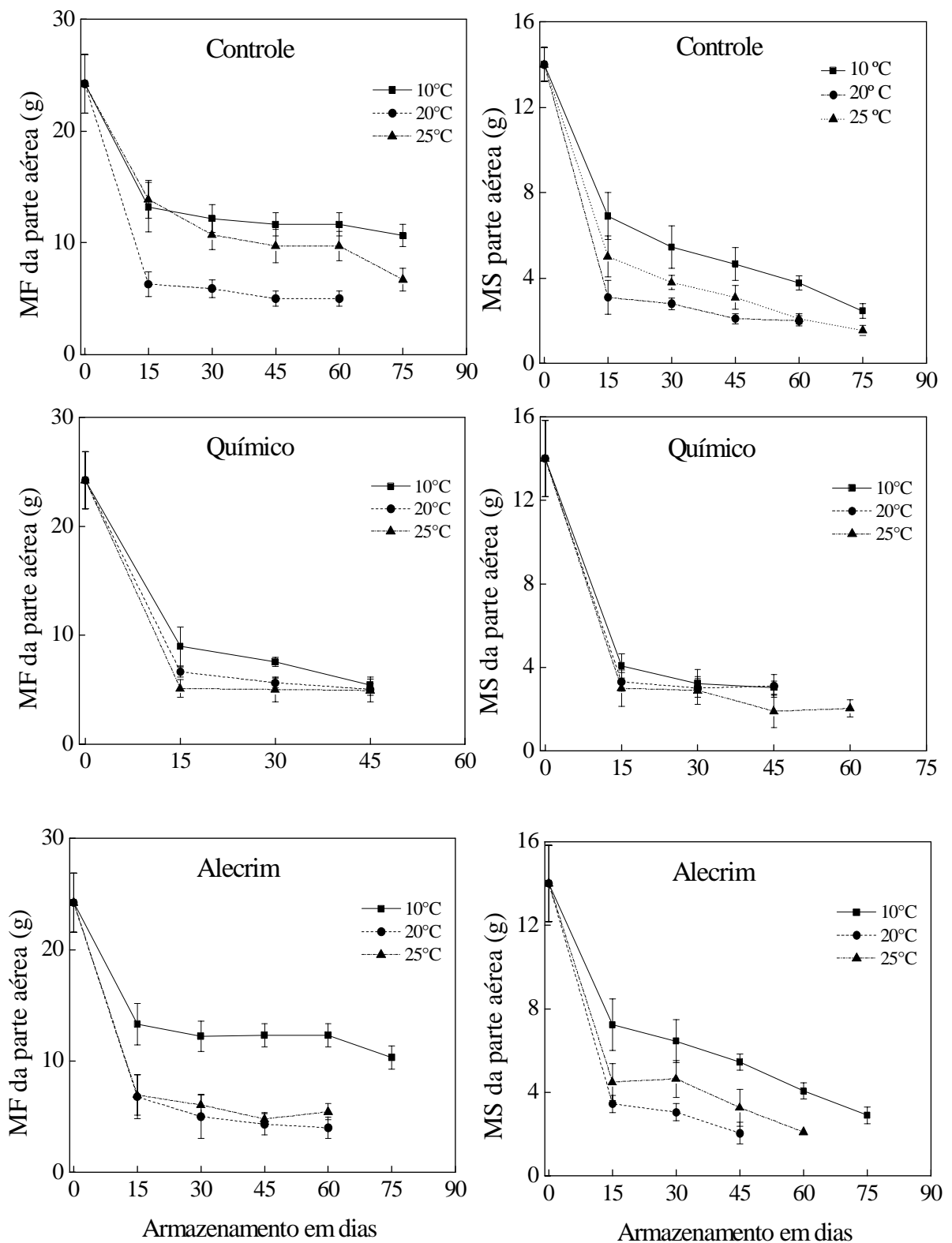


Figura 5. Variação na matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) da parte aérea de plântulas oriundas das sementes de seringueira em função dos tratamentos de controle de fungos e das temperaturas de armazenamento.

Os valores de matéria fresca (MF), quanto de matéria seca (MS), para parte aérea e raiz seguiram mesmo padrão dos apresentados pela parte aérea (Figura 6). Este comportamento demonstra maior vigor para sementes armazenadas a 10°C. O vigor das sementes pode ser associado ao desempenho de plântulas. Lotes de sementes de soja de alto vigor proporcionaram plântulas de maior comprimento em relação a lotes de baixo vigor (HENNING et al., 2010). No presente estudo, sementes com maiores valores de IVE originaram plântulas com maiores conteúdos de MF e MS.

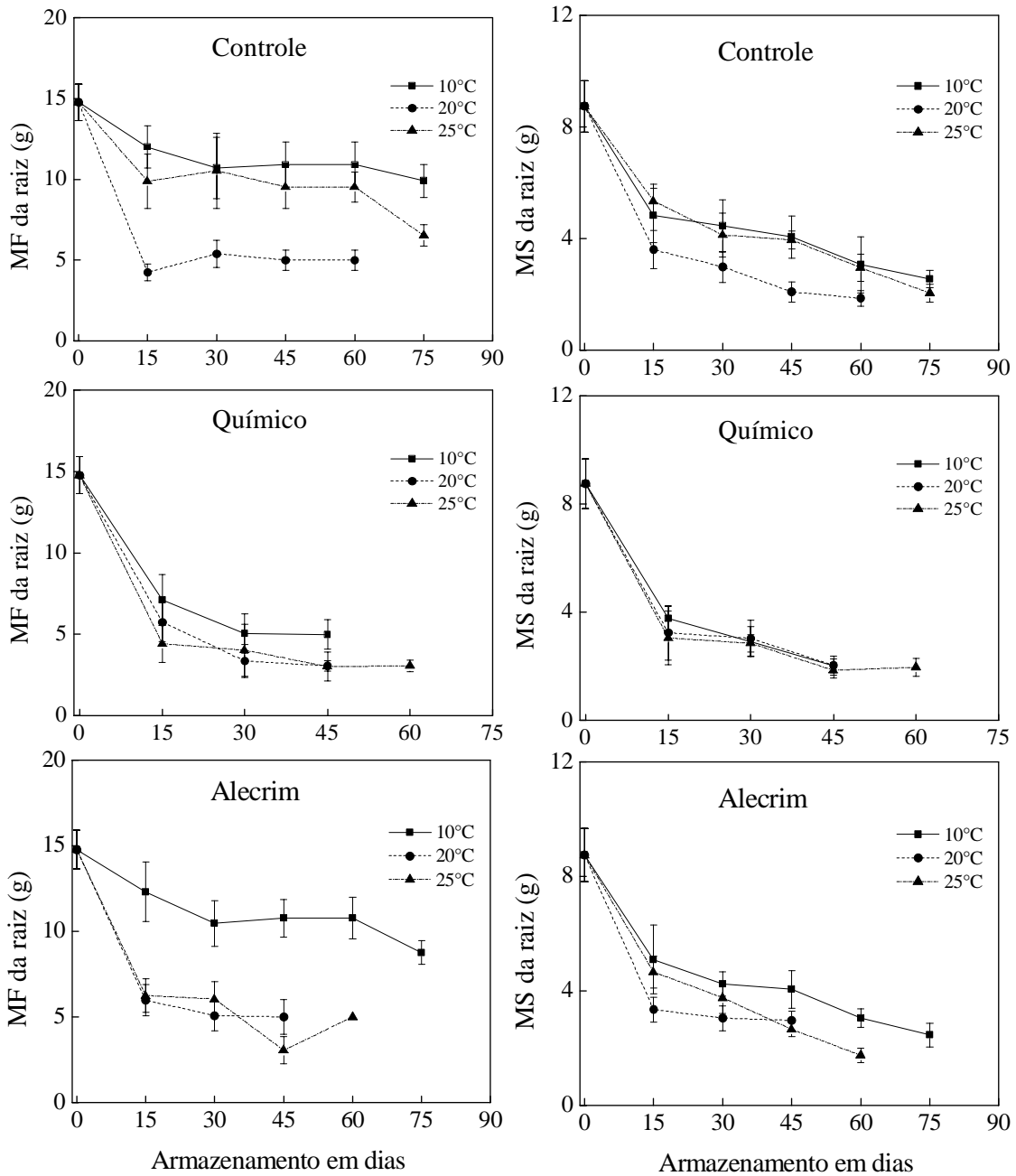


Figura 6. Variação na matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) da raiz de plântulas oriundas de sementes de seringueira em função dos tratamentos de controle de fungos e das temperaturas de armazenamento.

A peroxidação de lipídios foi analisada através conteúdo de malonaldeído (MDA) em embriões de sementes de seringueira. Foi possível observar aumento progressivo no conteúdo de MDA ao longo do armazenamento das sementes indicando aumento na peroxidação de lipídios. Foi possível verificar também que esse aumento foi menos intenso nas sementes armazenadas a 10 °C (Figura 7).

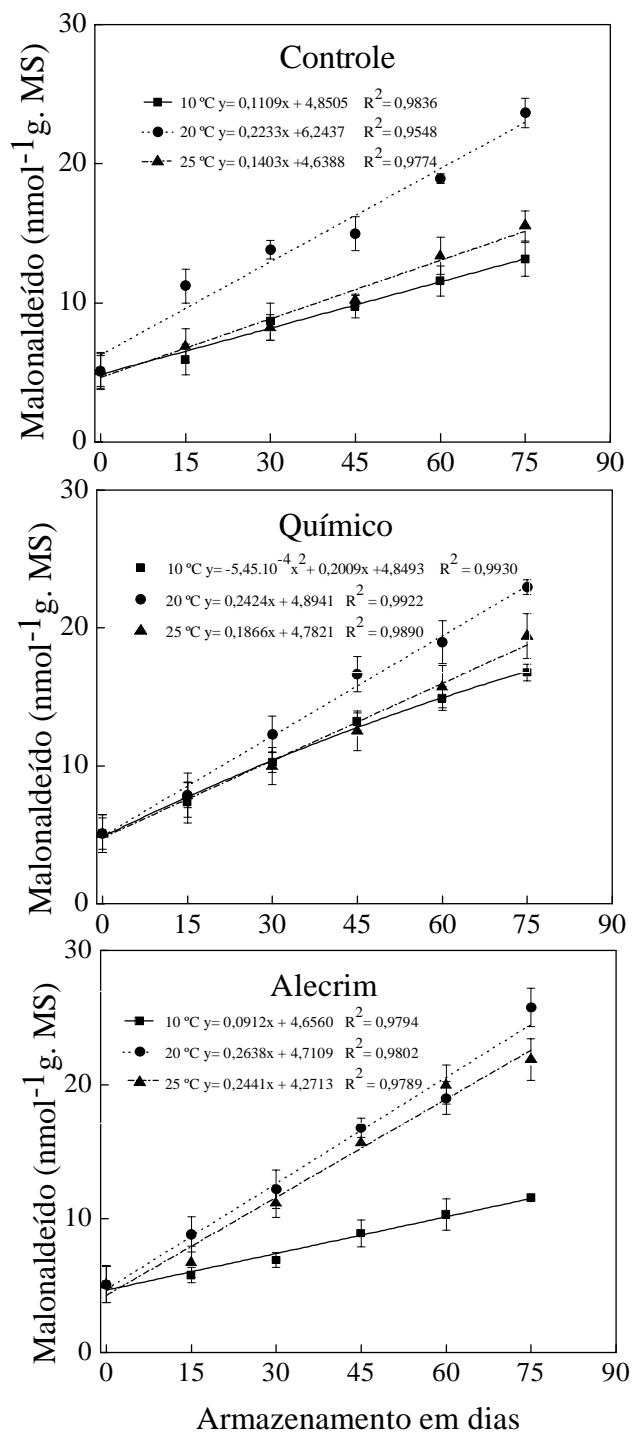


Figura 7. Conteúdo de MDA em embriões de sementes de seringueira em função dos tratamentos de controle de fungos e das temperaturas de armazenamento.

A perda de viabilidade das sementes ao longo do armazenamento pode ser associada também ao estresse oxidativo e ao acúmulo de seus produtos na célula. Além disso, no processo de deterioração o aumento na peroxidação de lipídios resulta em danos na membrana celular e do acréscimo de subprodutos tóxicos (SCHWEMBER; BRADFORD, 2010). A manutenção da viabilidade e do vigor das sementes armazenadas na temperatura de 10°C, pode estar relacionada à menor produção de MDA observada nestas sementes, que também apresentaram maior atividade enzimática se comparadas as das demais temperaturas (20°C e 25°C). A peroxidação lipídica e o acúmulo de MDA levam à desnaturação do DNA e afeta a tradução e a transcrição de novas proteínas, afetando o metabolismo normal da semente (POPOVIĆ et al., 2006). Quando estes tipos de danos ocorrem, a germinação e o vigor das sementes são afetados. Muitos estudos associam a produção de MDA com a perda da viabilidade das sementes (SHABAN 2013; TIAN et al., 2008), o que pode ter ocorrido no presente estudo, uma vez que a produção de MDA foi crescente ao longo dos 75 dias de armazenamento.

Ainda foi possível observar alterações na atividade das enzimas do estresse oxidativo ao longo de todo período de armazenamento. No entanto, foi observado que a atividade da CAT e SOD apresentou tendência de queda no final do armazenamento, ou seja, aos 60 e 75 DAR, com exceção das sementes não tratadas (controle) e armazenadas a 25°C (Figura 8).

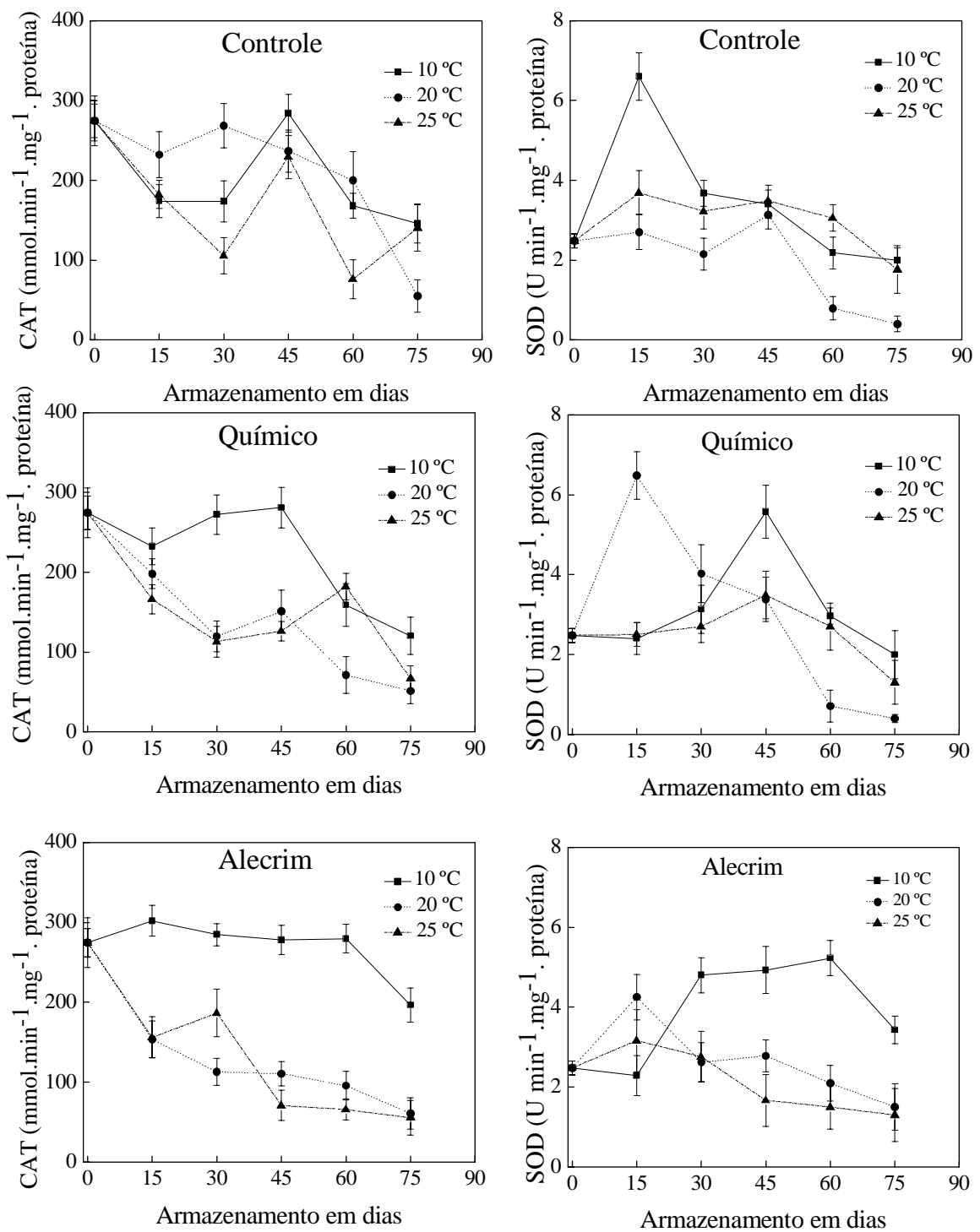


Figura 8. Atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em embriões de sementes de seringueira em função dos tratamentos de controle de fungos e das temperaturas de armazenamento.

Para a APX e POX, também foi observada variação na atividade com redução aos 60 e 75 DAR, em relação às sementes antes do armazenamento (época 0), com exceção das sementes armazenadas a 10°C e tratadas com alecrim, nas quais foi observado aumento na atividade da POX ao longo do armazenamento (Figura 9). Além disso, foi possível verificar maior atividade das enzimas para sementes armazenadas a 10°C, principalmente para sementes tratadas com produto químico e alecrim em relação à APX e a POX.

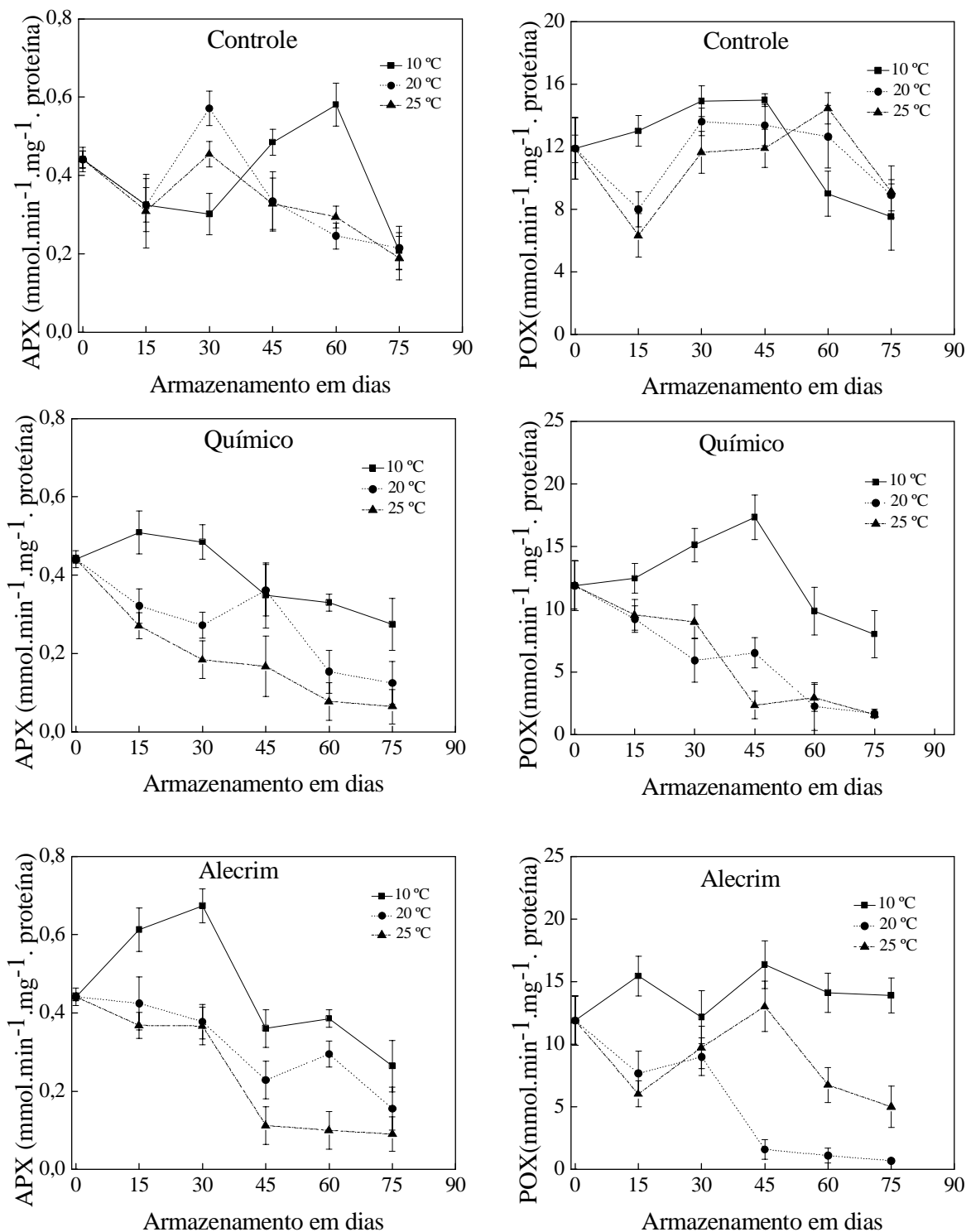


Figura 9. Atividade da ascorbato peroxidase (APX) e peroxidases (POX) em embriões de sementes de seringueira em função dos tratamentos de controle de fungos e das temperaturas de armazenamento.

A redução na atividade das enzimas avaliadas, a exceção da POX em sementes tratadas com alecrim e armazenadas a 10°C, observada neste estudo pode ser atribuída ao processo de deterioração que pode ter afetado negativamente a atividade enzimática.

A redução na atividade das enzimas do estresse oxidativo aumenta a sensibilidade das sementes ao estresse (BERJAK, 2006). A SOD, CAT e POX são enzimas que removem radicais livres e peróxidos, que são indicativos da deterioração, uma vez que estão envolvidos no metabolismo celular (TAVEIRA et al., 2012).

O decréscimo na atividade da CAT pode ser atribuído à inativação progressiva ou redução e paralisação de sua síntese (ATAÍDE et al., 2012; MARCOS FILHO, 2005), 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 redução na atividade da CAT na semente diminui a capacidade respiratória, que reduz o fornecimento de energia (ATP) e a redistribuição de reservas para a germinação da semente (DEMIRKAYA et al., 2010), o que poderia estar relacionado ao menor desenvolvimento das plântulas oriundas dos tratamentos com menor atividade dessa enzima. Resultados semelhantes quanto à redução na atividade da CAT foram obtidos em sementes de *Ginkgo biloba* armazenadas a 4°C, a atividade da CAT manteve-se estável no embrião e no endosperma em períodos inferiores a 12 meses de armazenamento, após este período, houve redução significativa. E quando armazenadas a 25°C a atividade de catalase foi reduzida em um menor período de armazenamento, aos seis meses (TOMMASI et al., 2006), mostrando uma relação da perda da atividade enzimática com a temperatura de armazenamento. Este mesmo comportamento foi observado em uma espécie ortodoxa, *Melanoxylon brauna*, no eixo embrionário e nos cotilédones durante o envelhecimento natural e artificial (ATAÍDE et al., 2012).

Redução na atividade de outras enzimas associadas com a redução do vigor também foram observadas em sementes de *Medicago sativa* (CAKMAK et al., 2010) e em *Triticum aestivum* (CHAUHAN et al., 2011; LEHNER et al., 2008). Em sementes de algodão, a atividade da peroxidase diminuiu após o armazenamento (VIEIRA et al., 2008). A redução na atividade dessas enzimas proporciona o acúmulo de produtos da oxidação que quando não é controlada favorece a formação contínua de moléculas menores, como o peróxido de hidrogênio, que facilmente se difundem através das membranas celulares. As mudanças estruturais associadas com a oxidação afetam a fluidez das membranas, a estrutura das proteínas e altera o DNA (WALTERS et al., 2010). Em sementes recalcitrantes, as altas taxas metabólicas estão ligadas ao reduzido tempo de vida dessas sementes, além de não possuírem os mecanismos intrínsecos responsáveis pela longevidade em sementes ortodoxas como a tolerância à dessecação proporcionada por LEA proteínas (WALTERS et al., 2010).

4.4. – CONCLUSÕES

A melhor condição para a conservação de sementes de seringueira com grau de umidade próximo a 31 % é a temperatura de 10 °C, sem tratamento fungicida.

A redução na atividade das enzimas antioxidantes está associada a perda de viabilidade das sementes.

A temperatura de 10 °C contribui para a menor peroxidação de lipídios.

4.5. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABREU, L.A.S.; CARVALHO, M.L.M., PINTO, C.A.G., KATAOKA, V.Y.; SILVA, T.T.A. Deterioration of sunflower seeds during storage. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, p.240-247, 2012.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.
- ATAÍDE, G. M.; FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogynenitens* Tull. durante o envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 1, p. 71-76, 2012.
- BAILLY, C.; BOGATEK-LESZCZYNSKA, R.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. **Seed Science Research**, v.12, n.1, p.47-55, 2002.
- BARBEDO, C.J., CENTENO, D.C.C., RIBEIRO, R.C.L.F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehe**, v. 40, p. 583-593, 2013.
- BARBEDO, C.J.; MARCOS-FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12: 145-164, 1998.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.
- BENG, A.B. Problems of rubber seed storage. In *Seed Technology in the Tropics*. Eds H.F. Chin, I.C. Enoch and R.M. Raja Harun. **Selangor: Universiti Pertanian Malaysia**. p. 117-122, 1976.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, v.16, p.1-15, 2006.
- 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.; BLACK, M. *Seeds: physiology of development and germination*. New York: **Plenum Press**, 445 p, 1994.
- BONOME, L.T.S.; OLIVEIRA, L.E.M.; GRACIANO, M.H.P.; MATTOS, J.O.S.; MESQUITA, A.C. Influência do tratamento fungicida e da temperatura sobre a qualidade fisiológica de sementes de seringueira durante o armazenamento. **Agrarian**, v.2, n.5, p.97-112, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 399p, 2009a.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes** / Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 200 p, 2009.
- CAKMAK, I.; ATICI, O.; AGAR, G.; SUNAR, S. Natural aging-related biochemical changes in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds stored for 42 years. **International Research Journal of Plant Science**, Sapele, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2010.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1995.
- CHAUHAN, D.S.; DESWAL, D.P.; DAHIYA, O.S.; PUNIA, R.C. Change in storage enzymes activities in natural and accelerated aged seed of wheat (*Triticum aestivum*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, Nova Delhi, v. 81, n. 11, p. 1037-1040, 2011.
- CHIN, H. F.; AZIZ, M.; ANG, B. B.; HANZAH, S. The effect of moisture and temperature on the ultrastructure and viability of seeds of *Hevea brasiliensis*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 9, n. 2, p. 411-422, 1981.
- CHIN, H.F. Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics. **Acta Horticulturae**, Bucarest. n.83, p.17-21. 1978.
- CÍCERO, S. M. Produção, coleta transporte e armazenamento de sementes de seringueira. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DA SERINGUEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO, 1., 1986, Piracicaba. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1986.p 133-138.
- DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.1023-1028, 1993.
- DELOUCHE, J. C.; BASIKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lost. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n. 2, p. 427-452, 1973.
- DEMIRKAYA, M.; DIETZ, K. J. H.; SIVRITEPE, O. Changes in antioxidant enzymes during ageing of onion seeds. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, v. 38, n. 1, p. 49-52, 2010.
- FERREIRA, D. F. Sisvar – Sistema de Análise de Variância. 2006.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.
- GOEL, A.; GOEL, A. K.; SHEORAN, I. S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. **Journal of plant Physiology**, Jena, v. 160, n. 9, p. 1093-1100, Sept. 2003.
- GRISI, P.U.; SANTOS, C.M. Influência do armazenamento, na germinação das sementes de girassol. **Horizonte Científico**, v.1, n.7, p.14-17, 2007.

- GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; MELO, P. A. F. R.; MOURA, S. S.S.; SILVA, R. S. Storage of *Tabebuia caraíba* (Mart.) Bureau seeds in different packaging and temperatures. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3, p. 433 - 440, 2012.
- HAMILTON, K.N.; OFFORD, C.A.; CUNEO, P.; DESEO, M.A. A comparative study of seed morphology in relation to desiccation tolerance and other physiological responses in 71 Eastern Australian rainforest species. **Plant Species Biology**, v. 28, p. 51-62, 2013.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.
- HENNING, F.A.; MERTZ, L.M.; JUNIOR, E.A.J.; MACHADO, R.D.; FISS, G.; ZIMMER, P.D. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p727-734, 2010.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.
- LEHNER, A.; MAMADOU, N.; POELS, P.; CÔME, D.; BAILLY, C.;CORBINEAU, F. Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. **Journal Cereal Science**, v.47, p.555-565, 2008.
- MAGUIRE, J.D. Seeds germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176, 1962.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 495 p, 2005.
- NASCIMENTO, W. M. O.; CICERO, S. M.; NOVEMBRE, A. D. L.C. Conservação de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 24-33, 2010.
- OLIVEIRA, C.F.; OLIVEIRA, D.C.; PARISI, J.J.D.; BARBEDO, C.J. Deterioração de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* em função da incidência e do controle de fungos. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, p. 520-532, 2011.
- PARISI, J.J.D.; BIAGI, J.D.; BARBEDO, C.J.; MEDINA, P.F. Viability of *Inga vera* Willd. subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. embryos according to the maturation stage, fungal incidence, chemical treatment and storage. **Journal of Seed Science**, v. 35, p. 70-76, 2013.
- PASQUINI, S.; MIZZAU, M.; PETRUSSA, E.; BRAIDOT, E.; PATUI, S.; GORIAN, F.; LAMBARDI, M.; VIANELLO, A. Seed storage in polyethylene bags of a recalcitrant species (*Quercus ilex*): analysis of some bio-energetic and oxidative parameters. **Acta Physiologia Plantarum**, v.34, p. 1963-1974, 2012.
- PAULA, N. F.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; PAULA, R. C. Alterações fisiológicas em sementes de seringueiras (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento. **Revista Brasileiras de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 326-333, abr. 1997.

- PEREIRA, J. P. Conservação da viabilidade do poder germinativo da semente de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 237-244, 1980.
- POPOVIĆ B. Uticaj γ - zračenja na antioksidantnisis temodabranihgenotipovasoje i pojava oksidativnogstresa. Doktorskadisertacija, Prirodno-matematičkifakultet, Departmanzahemiju, Novi Sad, 2006.
- RIBEIRO, M. F. Tecnologias para Manutenção da qualidade de sementes de café (coffea arabica L.) 56p. **Tese** (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, 2013.
- REIS, C.R.R.; PELACANI, C.R.; ANTUNES, C.G.C.; DANTAS, B.F.; DE CASTRO, R.D. Physiological quality of *Garcidia sepium*(Jacq.) Steud. (Leguminosae - Papilionoideae) seeds subjected to different storage conditions. **Revista Árvore** , v. 36, p. 229-235, 2012.
- SCHWEMBER, A.; BRADFORD, K. J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n.15, p.4423-4436, 2010.
- SERSHEN, V. E. B.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Cryo-tolerance of zygotic embryos from recalcitrant seeds in relation to oxidative stress – a case study on two amaryllid species. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 999-1011, 2012a.
- SERSHEN, V.E.B.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. ; WESLEY- SMITH, J. Rate of dehydration, state of subcellular organisation and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. **Protoplasma**, v. 249, p.171-186, 2012b.
- SHABAN, M. Review on physiological aspects of seed deterioration. **International Journal Agricult Crops Science**, v. 6, n. 11, p. 627-631, 2013 .
- TAVEIRA, J. H. S.; ROSA, S. D. V. F.; BORÉM, F. M.; GIOMO, G. S.; SAATH, R. Perfis protéicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.10, p.1511-1517, 2012.
- TIAN. X; SONG, S.; LEI Y. Cell death and reactive oxigen species metabolism during accelerate dageing of soybean axes. Russ. **Journal of Plant Physiologist**, v. 55, n.1, p. 33-40, 2008.
- TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; PINTO, M.C.; GARA, L.D. Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p.359-368, 2006.
- VIEIRA, R.D.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B.; BRUENNING, W.P.; PANOBIANCO, M.. Temperature during soybean seed storage and the amount of electrolytes of soaked seeds solution. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.65, n.5, p.496- 501, 2008.
- WALTERS, C.T.; BALLESTEROS, D.; VERTUCCI, V. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. **Plant Science**, v.179, p.565-573, 2010.

CAPÍTULO 5

ALTERAÇÕES NOS COMPOSTOS DE RESERVA EM SEMENTES DE SERINGUEIRA DURANTE O ARMAZENAMENTO

RESUMO

SOUZA, Genaina Aparecida de. Universidade Federal de Viçosa, July 2014. **Alterações nos compostos de reserva em sementes de seringueira durante o armazenamento.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

O objetivo do estudo foi avaliar e descrever as alterações nos compostos de reserva das sementes de seringueira durante o armazenamento sob diferentes condições de temperatura. O experimento foi conduzido nos Laboratório de Análise Sementes, Laboratório de Sementes florestais e Laboratório de Anatomia da universidade Federal de Viçosa. As sementes foram submetidas a três tratamentos: fungicidas Tecto 600 (35/100Kg sementes) e Captan 50 (75g/100kg sementes); Alecrim moído (20g/Kg); e sementes sem tratamento (controle). Além disso, foram armazenadas em diferentes temperaturas (10 °C, 20 °C e 25 °C) e a cada 15 dias, retiravam-se amostras para avaliações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas. Os teores dos compostos de reserva nas sementes de seringueiras decresceram ao longo do armazenamento. As sementes armazenadas a 10 °C sem tratamento fungicida ou tratadas com alecrim, assim como as sementes armazenadas a 25 °C sem tratamento, foram as únicas que apresentaram germinação ao final de 75 dias de armazenamento. As avaliações bioquímicas e fisiológicas comprovaram que as mesmas, apresentavam também, maiores teores de compostos de reserva (amido, açúcares solúveis totais, proteínas solúveis totais e lipídeos), neste período. As avaliações anatômicas reafirmaram os resultados encontrados nas avaliações bioquímicas e fisiológicas. As sementes que apresentaram germinação ao final de 75 dias de armazenamento apresentaram também, características anatômicas mais próximas daquelas sementes recém-colhidas. Já as sementes armazenadas a 20 °C apresentaram maior degradação dos compostos de reserva e menor período de viabilidade. Foi possível notar efeito negativo dos tratamentos químicos sobre a manutenção das reservas e da viabilidade das sementes. E as sementes com maiores teores de compostos de reserva originaram plântulas mais vigorosas, indicando uma relação direta entre os compostos de reserva, o vigor das sementes e o estabelecimento inicial de plântulas. Portanto conclui-se que os teores de compostos de reservas das sementes de seringueira decrescem ao longo do armazenamento e que as sementes que germinam após período de armazenamento são aquelas que apresentam características fisiológicas e anatômicas mais próximas das sementes recém-colhidas.

Palavras chave: Compostos de reserva, anatomia, crescimento de plântulas

ABSTRACT

SOUZA, Genaina Aparecida de. Universidade Federal de Viçosa, July 2014. **alterations in the reserve compounds in rubber tree seeds during the storage..** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

The objective of this study was to evaluate and describe the alterations in the reserve compounds of rubber tree seeds during the storage under different conditions of temperature. The experiment was conducted at Analyze Seeds Laboratory, Forest Seeds Laboratory and Anatomic Analyzes Laboratory, at Universidade Federal de Viçosa. The seeds were obtained from the CautexFlorestal- SP company, in March 2013 and separated in three lots for treatment against microorganisms with fungicide Tecto 600 (35/100Kg seeds) and Captan 50 (75g/100kg seeds); with ground rosemary (20g/Kg), and seeds without treatment (control). Samples of 600g were conditioned in kraftpaper that were placed inside polyethylene bags, sealed and perforated. After stored under temperatures of 10°C, 20°C and 25°C were removed samples for biochemical, physiological and anatomical evaluations by each 15 days. The contents of the reserve compounds in rubber tree seeds decreased during the period of storage. Seeds stored at 10°C without treatment to control microorganism, or treated with ground rosemary, as well as those stored at 25°C without treatments, were the only one which presented germination at the end of 75 days of storage. The biochemical and physiological evaluations, proved that these seeds presented also, higher contents of reserve compounds (starch, sugars, total soluble sugars, soluble proteins and lipids) in this period. The anatomical evaluations reaffirmed the results founded in the biochemical and physiological evaluations. Seeds which presented germination at the end of 75 days of storage presented also, anatomical characteristics closer to those recently harvested seeds. Already the seeds stored at 20°C presented higher degradation of the reserve compounds and shorter period of viability. Seeds with higher contents of reserve compounds resulted in seedlings more vigorous, indicating a close relation between the reserve compounds and the vigor of seeds and the initial establishment of seeds. Therefore it is concluded that the reserve compounds of rubber tree seeds decrease during the period of storage and there is a dependence between these compounds, the viability of seeds and the seedlings vigor. It is concluded also that the better condition of storage for rubber tree seeds used in this study is the temperature of 10°C.

Key-words: Reserve compounds, anatomy, seedlings growth.

5.1. – INTRODUÇÃO

Algumas sementes podem ser armazenadas por décadas, mas, eventualmente, todas as sementes perdem sua viabilidade com o tempo. A longevidade das sementes é determinada pelo seu grau de umidade, pelas condições de temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento e pelas suas características genéticas. A morte das sementes então é inevitável e leva a perguntas sobre quando e como a deterioração ocorre (WALTERS et al., 2010). Para responder essas perguntas é necessário avaliar as alterações bioquímicas e anatômicas que ocorrem nas sementes durante seu armazenamento.

Sementes do gênero *Hevea* foram caracterizadas com comportamento recalcitrante por Kidd (1914), Sementes recalcitrantes germinam imediatamente após a dispersão (SUKESH; CHANDRASHEKAR, 2011), devido ao seu elevado grau de umidade, pois não passam pela fase de dessecação ao final do processo de maturação. Apresentam assim, sensibilidade a secagem e são armazenadas com alto grau de umidade, o que impede que essas sementes sejam armazenadas a baixas temperaturas, resultando em redução no tempo de armazenamento. Isso fica evidente quando seu comportamento é comparado com o de sementes ortodoxas, como a *Arabidopsis thaliana*, que sofrem dessecação na fase final da maturação (FAIT et al., 2006), sugerindo uma diminuição nas taxas metabólicas como preparação para um longo período de armazenamento. Espécies de sementes recalcitrantes como de *Inga vera*, modificam seu metabolismo visando aumentar a eficiência da respiração e produção de energia até que sejam dispersas (CACCERE et al., 2013). Essas modificações no sentido de aumentar a eficiência metabólica provocam alterações nos compostos de reserva e, possivelmente, na estrutura celular das sementes durante o armazenamento, dificultando sua conservação independente da forma de armazenamento.

Algumas pesquisas associam o dobramento da parede celular, o conteúdo de organelas e a baixa vacuolização em tecidos vegetativos, com sementes ortodoxas que podem ser armazenadas por longos períodos sem comprometer severamente sua viabilidade e vigor (MOURA et al., 2010). Em sementes recalcitrantes, essas adaptações anatômicas são prejudicadas e quando aliadas as suas exigências de alto teor de água e temperatura mais elevada durante o armazenamento, comprometem sua longevidade. Essas características favorecem a ocorrência de altas taxas respiratórias que degradam seus compostos de reserva como lipídios, proteínas e amido. Podendo comprometer as

membranas celulares e a estrutura celular, ocasionando reduções drásticas na viabilidade das sementes durante o armazenamento.

Estudos realizados com sementes ortodoxas mostram reduções no teor de amido, proteínas e açúcares solúveis, os quais foram associados a menor germinação e vigor em sementes de soja armazenadas (HENNING et al., 2010). Reduções nos teores lipídicos, bem como aumento na peroxidação deste componente, foram observados em sementes de girassol durante o armazenamento (ABREU et al., 2012). A degradação química de compostos de reserva da semente durante o armazenamento ocorre através de danos causados por agentes oxidantes, e as velocidades de tais reações estão associadas à características da própria semente. Estas são afetadas por temperatura, bem como pelo grau de umidade da semente (WALTERS et al., 2010).

A maior parte dos estudos sobre os componentes de reserva de sementes se relaciona a grupos extremamente restritos de espécies vegetais de importância agrônômica (BUCKERIDGE et al., 2004). Informações sobre sementes de espécies nativas das florestas tropicais são importantes para auxiliar, por exemplo, a produção de mudas de alta qualidade para a recuperação de áreas que foram degradadas por atividades agrícolas e industriais (BUCKERIDGE et al., 2004). Em sementes de seringueira foi observado redução nos teores de amido, proteína e lipídios ao longo do armazenamento (BONOME et al., 2009), assim como em sementes de araucária (GARCIA, 2012), ambas recalcitrantes. No entanto, estudos que abordem alterações nos compostos de reserva de sementes recalcitrantes são ainda pouco expressivos. A grande maioria se restringe ao comportamento das sementes durante o armazenamento, envolvendo avaliações de germinação e vigor, em associação as análises quantitativas, sendo pouco exploradas as alterações histoquímicas, estruturais e nos compostos de reserva. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações nos compostos de reserva em sementes de seringueira durante o armazenamento, através de análises bioquímicas, histoquímicas e estruturais.

5.2. – MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Anatomia Vegetal e Laboratório de Pós-colheita da Universidade Federal de Viçosa. As sementes foram obtidas na empresa Cautex Florestal-SP, no mês de março de 2013. As sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos:

1. Químico: com os fungicidas Tecto 600 (35/100 kg sementes) e Captan 50 (70g/100 kg sementes), metade da dosagem utilizada por Bonome et al. (2009).
2. Alecrim moído (20g/Kg sementes), segundo recomendações de Ribeiro (2013).
3. Controle: sementes sem tratamento

Para cada tratamento, foram utilizadas, amostras de 600g de sementes que foram acondicionadas em sacos de papel Kraft colocados dentro de sacos de polietileno, lacrados e perfurados para permitir o fluxo de oxigênio dentro da embalagem, como recomendado por Pereira (1980).

Em seguida, as sementes de cada tratamento foram armazenadas nas seguintes condições de ambiente: câmara fria a 10°C, com 60 % de umidade relativa; laboratório a 20°C (± 2), com umidade relativa em torno de 35 % e condições de ambiente 25°C (± 3), sem controle de umidade relativa.

A cada 15 dias, durante 75 dias, foram retiradas amostras para a realização das seguintes avaliações:

Determinação do teor de água das sementes: por meio do método de estufa a 105°C ± 3 °C, por 24 horas (BRASIL, 2009a). Os resultados foram expressos em porcentagem.

Os testes de emergência de plântulas foram realizados em casa de vegetação com quatro repetições de 25 sementes, semeadas a 1,0 cm de profundidade em bandejas contendo areia umedecida quando necessário. Foram consideradas emergidas as plântulas que no décimo quinto dia após a semeadura era possível visualizar a parte aérea.

Os extratos brutos para as determinações de amido, açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR), foram obtidos através da pesagem de cerca de 1,0 g de material vegetal moídos em nitrogênio líquido e o extrato obtido a partir de 10mL de etanol 80% aquecido (60-70°C), após centrifugados a 2.000 xg por 10 minutos, etapa repetida três vezes. O sobrenadante foi retirado para a quantificação de AST e AR. O

“pellet” foi seco para posterior quantificação de amido pelo método proposto por McCready et al. (1950).

Determinação de amido foi feita como proposto McCready et al. (1950), 2,5 mL de água deionizada e 3,25mL de ácido perclórico 52% foram adicionados ao pellet permanecendo sob descanso por 30 min. A mistura foi centrifugada durante 15 min a 2.000 xg, sendo o sobrenadante recolhido para quantificação de amido. Uma alíquota de 250 µL do extrato, 250 µL de fenol 5%, e 1,25 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado foram colocadas em tubo de ensaio, os quais foram levados para banho-maria a 30 °C, por 20 min. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm.

Para a determinação de AR, foi utilizado o método de Somogy-Nelson (1944), utilizando o extrato bruto reservado. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. A determinação AST foi realizada pelo método Fenol-Sulfúrico proposto por Dubois et al. (1956). Colocou-se em um tubo de ensaio uma alíquota de 250 µL do extrato reservado com 250 µL de fenol 5% e adicionou-se à mistura 1,25 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado e então os tubos foram colocados em banho-maria a 30°C por 20 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm.

Para a determinação de proteínas totais, utilizou-se 0,3g de material vegetal, maceradas e adicionados a 2mL de meio de homogeneização, tampão fosfato de potássio 0,1M, pH6,8, ácido etileno diaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (PEIXOTO et al., 1999), seguido de centrifugação a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C. A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método proposto por Bradford (1976), com 100 µL de extrato juntamente com 1 mL de reagente de Bradford. Após 20 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

Quanto a quantificação de lipídios, amostras de 1 grama de embrião liofilizado foram colocados em cartuchos de papel, em soxhlet, sendo mantidas em refluxo, com hexano, por 24 horas. Ao final desse tempo, os cartuchos foram retirados, secos em estufas a 70 °C e pesados. A diferença entre o peso inicial e final representa o teor de lipídio da amostra.

Para as análises de anatomia de luz, o material foi fixado em FAA₅₀ (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50%, na proporção de 5:5:90, v:v:v) por 48 horas, e estocado em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). As amostras foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin – Leica) de acordo com

as recomendações do fabricante. O material emblocado foi seccionado, transversal e longitudinalmente, em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica) com 5 µm de espessura, corado com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964) para metacromasia e montado sob lamínula com resina sintética (Permount®). Foram utilizados os testes histoquímicos para a identificação in situ dos compostos de reserva no material incluído em resina: reagente de Lugol (JOHANSEN, 1940) para amido e xilydine Ponceau (VIDAL, 1970) para proteína. Para a detecção de lipídios, o material fixado foi seccionado em criomicrotomo com 40 µm de espessura e submetido ao teste Sudan Black B. As imagens estruturais e histoquímicas foram realizadas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss Axio CamHRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Cinco sementes foram coletadas a cada período e fixadas em Karnovisk's modificado, pH 7,2 por 24 horas. Em seguida, foram transferidas para um líquido crioprotetor (glicerol 30%), por 30 minutos e cortados transversalmente em nitrogênio líquido. As secções obtidas foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora e após desidratadas em uma série de acetona (30, 50, 70 e 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, stubs, com a ajuda de uma fita de carbono colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 90 XVP.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições, em esquema fatorial (3x3x5), sendo três ambientes de armazenamento (10, 20 e 25°C), três tratamentos de sementes (controle, químico, alecrim), cinco épocas de avaliação. As análises dos dados foram realizadas pelo sistema de Análise de Variância, SISVAR, (FERREIRA, 2008). As médias obtidas para os tratamentos de sementes e ambientes de armazenamento foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Os dados referentes às épocas de armazenamento foram submetidos à análise de regressão.

5.3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação tripla entre os fatores tratamento para controle de microrganismos, temperatura e período de armazenamento, para as variáveis emergência, teor de amido e de AST. Para os teores de proteína e de lipídios, houve interação somente entre temperatura e período de armazenamento, e entre temperatura e tratamentos. Para os AR, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

A taxa de emergência de plântulas de seringueira ao longo do armazenamento decresceu, apresentando germinação somente até os 75 DAR (dias de armazenamento). Para as sementes armazenadas a 10°C, não houve diferença significativa ($P < 0,05\%$) entre emergência de plântulas de sementes tratadas com alecrim ou controle (37% e 35% respectivamente), aos 75 DAR. Para as sementes armazenadas a 20°C, foi possível observar maior perda de viabilidade, independente dos tratamentos, apresentando emergência somente até aos 60 DAR. Para as sementes armazenadas a 25°C, somente as sementes do tratamento controle apresentou emergência aos 75 DAR (20%). (Tabela 1).

TABELA 1. Valores médios da emergência de plântulas de sementes de seringueira submetidas a diferentes tratamentos, desdobradas dentro de cada temperatura de armazenamento

| Temp °C | Tratamento | Armazenamento em dias | | | | |
|---------|------------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 |
| 10 | C | 80,0 a | 77,5 a | 75,0 b | 47,5 a | 35,0 a |
| 10 | Q | 30,0 b | 27,5 b | 10,0 c | 5,0 b | 0,0 b |
| 10 | A | 82,5 a | 87,5 a | 87,5 a | 52,5 a | 37,5 a |
| 20 | C | 50,0 a | 45,0 a | 40,0 a | 22,5 a | 0,0 a |
| 20 | Q | 25,0 b | 20,0 b | 12,5 c | 0,0 b | 0,0 a |
| 20 | A | 27,5 b | 35,0 a | 27,5 b | 0,0 b | 0,0 a |
| 25 | C | 85,0 a | 82,5 a | 72,5 a | 45,0 a | 20,0 a |
| 25 | Q | 27,5 b | 15,0 c | 12,5 b | 0,0 c | 0,0 b |
| 25 | A | 75,0 a | 65,0 b | 17,5 b | 20,0 b | 0,0 b |

Médias seguidas de letras diferentes, em cada tratamento e período de armazenamento, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey. C= tratamento controle; Q= tratamento químico; A= tratamento com alecrim.

A manutenção da viabilidade das sementes durante o armazenamento é geralmente atribuída à sua composição química, principalmente com relação à quantidade de reservas ou à deficiência no metabolismo (HAMPTON, 1973). Foi possível observar que as sementes que apresentaram maior porcentagem de emergência e emergiram após 75 dias de armazenamento (Tabela 1), foram aquelas com maior teor de

compostos de reserva (armazenadas a 10 °C e a 25 °C). Alterações nos compostos de reserva de sementes armazenadas são normais, uma vez que as sementes continuam com metabolismo ativo. Com relação às sementes de seringueira que devem ser armazenadas com alto teor de umidade devido à recalcitrância, o metabolismo acentuado propicia a degradação destes compostos de forma mais rápida contribuindo com a perda da viabilidade.

Os teores de amido no endosperma das sementes decresceram com o decorrer do armazenamento, independente dos tratamentos ou temperaturas em que foram armazenadas (Figura 1). As sementes do controle e do tratamento químico armazenadas a 10 °C e 25 °C apresentaram conteúdo de amido significativamente superior ($P < 0,05$) àquelas armazenadas em 20 °C, aos 75 dias após o armazenamento (DAR). Já nas sementes tratadas com alecrim, o teor de amido foi maior quando armazenadas a 10 °C, a partir dos 45 DAR (Tabela 2).

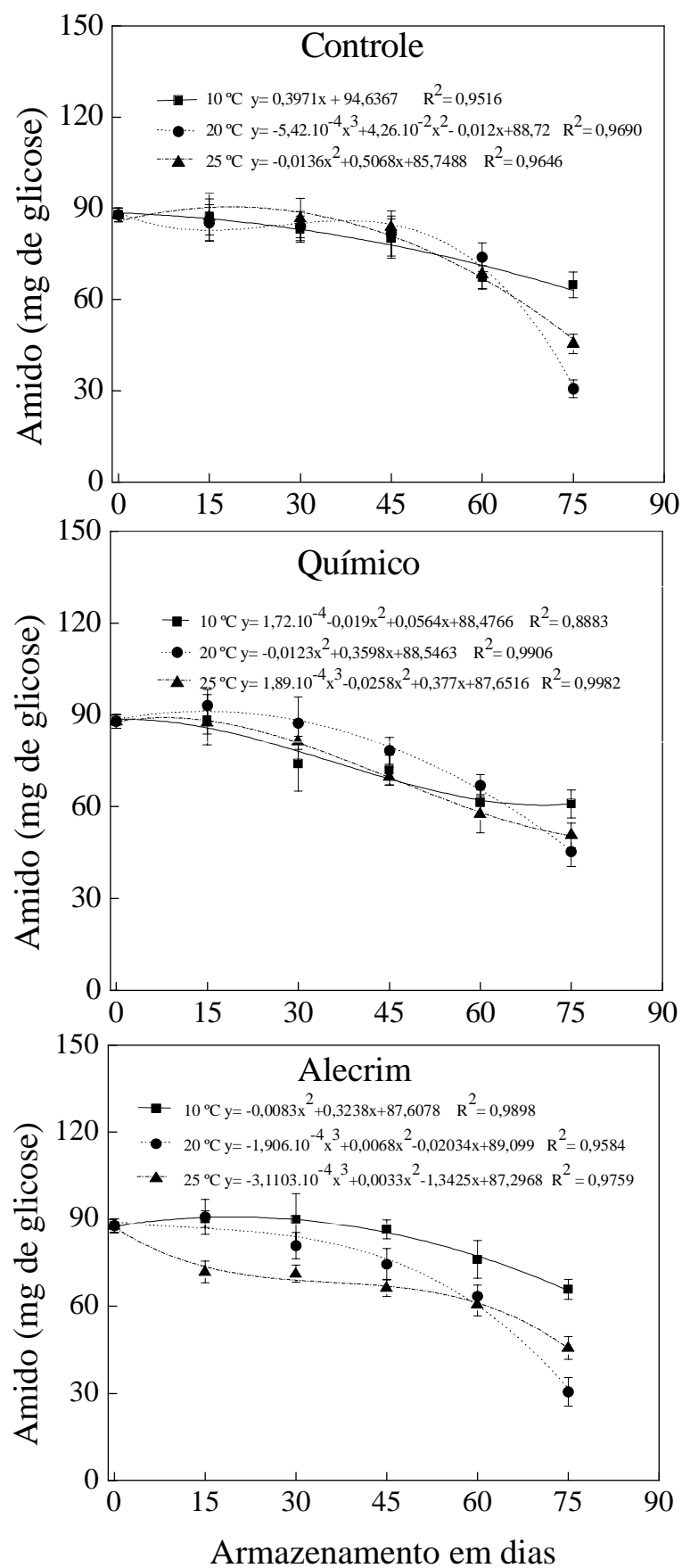


Figura 1. Teor de amido no endosperma de sementes de seringueira com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes temperaturas.

TABELA 2. Resultados médios do teor de amido (em mg de glicose), no endosperma de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento

| Tratamento | Temp °C | Armazenamento em dias | | | | | |
|------------|---------|-----------------------|--------|---------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 |
| C | 10 | 87,8 a | 87,3 a | 83,1 a | 80,0 a | 67,2 a | 64,8 a |
| C | 20 | 87,8 a | 85,3 a | 84,2 a | 81,8 a | 74,0 a | 30,7 b |
| C | 25 | 87,8 a | 87,3 a | 86,8 a | 83,9 a | 68,4 a | 45,5 a |
| Q | 10 | 87,8 a | 88,3 a | 74,1 b | 72,0 a | 61,4 a | 61,0 a |
| Q | 20 | 87,8 a | 93,0 a | 87,3 a | 78,3 a | 67,0 a | 45,4 b |
| Q | 25 | 87,8 a | 87,6 a | 81,3 ab | 69,9 a | 57,7 a | 50,8 a |
| A | 10 | 87,8 a | 90,0 a | 90,0 a | 86,5 a | 76,2 a | 65,8 a |
| A | 20 | 87,8 a | 90,8 a | 80,9 ab | 74,6 b | 63,5 b | 30,6 c |
| A | 25 | 87,8 a | 71,8 b | 71,2 b | 66,4 b | 60,7 b | 45,7 b |

Médias seguidas de letras diferentes, em cada tratamento e período de armazenamento, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey. C= tratamento controle; Q= tratamento químico; A= tratamento com alecrim.

O teor de amido no embrião também decresceu independente da condição de armazenamento das sementes (Figura 2). As sementes sem tratamento (controle) e as tratadas com fungicidas químicos, armazenadas a 10°C ou 25°C, apresentaram conteúdo de amido no embrião significativamente superior ($P < 0,05$) àquelas armazenadas a 20°C, aos 75 DAR (Tabela 3). Nas sementes tratadas com alecrim foi possível observar maior teor de amido quando armazenadas a 10 °C, a partir dos 15 DAR o que foi mantido até o final do período experimental.

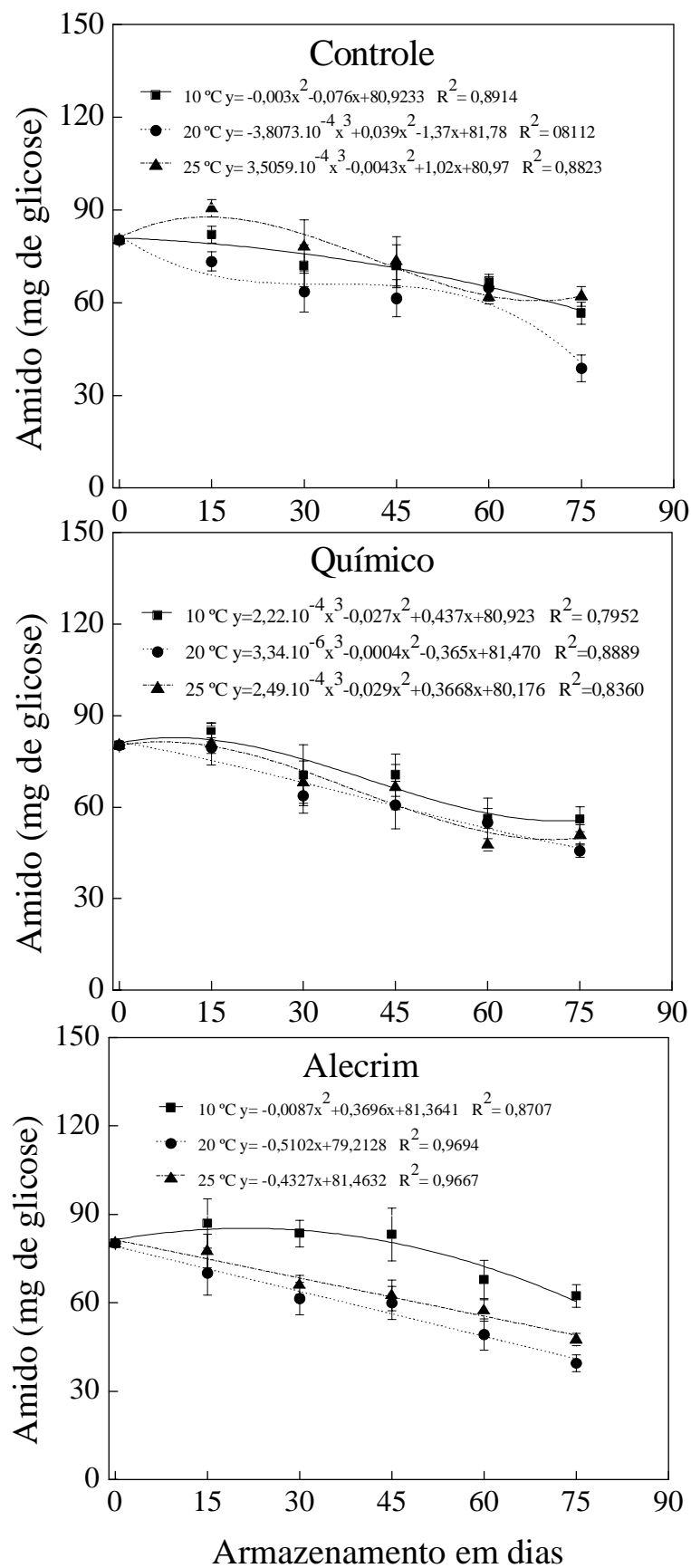


Figura 2. Teor de amido no embrião de sementes de seringueira com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes temperaturas.

TABELA 3: Resultados médios do teor de amido (em mg de glicose), em embriões de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento.

| Tratamento | T °C | Armazenamento em dias | | | | | |
|------------|------|-----------------------|--------|--------|---------|---------|--------|
| | | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 |
| C | 10 | 80,2 a | 82,0 b | 72,0 a | 71,8 a | 66,7 a | 56,6 a |
| C | 20 | 80,2 a | 73,3 c | 63,6 b | 61,4 b | 64,8 a | 38,8 b |
| C | 25 | 80,2 a | 90,5 a | 78,1 a | 73,4 a | 61,9 a | 62,0 a |
| Q | 10 | 80,2 a | 85,1 a | 70,5 a | 70,5 a | 56,2 a | 56,0 a |
| Q | 20 | 80,2 a | 89,9 a | 63,8 a | 60,7 b | 54,9 ab | 45,8 b |
| Q | 25 | 80,2 a | 80,8 a | 68,2 a | 66,5 ab | 47,7 b | 50,9 a |
| A | 10 | 80,2 a | 86,9 a | 83,6 a | 83,2 a | 67,9 a | 62,4 a |
| A | 20 | 80,2 a | 70,1 b | 61,5 b | 60,0 b | 49,2 c | 39,5 c |
| A | 25 | 80,2 a | 77,5 b | 66,1 b | 62,5 b | 57,5 b | 47,6 b |

Médias seguidas de letras diferentes, em cada tratamento e período de armazenamento, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey. C= tratamento controle; Q= tratamento químico; A= tratamento com alecrim.

Os açúcares solúveis totais (AST) nas sementes também decaíram ao longo do armazenamento (Figura 3). Foi possível observar que a temperatura de 10 °C foi mais eficiente em manter os teores de AST significativamente superiores às demais temperaturas, durante todo período avaliado e independente dos tratamentos (Tabela 4).

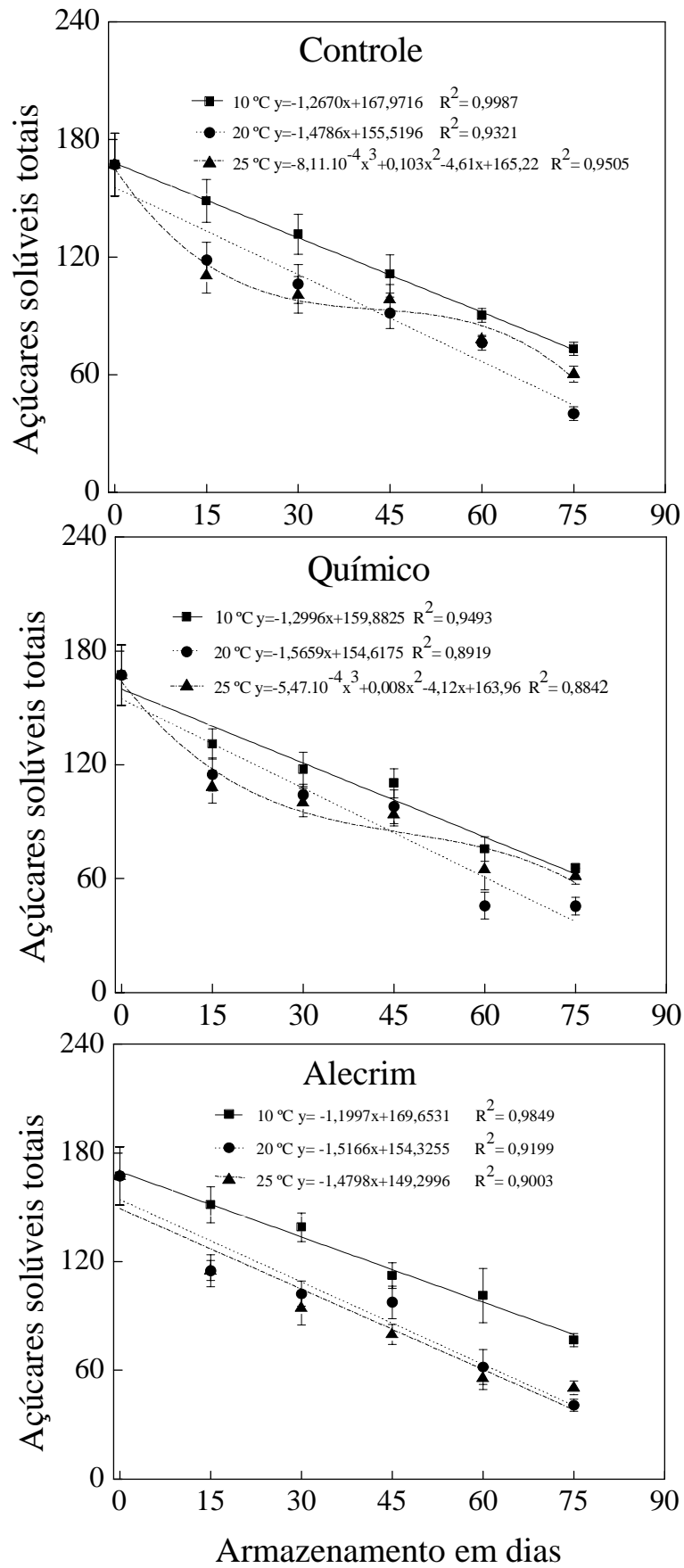


Figura 3. Açúcares solúveis totais (AST) em sementes de seringueira com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes.

TABELA 4. Resultados médios do teor de açúcares solúveis totais (AST) de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento

| Tratamento | T °C | Armazenamento em dias | | | | | |
|------------|------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|--------|
| | | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 |
| C | 10 | 167,2 a | 148,7 a | 131,7 a | 111,5 a | 90,3 a | 73,3 a |
| C | 20 | 167,2 a | 118,6 b | 106,3 b | 91,6 b | 76,4 b | 40,3 b |
| C | 25 | 167,2 a | 110,8 b | 100,8 b | 98,4 b | 78,0 ab | 60,4 a |
| Q | 10 | 167,2 a | 130,9 a | 117,5 a | 110,2 a | 75,2 a | 65,4 a |
| Q | 20 | 167,2 a | 114,8 b | 104,2 b | 97,8 ab | 45,8 b | 45,5 b |
| Q | 25 | 167,2 a | 108,4 b | 100,0 b | 93,7 b | 64,9 a | 61,4 a |
| A | 10 | 167,2 a | 151,4 a | 139,1 a | 112,3 a | 101,3 a | 76,6 a |
| A | 20 | 167,2 a | 115,0 b | 102,3 b | 97,6 b | 61,9 b | 40,8 b |
| A | 25 | 167,2 a | 115,1 b | 94,5 b | 79,8 c | 55,9 b | 50,4 b |

Médias seguidas de letras diferentes, em cada tratamento e período de armazenamento, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey. C= tratamento controle; Q= tratamento químico; A= tratamento com alecrim.

O teor de amido e AST reduziram ao longo do armazenamento. Nas sementes armazenadas a 10 °C, os teores de amido e AST foram superiores as demais temperaturas testadas, aos 75 DAR. A maior concentração de açúcares solúveis, assim como de outros compostos de reserva pode estar associada ao maior vigor dessas sementes e contribuindo para o desenvolvimento inicial de plântulas. Maiores teores de amido e açúcares solúveis totais também foram observados em sementes de soja mais vigorosas (HENNING et al., 2010). A maior disponibilidade de carboidratos solúveis em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* resultou não só no fornecimento de energia para a germinação, mas também em maior armazenabilidade das sementes (CORTE et al., 2006).

Para proteína e lipídios, foi observada, interação entre as variáveis, temperatura e período de armazenamento, e temperatura e tratamentos antifúngico. Os teores de proteínas solúveis totais reduziram ao longo do tempo, independente das condições de armazenamento (temperatura e tratamento) (Figura 4). As sementes armazenadas a 10 °C e 25 °C mantiveram os teores de proteínas solúveis totais significativamente superiores às sementes armazenadas em 20 °C, a partir dos 30 DAR (Tabela 5). Além disso, quando considerados os tratamentos para controle de fungos, as temperaturas de 10 °C e 25 °C foram mais eficientes em preservar os teores de proteínas em relação à temperatura de 20 °C (Tabela 6).

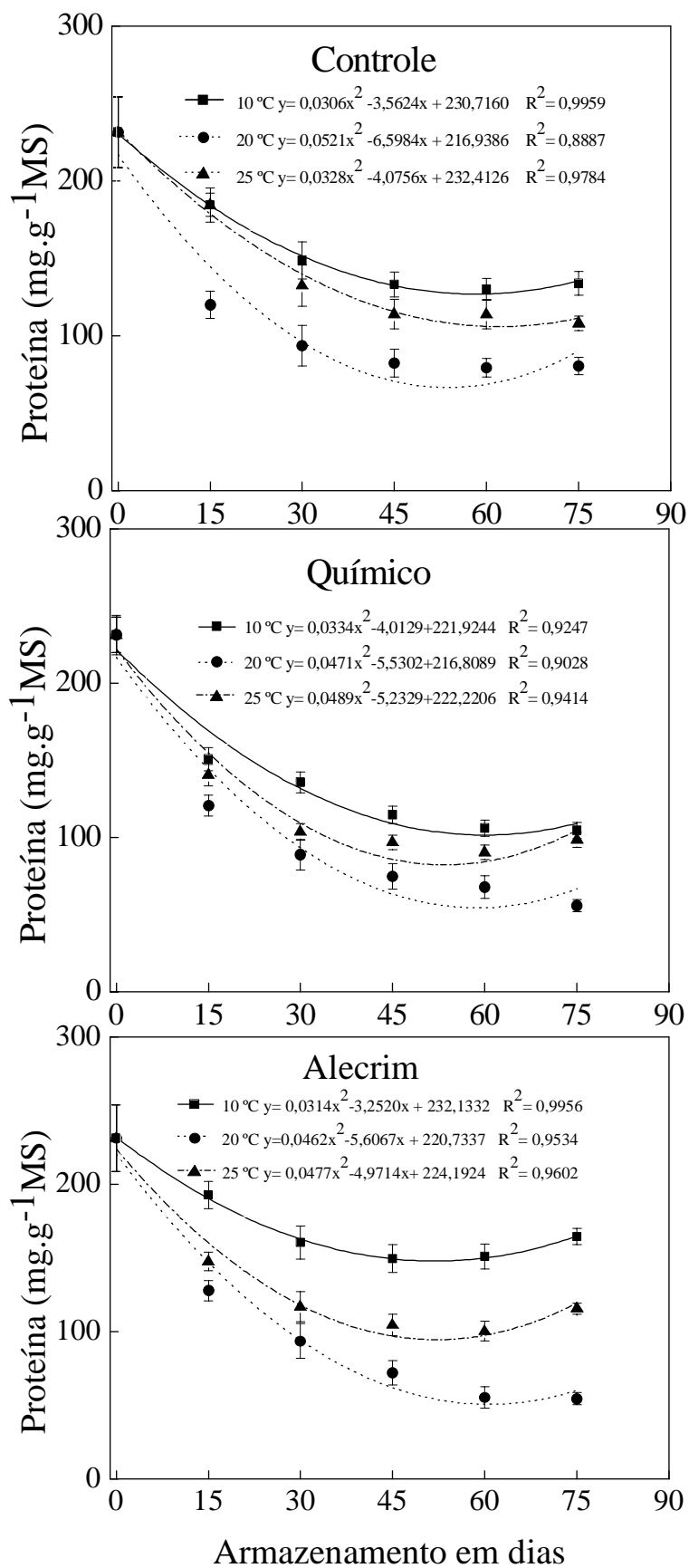


Figura 4. Teor de proteínas nas sementes de seringueira com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes temperaturas.

TABELA 5. Resultados médios do teor de proteínas solúveis totais de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento

| Temperatura | Armazenamento em dias | | | | |
|-------------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|
| | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 |
| 10 °C | 169,3 a | 144,9 a | 140,3 a | 135,2 a | 125,8 a |
| 20 °C | 103,6 b | 95,1 b | 81,9 c | 80,4 b | 63,6 b |
| 25 °C | 122,2 b | 127,7 a | 105,1 b | 117,0 a | 128,8 a |

Médias seguidas da mesma letra, em cada tratamento e período de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 6. Resultados médios do teor de proteínas solúveis totais de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento

| Temperatura | Tratamentos | | |
|-------------|-------------|---------|---------|
| | Controle | Químico | Alecrim |
| 10 °C | 147,1 a | 122,2 a | 159,9 a |
| 20 °C | 92,9 b | 80,0 b | 81,8 c |
| 25 °C | 133,3 a | 113,6 a | 113,5 b |

Médias seguidas da mesma letra, em cada tratamento e período de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No que se refere aos teores de proteínas, sementes mais vigorosas geralmente apresentam maior concentração dessa reserva em relação às de menor vigor (SHIBATA et al., 2012). No presente estudo foi possível observar que quando armazenadas a 10 °C, as sementes sem tratamento (controle) e as tratadas com alecrim, apresentaram teor de proteínas significativamente superior às armazenadas a 20 °C. Durante o processo de deterioração de sementes, ocorre decréscimo do teor e na síntese de novas proteínas. Redução no valor do conteúdo de proteínas ao longo do período de armazenamento foi observada neste estudo e também em sementes de ipê (ABBADE et al., 2014) e girassol (GHASEMNEZHAD; HONERMEIER 2007). As proteínas podem ter sido consumidas durante o metabolismo celular, como na respiração, incremento da atividade proteolítica (DUNLOP et al., 2002) e degradação das proteínas em consequência da peroxidação de lipídios (ARAÚJO et al., 1994), em todas as temperaturas testadas. A maior degradação na temperatura de 20 °C poderia estar associada a menor umidade apresentada pelas sementes, uma vez que a temperatura era mantido por um sistema de condicionamento de ar que retira umidade do ambiente.

Na temperatura de 25 °C, a degradação poderia ser atribuída a maior atividade metabólica, bem como a germinação de sementes durante o armazenamento. Alterações

no teor de proteína também foram associadas à germinação durante o armazenamento em sementes de *Handroanthus albus*.

O decréscimo no teor de proteína é evidenciado através da coalescência dos corpos protéicos nas sementes armazenadas aos 75 DAR, em relação as sementes antes do armazenamento nas fotomicrografias de luz (Figuras 8 a 13, primeira coluna). Isto sugere que as proteínas foram metabolizadas ao longo do armazenamento. Em sementes de arroz, o teor de proteína bruta foi utilizado para diferenciar lotes com variações nos níveis de vigor, e apresentou correlação positiva com a emergência em campo sob condições desfavoráveis (BORTOLOTTO et al., 2008). Além disso, a mobilização de proteínas durante o armazenamento é necessária para atender as demandas de aminoácidos durante os estádios iniciais da germinação, o que explica a redução nesse composto de reserva durante o armazenamento.

O conteúdo de lipídios nas sementes de seringueira decresceu ligeiramente ao longo do armazenamento (Figura 5), as sementes armazenadas a 10 °C a partir dos 60 DAR apresentaram teor de lipídios superior às das demais temperaturas. Além disso, essa mesma temperatura de armazenamento proporcionou os maiores teores de lipídios para as sementes tratadas com alecrim ou fungicidas químicos (Tabela 7). Sementes do controle armazenadas a 10 °C e 25 °C apresentaram teor de lipídios semelhante e significativamente superior às sementes armazenadas a 20 °C.

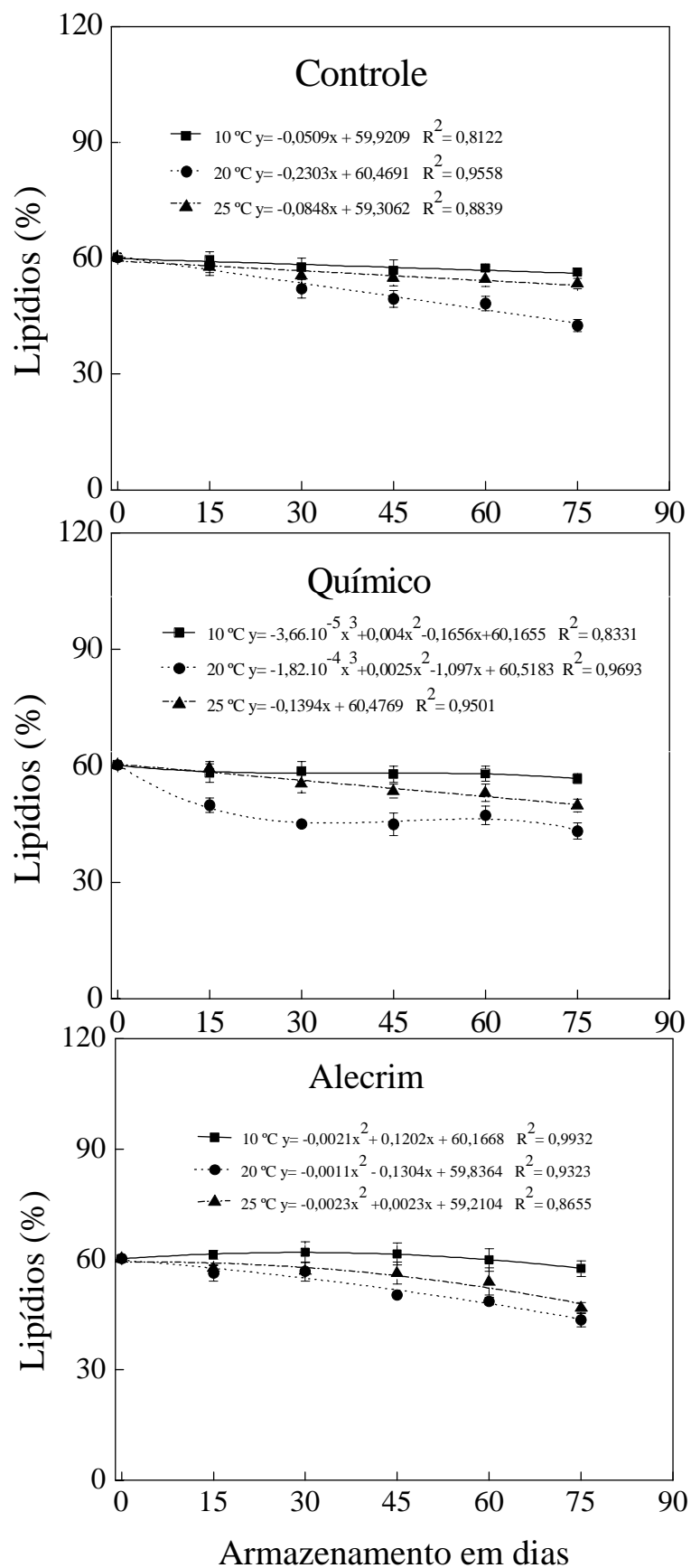


Figura 5. Teor de lipídios nas sementes de seringueira com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes temperaturas.

TABELA 7. Resultados médios do teor de lipídios de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento

| Temperatura | Armazenamento em dias | | | | |
|-------------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 |
| 10 °C | 56,3 a | 57,9 a | 57,0 a | 56,3 a | 53,3 a |
| 20 °C | 54,8 a | 43,8 c | 38,9 b | 39,5 c | 34,2 c |
| 25 °C | 54,6 a | 53,1 b | 55,1 a | 52,4 b | 46,4 b |

Médias seguidas da mesma letra, em cada tratamento e período de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 8. Resultados médios do teor de lipídios de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida, da temperatura (T °C) e do período de armazenamento

| Temperatura | Tratamentos | | |
|-------------|-------------|---------|---------|
| | Controle | Químico | Alecrim |
| 10 °C | 57,0 a | 55,0 A | 56,5 a |
| 20 °C | 46,2 b | 40,1 C | 40,5 c |
| 25 °C | 54,2 a | 51,4 B | 51,4 b |

Médias seguidas da mesma letra, em cada tratamento e período de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O teor de lipídios nas sementes pode variar de acordo com o genótipo e as condições de armazenamento, principalmente temperatura (KOUTROUBAS et al., 2000). Essas condições influenciam diretamente a degradação dos lipídios. No presente estudo foi observada redução na concentração de lipídios ao final do armazenamento. Uma tendência de redução no teor de lipídios em sementes de girassol também foi observadas por Abreu et al. (2012) e por Balesevic-Tubic et al. (2007). A redução no teor de lipídios associada à peroxidação é uma das principais causas da deterioração rápida de sementes com grande concentração dessa reserva como em sementes de girassol (BALESEVIC-TUBIC et al., 2005) e possivelmente em sementes de seringueira que também apresentaram alto teor de lipídio.

As imagens de microscopia de luz (histoquímica) reforçam os resultados obtidos nas análises bioquímicas. Foi possível observar nas fotomicrografias de luz que antes do armazenamento as células do endosperma, cotilédones e eixo embrionário apresentavam-se bem estruturadas e com núcleo bem compartimentalizado (Figuras 6 e 7). Após o armazenamento, as sementes sem tratamento ou tratadas com alecrim, armazenadas a 10 °C apresentavam características mais próximas das sementes recém-colhidas. Comportamento semelhante foi observado nas sementes sem tratamento e armazenadas a 25 °C. Vale ressaltar que as sementes armazenadas nestas condições

foram as únicas que apresentaram germinação até aos 75 DAR. Nas sementes armazenadas a 20 °C, independente do tratamento fungicida, ficou evidente a perda da estrutura normal das células e coalescência do núcleo celular (Figuras 6M-O e 7A-F).

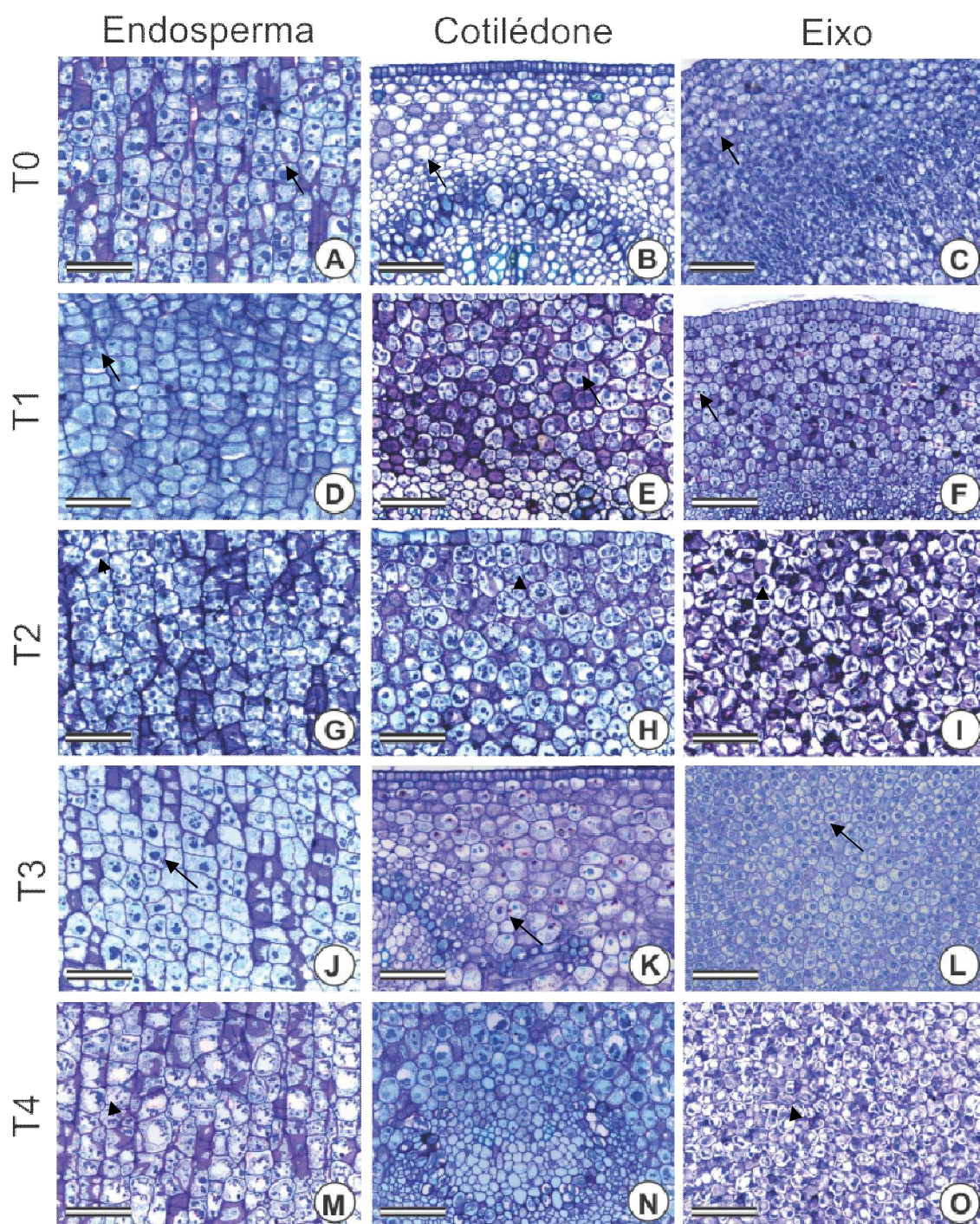


Figura 6. Micrografias de luz de sementes de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do endosperma, cotilédone e eixo embrionário. Antes do armazenamento (T0) e T1, T2, T3 (armazenadas a 10 °C; sem tratamento fungicida, tratamento químico e tratamento com alecrim, respectivamente) e T4 (armazenadas a 20 °C, sem tratamento fungicida), coradas com Azul de Toluidina, para visualização estrutural. Barras: 10µm. As setas indicam compartimentalização normal do núcleo e as cabeças de seta falta de compartimentalização e alterações estruturais.

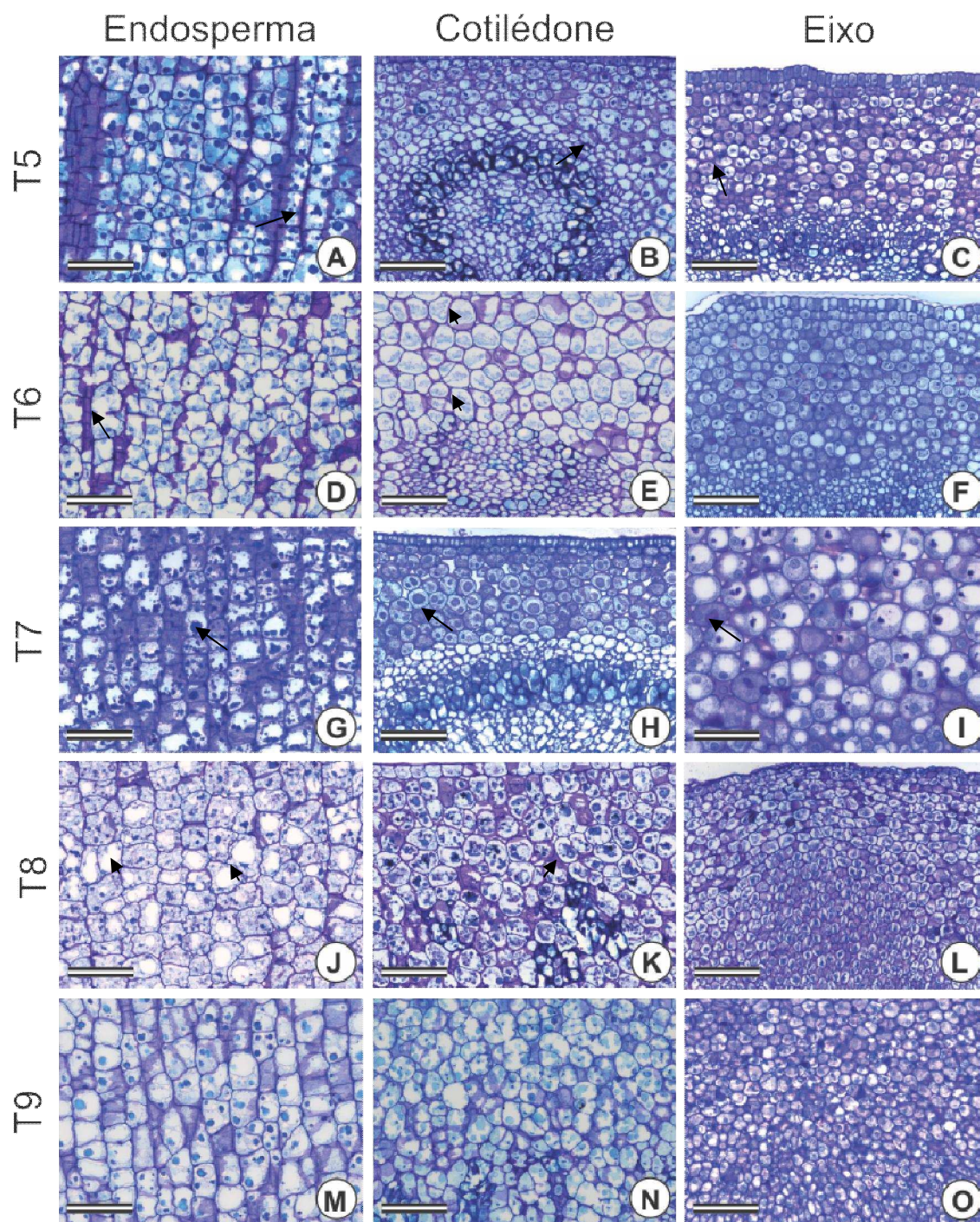


Figura 7. Micrografias de sementes de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do endosperma, cotilédone e eixo embrionário, T5, T6 (armazenamento a 20 °C, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), e T7, T8 e T9 T6 (armazenamento a 25 ± 3 °C, sem tratamento para controle de fungos, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), coradas com Azul de Toluidina, para visualização de estrutural. Barras: 10 µm. As setas indicam compartimentalização normal do núcleo e as cabeças de seta falta de compartimentalização e alterações estruturais.

Em relação aos compostos de reserva como proteínas, amido e lipídios, as fotomicrografias das estruturas das sementes ao longo do armazenamento confirmam os

resultados observados nas análises bioquímicas. Neste caso, foi possível observar que as maiores alterações nos compostos de reserva ocorreram principalmente nos cotilédones (Figuras 8 e 9) e no eixo embrionário (Figuras 10 e 11). Maior degradação nas proteínas e amido foram verificados nas sementes armazenadas na temperatura de 20°C (Figuras 8 M-O; 9 A-F; 10 M-O e 11 A-F), e nas sementes tratadas com fungicida químico armazenadas a 10 °C (Figura 10 G-I) e quando armazenadas a temperatura ambiente, ± 25 °C e tratadas com produto químico ou alecrim (Figuras 9 J-O e 11 J-O).

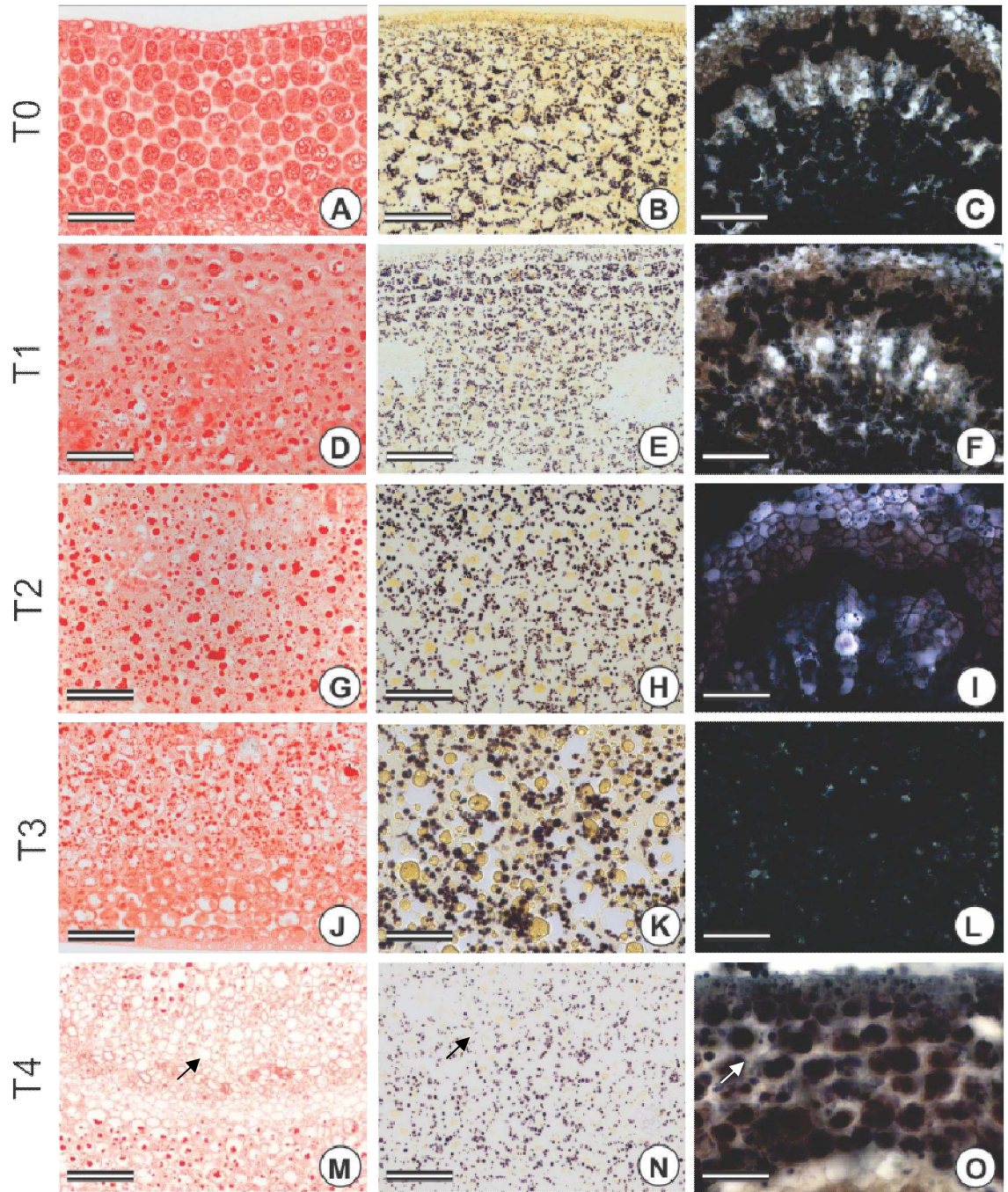


Figura 8. Micrografias de luz de sementes de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do cotilédone. Antes do armazenamento (T0) e T1, T2, T3 (armazenadas a 10 °C; sem tratamento fungicida, tratamento químico e tratamento com alecrim, respectivamente) e T4 (armazenadas a 20 °C, sem tratamento fungicida), coradas para proteínas (1ª coluna), amido (2ª coluna) e lipídios (3ª coluna). Barras: 10 μm (A, B, C, D, E, F, G, H, J, M, N), 5 μm (I, K, L, O). As setas indicam alterações nos compostos de reserva e as cabeças de seta falta de compartimentalização e alterações estruturais.

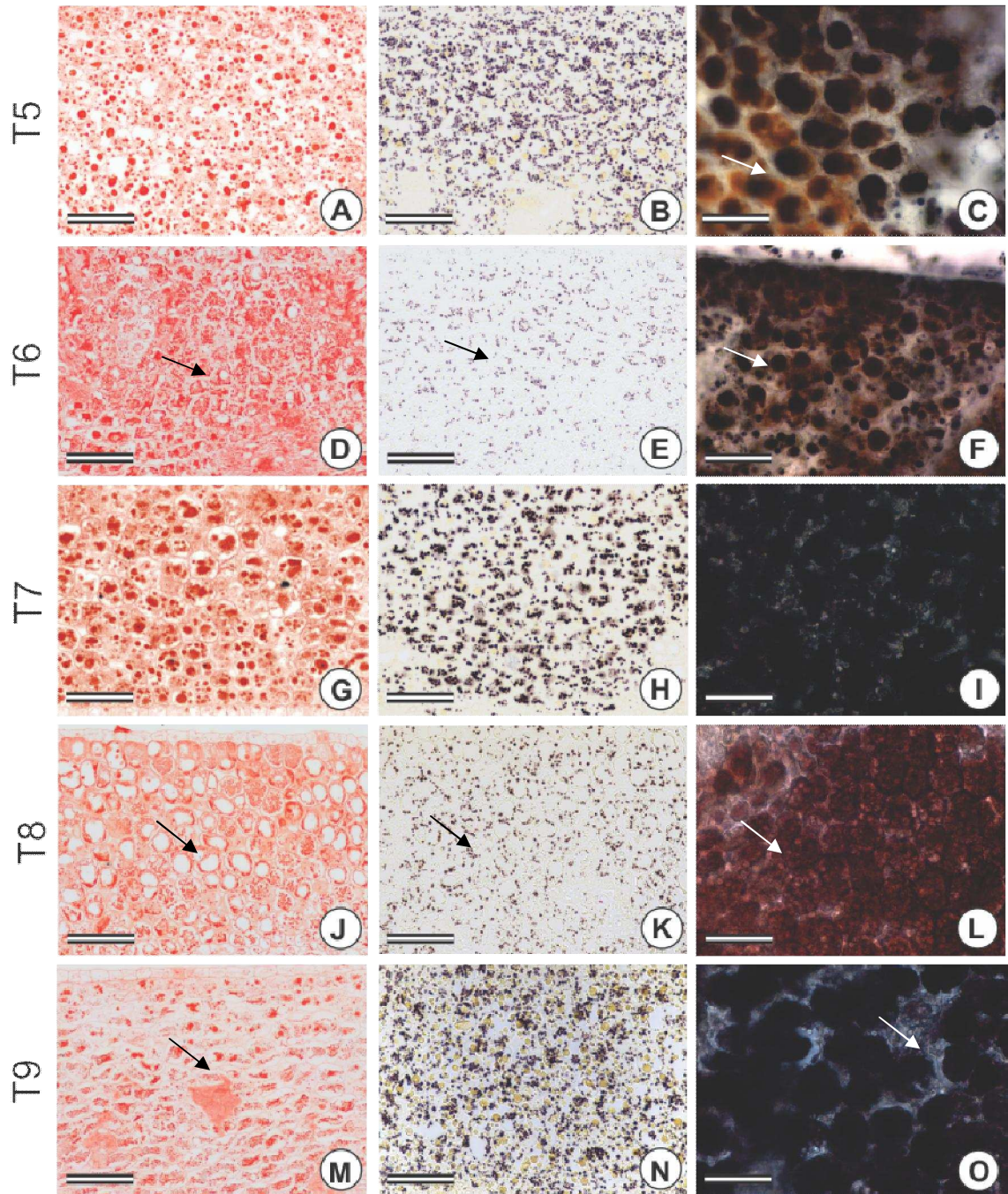


Figura 9. Micrografias de luz de sementes de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do cotilédono, T5, T6 (armazenamento a 20 °C, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), e T7, T8 e T9 (armazenamento a 25 ± 3 °C, sem tratamento para controle de fungos, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), coradas proteínas (1ª coluna), amido (2ª coluna) e lipídios (3ª coluna). Barras: 10 µm (A,B,D,E,G,H,I,J,K,L,M,N), 5 µm (C,F,O). As setas indicam redução nos compostos de reserva.

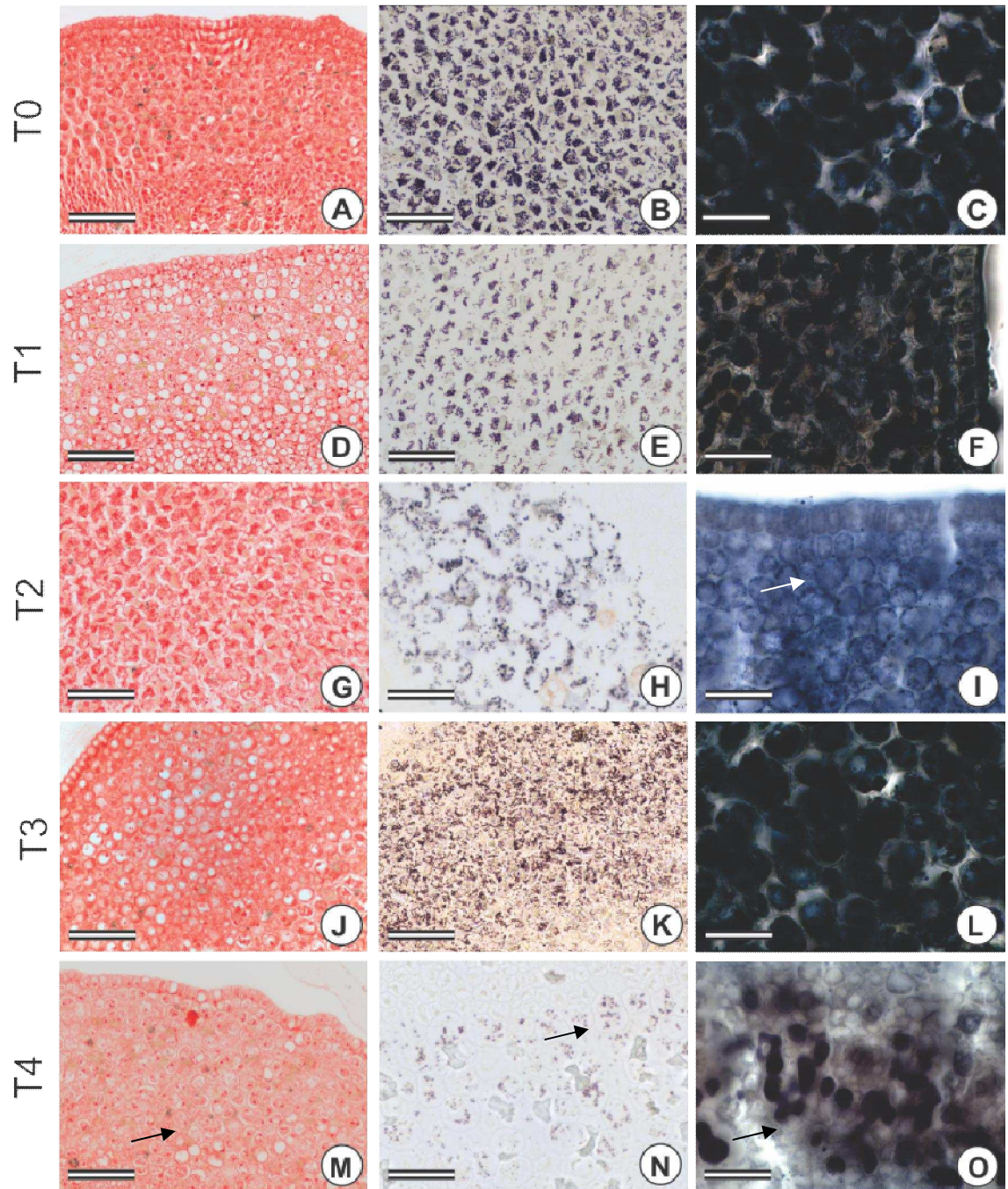


Figura 10. Micrografias de luz de sementes de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais eixo embrionário. Antes do armazenamento (T0) e T1, T2, T3 (armazenadas a 10 °C; sem tratamento fungicida, tratamento químico e tratamento com alecrim, respectivamente) e T4 (armazenadas a 20 °C, sem tratamento fungicida), coradas proteínas (1ª coluna), amido (2ª coluna) e lipídios (3ª coluna). Barras:10µm (A,B,D,E,G,J,K,M), 5 µm (C,F,H,I,L,N,O). As setas indicam redução nos compostos de reserva e as cabeças de seta coalescência.

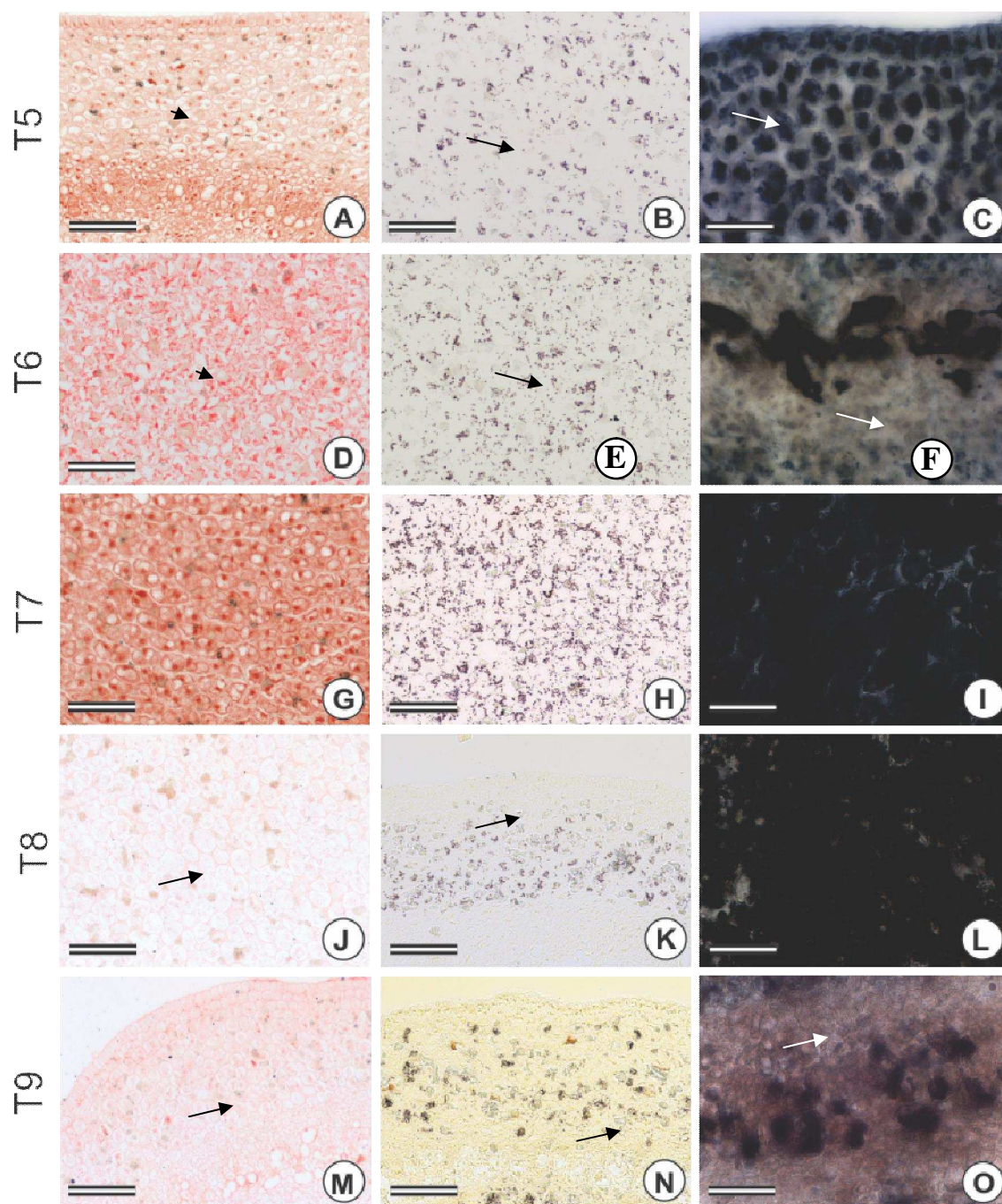


Figura 11. Micrografias de luz de sementes de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do cotilédono, T5, T6 (armazenamento a 20 °C, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), e T7, T8 e T9 (armazenamento a 25 ± 3 °C, sem tratamento para controle de fungos, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), coradas para proteínas (1ª coluna), amido (2ª coluna) e lipídios (3ª coluna). Barras: 10 μm (1ª e 2ª colunas), 5 μm (3ª coluna). As setas indicam redução nos compostos de reserva e as cabeças de seta coalescência.

No endosperma, a redução nos compostos de reserva das sementes foi menos intensa que nos cotilédones e no eixo embrionário, porém foi possível verificar redução principalmente no teor de lipídios (Figuras 12 F e 13 C e F).

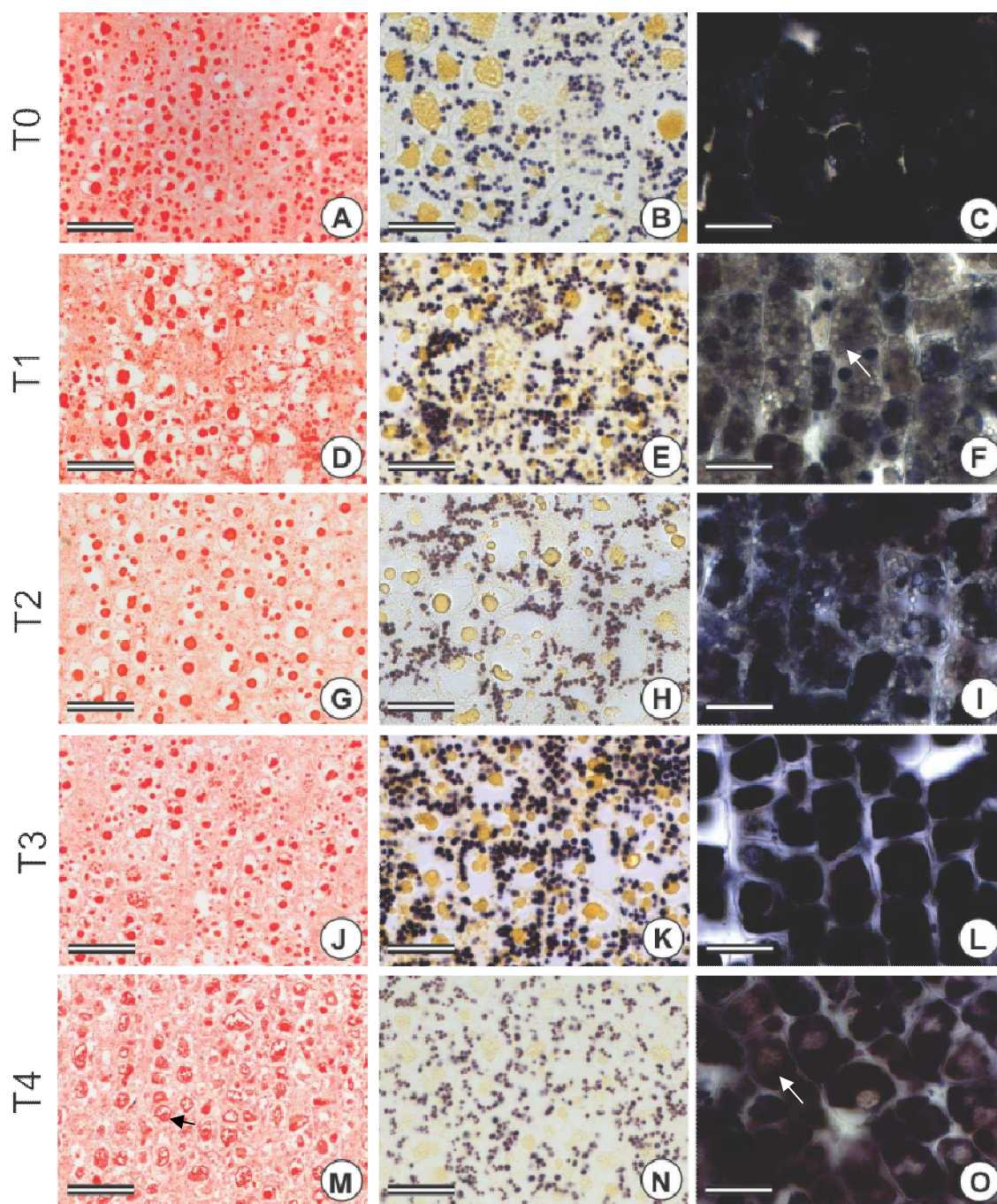


Figura 12. Micrografias de luz de sementes de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do endosperma. Antes do armazenamento (T0) e T1, T2, T3 (armazenadas a 10 °C; sem tratamento fungicida, tratamento químico e tratamento com alecrim, respectivamente) e T4 (armazenadas a 20 °C, sem tratamento fungicida), coradas para proteínas (1ª coluna), amido (2ª coluna) e lipídios (3ª coluna). Barras:10µm (1ª coluna), 5 µm (2ª e 3ª colunas).As setas indicam redução nos compostos de reserva e as cabeças de seta coalescência.

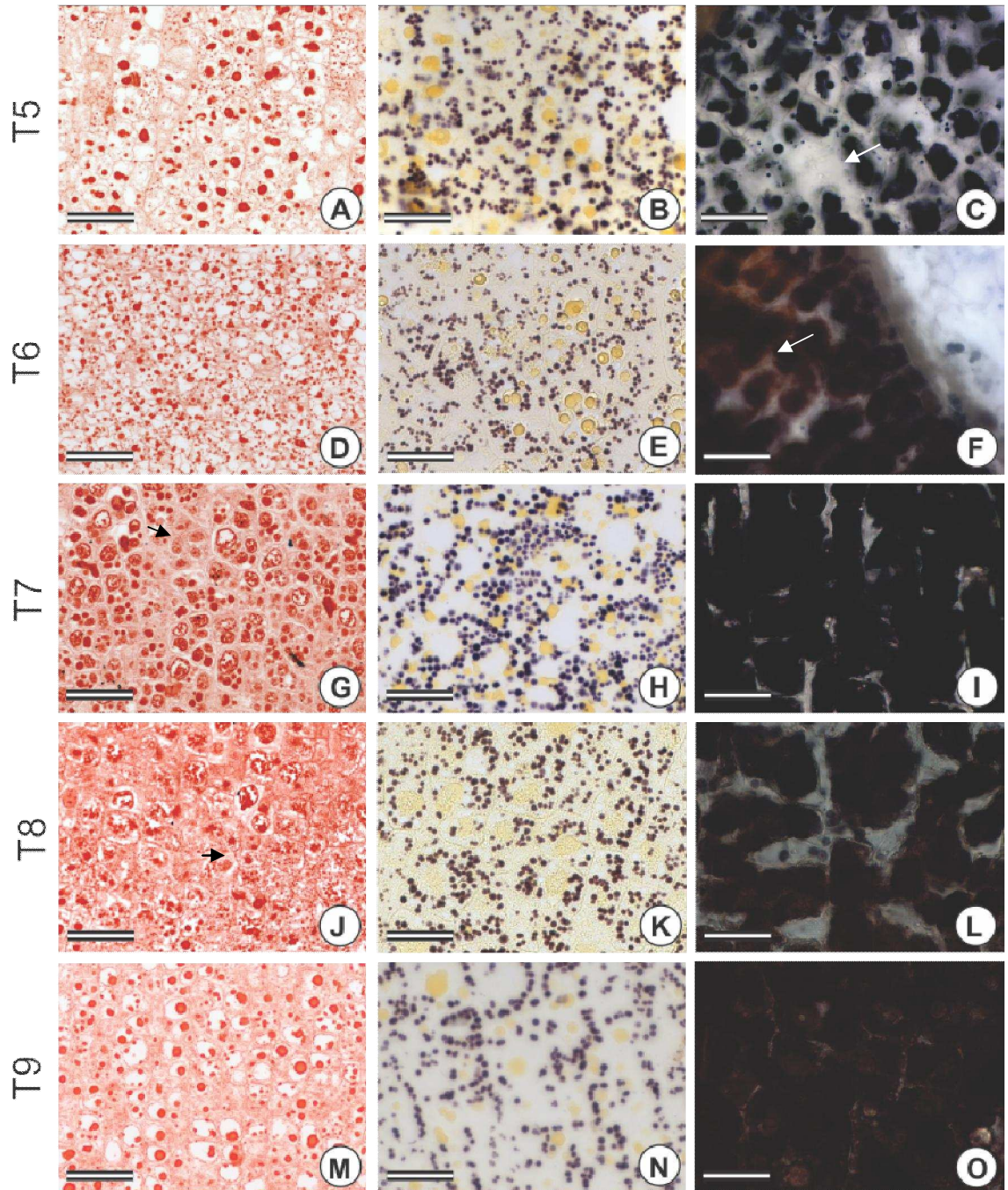


Figura 13. Micrografias de luz de sementes de *Hevea brasiliensis* após 75 dias de armazenamento. Seções transversais do endosperma, T5, T6 (armazenamento a 20 °C, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), e T7, T8 e T9 (armazenamento a 25 ± 3 °C, sem tratamento para controle de fungos, tratadas com produto químico e tratadas com alecrim, respectivamente), para proteínas (1ª coluna), amido (2ª coluna) e lipídios (3ª coluna). Barras: 10μm (1ª coluna), 5 μm (2ª e 3ª colunas).As setas indicam redução nos compostos de reserva e as cabeças de seta coalescência.

Nos cotilédones e no eixo embrionário foi observada maior degradação dos compostos de reserva, proteínas, amido e lipídios, em relação ao endosperma (Figura, 8 a 11). Essas estruturas são as principais responsáveis pelo armazenamento de compostos

de reserva em sementes de diferentes espécies tropicais como *Acacia farnesiana*, *Acacia* sp., *Caesalpinia coriaria*, *Gyrocarpus jatrophiifolius*, *Pithecello biumdulce* e *Swietenia humilis* (SORIANO et al., 2011). Nestas espécies, os eixos embrionários apresentaram maior concentração de inclusões citoplasmáticas, enquanto que as células nos cotilédones estavam repletas de corpos de proteína, lipídios, amido e polissacáridos não-solúveis. Comportamento similar foi observado na semente de seringueira, no presente estudo.

Através das análises de microscopia eletrônica de varredura foi possível confirmar a degradação de compostos de reserva nos cotilédones das sementes durante o armazenamento, de forma semelhante ao observado nas análises histoquímicas e bioquímicas (Figura 14). As sementes sem tratamento armazenadas a 10°C e 25°C, e as tratadas com alecrim, armazenadas a 10°C, mantiveram características semelhantes às sementes recém-colhidas quanto ao conteúdo de reservas e estrutura celular ao final do período de armazenamento. Novamente as sementes armazenadas a 20°C apresentaram maior degradação independente das condições de armazenamento. Além disso, as sementes tratadas com alecrim e armazenadas a 20°C e 25°C foram as que apresentaram maior degradação da estrutura celular.

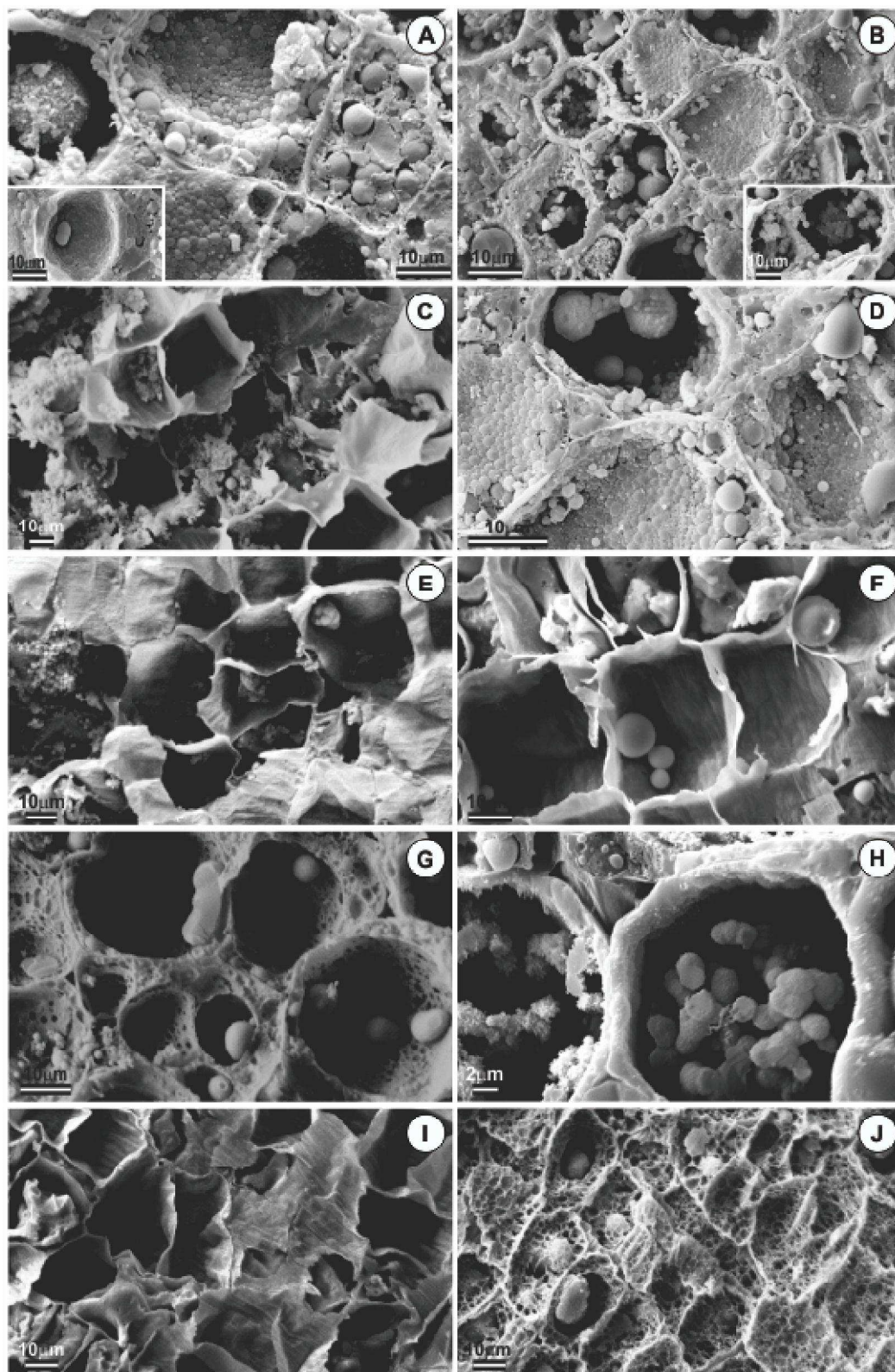


Figura 14. Fotomicrografia eletrônica de varredura de seções transversais do cotilédone de sementes de seringueira. A – semente recém-colhida; B, C e D – sementes armazenadas a 10°C (controle, químico e alecrim, respectivamente). E, F e G - sementes armazenadas a 20°C (controle, químico e alecrim, respectivamente). H, I e J - sementes armazenadas a 20°C (controle, químico e alecrim, respectivamente), armazenadas por 75 dias.

Em associação com os dados de bioquímica e histoquímica, é possível relacionar o desempenho das plântulas oriundas das sementes armazenadas. Sementes armazenadas à temperatura de 10°C proporcionaram plântulas com maior comprimento após 45 dias de semeadura (Figura 15). Vale ressaltar, que aos 60 DAR, sementes tratadas com produto químico não apresentaram germinação, inviabilizando a determinação do comprimento de plântulas. Aos 75 DAR estes dados só foram computados para as temperaturas de 10°C e 25°C.

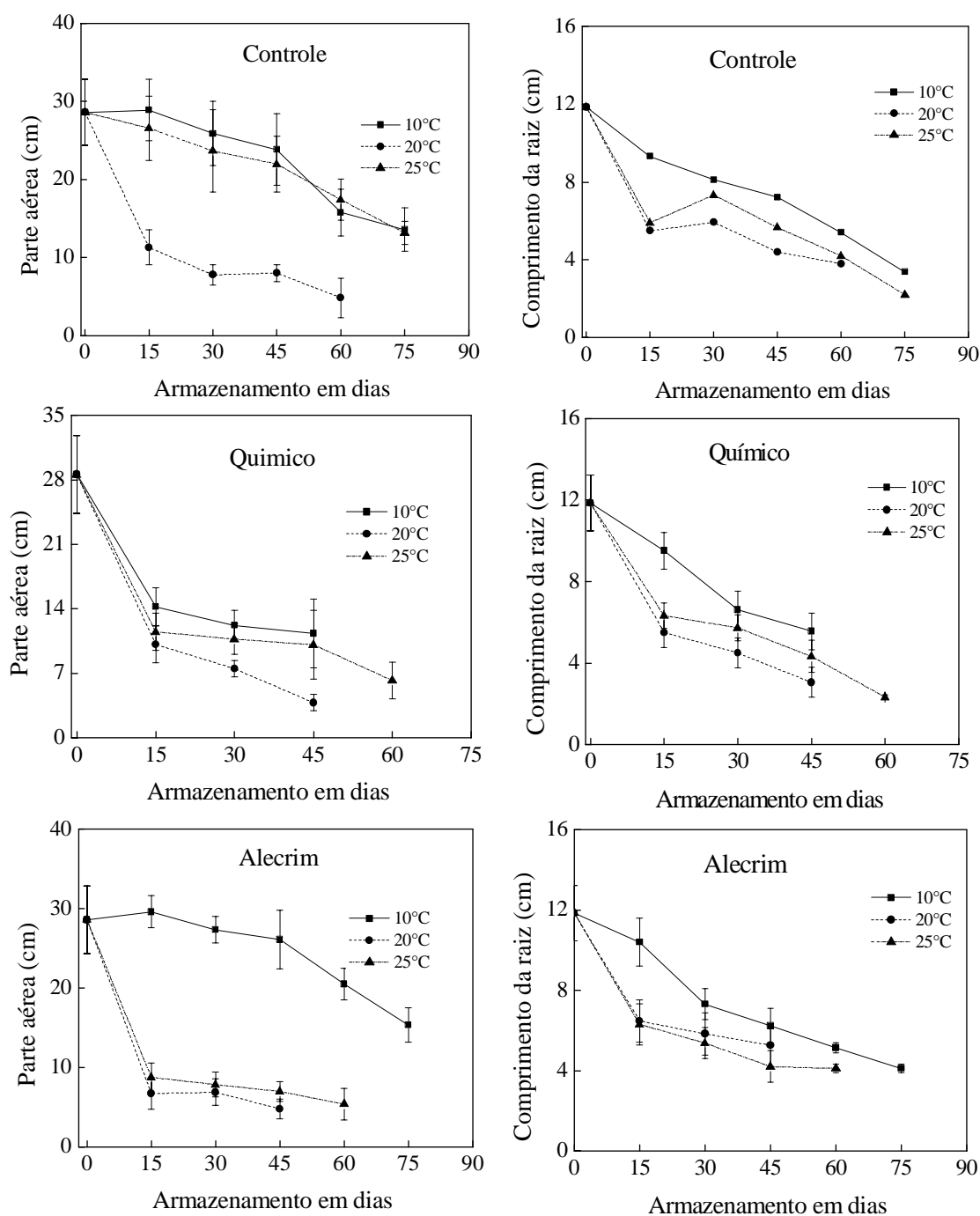


Figura 15. Comprimento de plântulas (parte aérea e raiz) oriundas de semente de seringueiras com diferentes tratamentos fungicidas ao longo do armazenamento sob diferentes temperaturas.

O teor de lipídios nas sementes pode variar de acordo com o genótipo e as condições de armazenamento, principalmente temperatura (KOUTROUBAS et al., 2000). Essas condições influenciam diretamente a degradação dos lipídios. No presente estudo foi observada redução na concentração de lipídios ao final do armazenamento. Uma tendência de redução no teor de lipídios em sementes de girassol também foi observadas por Abreu et al. (2012) e por Balesevic-Tubic et al. (2007). A redução no teor de lipídios associada à peroxidação é uma das principais causas da deterioração rápida de sementes com grande concentração dessa reserva como em sementes de girassol (BALESEVIC-TUBIC et al., 2005) e possivelmente em sementes de seringueira que também apresentaram alto teor de lipídio.

Lipídios e carboidratos são fundamentais para o crescimento das mudas até o estabelecimento das plântulas (SORIANO et al., 2011; KITAJIMA, 2002). Plântulas jovens dependem da disponibilidade de reservas tais como carboidratos, lipídios, proteínas e outros nutrientes minerais, até tornarem-se mudas estabelecidas (HANLEY et al, 2004 e KITAJIMA; MYERS, 2008). De acordo com os resultados de crescimento de plântulas, indivíduos mais vigorosos foram oriundos de sementes armazenadas a 10°C, seguidas pelas sementes armazenadas a 25°C. Este comportamento pode ser associado também ao maior teor de composto de reserva (amido, AST, proteína e lipídio) apresentado por estas sementes. Cada uma destas reservas oferece uma contribuição energética diferente para desenvolvimento de plântulas jovens (KITAJIMA e MYERS, 2008). As sementes armazenadas a 20°C podem ter sido afetadas pela redução no teor de umidade, possivelmente provocado pelo mecanismo de manutenção desta temperatura (sistema de ar condicionado). Desta forma, a umidade das sementes ficou abaixo de 22 % a partir dos 45 dias. Esse teor de umidade está abaixo do exigido para conservação das sementes de seringueira, cima de 30 % segundo Cícero (1986), e possivelmente afetou o metabolismo celular e conseqüentemente a viabilidade das sementes. Já as sementes armazenadas a 10°C e 25°C mantiveram umidade acima de 30 % em todo período avaliado.

Neste estudo, a degradação celular nas sementes tratadas com alecrim e armazenadas a 20°C e 25°C (Figuras 9 G e 9 J), pode ser atribuída ao esgotamento dos compostos de reserva e ainda à grande incidência de fungos dos gêneros *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp e *Botritis* spp, além da presença de bactérias, verificada nestas sementes pelo teste de sanidade.

5.4. – CONCLUSÃO

As sementes armazenadas à temperatura de 10°C proporcionaram melhor emergência e plântulas mais vigorosas possivelmente por apresentarem maior teor de compostos de reserva ao final do armazenamento, indicando uma relação estreita entre os compostos de reserva, vigor das sementes e o estabelecimento inicial de plântulas.

5.5. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBADE, L.C.; TAKAKI, M. Biochemical and physiological changes of *Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sandwith (Bignoniaceae) seeds under storage. **Journal of Seed Science**, v.36, n.1, p.100-107, 2014.
- ABREU, L.A.S.; CARVALHO, M.L.M., PINTO, C.A.G., KATAOKA, V.Y.; SILVA, T.T.A. Deterioration of sunflower seeds during storage. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, p.240-247, 2012.
- BALESEVIC-TUBIC, S.; MALENËIC, D.; TATIC, M.; MILADINOVIC, J. Influence of aging process on biochemical changes in sunflower seed. **Helia**, v.28, n.42, p.107-114, 2005.
- BALESEVIC-TUBIC, S.; TATIC, M.; MILADINOVIC, J.; PUCAREVIĆ, M. Changes of fatty acids content and vigor of sunflower seed during natural aging. **Helia**, v.30, n.47, p.61-68, 2007.
- BORTOLOTTI, R.P.; MENEZES, N.L.; GARCIA, D.C.; MATTIONI, N.M. Teor de proteína e qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Bragantia**, v.67, p.513-520, 2008.
- BONOME, L.T. DA S.; OLIVEIRA, L.E.M.; GRACIANO, M.H.P.; MATTOS, J.O.S.; MESQUITA, A.C. Influência do tratamento fungicida e da temperatura sobre a qualidade fisiológica de sementes de seringueira durante o armazenamento. **Agrarian**, v.2, n.5, p.97-112, 2009.
- 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 e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS, 399 p, 2009.
- BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S.; AIDAR, M.P.M. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: **Artmed**, p. 163-185, 2004.
- CACCERE, R.; TEIXEIRA, S.P.; CENTENO, D.C.; FIGUEIREDO- RIBEIRO, R.C.L.; BRAGA, M.R. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga veraseeds* are consistent with the lack of a desiccation phase. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 791-800, 2013.
- CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.A.; VENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A.A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, v.30, p.941-949, 2006.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356.

- FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK- WOCHNIAK, E.; FERNI, A.R.; GALILI, G. Arabidopsis seed development and germination in associated with temporally distinct metabolic switches. **Plant Physiology**, v.142, p. 839-854, 2006.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36-41, 2008.
- GARCIA, C. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de araucaria angustifolia (bertoloni) otto kuntze sob condições controladas de armazenamento. **Dissertação**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- GHASEMNEZHAD, A.; HONERMEIER, B. Influence of storage conditionson quality and viability of high and low oleic sunflower seeds.**International Journal of Plant Production**, v. 3, n.4, p. 38-48, 2007.
- HANLEY ME, FENNER M, WHIBLEY H, DARVIL B. Early plant growth: identifying the end point of the seedling phase. **New Phytologist**, v.163, p. 61–66, 2004.
- HAMPTON, J.G. Vigour testing within laboratories of the International Seed Testing Association: a survey. **Seed Science and Technology**, v.20, p.427-452, 1973.
- HENNING, F.A.; MERTZ, L.M.; JUNIOR, E.A.J.; MACHADO, R.D.; FISS, G.; ZIMMER, P.D. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p727-734, 2010.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book. 523p. 1940. (O'Brien et al., 1964).
- KIDD, F. The controlling influence of carbon dioxide in the maturation, dormancy and germination of seeds. Part II. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 87, p. 609-625, 1914.
- KITAJIMA, K. Do shade-tolerant tropical tree seedlings depend longer on seed reserves? Functional growth analysis of three Bignoniacea species. **Functional Ecology**, v. 16, p. 433–444, 2002.
- KITAJIMA, K.; MYERS, J.A. Seedling ecophysiology; strategies toward achievement of positive net carbon balance. In: Leck MA, Parker TV, Simpson RL, eds. Seedling ecology and evolution. **Cambridge University Press**, p.172–188, 2008.
- KOUTROUBAS, S.D.; PAPAKOSTA, D.K.; DOITSINIS, A. Water requirements for castor oil crop (*Ricinus communis* L.) in a Mediterranean climate. **Crop Science**, v.40, n.1, p.33-41, 2000.
- McCREADY, R. M.; GUGGOLZ, A.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 22, p. 1156-1158, 1950.
- MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeate* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v. 67, p. 399-407, 2010.

- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.
- PEREIRA, J.P. Conservação da viabilidade do poder germinativo da semente de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.15, n.2, p.237-244, 1980.
- RIBEIRO, M. F. Tecnologias para Manutenção da qualidade de sementes de café (coffea arabica l.) 56p. **Tese** (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, 2013.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life os seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499-514, 1973.
- SHIBATA, M.; COELHO, C. M. M.; OLIVEIRA, L. M.; GARCIA, C. Accelerated aging of ipê seeds under controlled conditions of storage. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, p. 247-254, 2012.
- SORIANO, D.; SEGOVIA, A. O.; GUZMAN, J. M.; KITAJIMA, K.; BUEN, A.G. and HUANTE, P. Seed reserve composition in 19 tree species of a tropical deciduous forest in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. **Annals of Botany**, v. 107, p. 939–951, 2011.
- SUKESH; CHANDRASHEKAR, K.R. Biochemical changes during the storage of seeds of Hopea ponga (Dennst.) mabberly: An endemic species of Western Ghats. **Research Journal Seed Science**, v.4, p. 106-116, 2011.
- VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2 R. **Ann. Histochem.**, v. 15, p. 289-296, 1970.
- WALTERS, C.T.; BALLESTEROS, D.; VERTUCCI, V. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. **Plant Science**, v.179, p.565-573, 2010.

ANEXOS

CAPÍTULO 2

TABELA 1: Análise de variância do efeito de diferentes tempos de desenvolvimento das sementes sobre a germinação

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|-----------|------------------------|-------------|--------|--------|
| TEMPO | 3 | 6808.000000 | 2269.333333 | 81.048 | 0.0000 |
| erro | 12 | 336.000000 | 28.000000 | | |
| Total corrigido | | 15 | 7144.000000 | | |
| CV (%) = | 7.45 | | | | |
| Média geral: | 71.000000 | Número de observações: | | 16 | |

TABELA 2: Análise de variância do efeito de diferentes tempos de desenvolvimento das sementes sobre o índice de velocidade de crescimento (IVE)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|-----------|------------------------|-----------|---------|--------|
| TEMPO | 3 | 20.773125 | 6.924375 | 156.116 | 0.0000 |
| erro | 12 | 0.532250 | 0.044354 | | |
| Total corrigido | | 15 | 21.305375 | | |
| CV (%) = | 7.28 | | | | |
| Média geral: | 2.8937500 | Número de observações: | | 16 | |

CAPÍTULO 4

TABELA 3: Análise de variância do efeito de tratamentos, temperatura e período de armazenamento das sementes sobre a germinação

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|------------|------------------------|--------------|---------|--------|
| TEMPERAT | 2 | 22453.333333 | 11226.666667 | 146.789 | 0.0000 |
| TRAT | 2 | 49870.000000 | 24935.000000 | 326.027 | 0.0000 |
| TEMPO | 4 | 49581.111111 | 12395.277778 | 162.069 | 0.0000 |
| TEMPERAT*TRAT | 4 | 15046.666667 | 3761.666667 | 49.184 | 0.0000 |
| TEMPERAT*TEMPO | 8 | 3668.888889 | 458.611111 | 5.996 | 0.0000 |
| TRAT*TEMPO | 8 | 5285.555556 | 660.694444 | 8.639 | 0.0000 |
| TEMPERAT*TRAT*TEMPO | 16 | 5664.444444 | 354.027778 | 4.629 | 0.0000 |
| erro | 135 | 10325.000000 | 76.481481 | | |
| <hr/> | | | | | |
| Total corrigido | 179 | 161895.000000 | | | |
| <hr/> | | | | | |
| CV (%) = | 24.87 | | | | |
| Média geral: | 35.1666667 | Número de observações: | 180 | | |
| <hr/> | | | | | |

TABELA 4: Valores médios da porcentagem de germinação de sementes de seringueira submetidas a diferentes tratamentos, desdobradas dentro de cada temperatura de armazenamento

| Temp. °C | Tratamento | Armazenamento em dias | | | | |
|----------|------------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 |
| 10 | C | 80,0 a | 77,5 a | 75,0 b | 47,5 a | 35 a |
| 10 | Q | 30,0 b | 27,5 b | 10,0 c | 5,0 b | 2,5 b |
| 10 | A | 82,5 a | 87,5 a | 87,5 a | 52,5 a | 37,5 a |
| 20 | C | 50,0 a | 45,0 a | 40,0 a | 22,5 a | 2,5 a |
| 20 | Q | 25,0 b | 20,0 b | 12,5 c | 0,0 b | 0,0 b |
| 20 | A | 27,5 b | 35,0 a | 27,5 b | 0,0 b | 0,0 b |
| 25 | C | 85,0 a | 82,5 a | 72,5 a | 45,0 a | 20 a |
| 25 | Q | 27,5 b | 15,0 c | 12,5 b | 0,0 c | 0,0 b |
| 25 | A | 75,0 a | 65,0 b | 17,5 b | 20,0 b | 0,0 b |

Médias seguidas de letras diferentes, em cada temperatura e período de armazenamento, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. C= tratamento controle; Q= tratamento químico; A= tratamento com alecrim.

TABELA 5: Valores médios da porcentagem de germinação de sementes de seringueira submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento, desdobradas dentro de cada tratamento para controle de microrganismo

| Tratamento | Temp °C | Armazenamento em dias | | | | |
|------------|---------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 |
| C | 10 | 80,0 a | 77,5 a | 75,0 a | 47,5 a | 35,0 a |
| C | 20 | 50,0 b | 45,0 b | 40,0 b | 22,5 b | 0,0 c |
| C | 25 | 85,0 a | 82,5 a | 72,5 a | 45,0 a | 20,0 b |
| Q | 10 | 30,0 a | 27,5 a | 10,0 a | 5,0 a | 0,0 a |
| Q | 20 | 25,0 a | 20,0 a | 12,5 a | 0,0 a | 0,0 a |
| Q | 25 | 27,5 a | 15,0 a | 12,5 a | 0,0 a | 0,0 a |
| A | 10 | 82,5 a | 87,5 a | 87,5 a | 52,5 a | 37,5 a |
| A | 20 | 27,5 b | 35,0 b | 27,5 b | 0,0 c | 0,0 b |
| A | 25 | 75,0 a | 65,0 c | 17,5 b | 20,0 b | 0,0 b |

Médias seguidas de letras diferentes, em cada tratamento e período de armazenamento, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. C= tratamento controle; Q= tratamento químico; A= tratamento com alecrim.

TABELA 6: Análise de variância do efeito de tratamentos, temperatura e período de armazenamento das sementes sobre o IVE

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|----------------------|-----------|------------------------|-----------|---------|--------|
| TRATAMENTO | 2 | 136.403858 | 68.201929 | 213.775 | 0.0000 |
| TEMPERATC | 2 | 62.773868 | 31.386934 | 98.381 | 0.0000 |
| TEMPO | 4 | 153.794080 | 38.448520 | 120.515 | 0.0000 |
| TRATAMENTO*TEMPERATC | 4 | 57.481546 | 14.370386 | 45.043 | 0.0000 |
| TRATAMENTO*TEMPO | 8 | 14.087420 | 1.760927 | 5.520 | 0.0000 |
| TEMPERATC*TEMPO | 8 | 5.503177 | 0.687897 | 2.156 | 0.0347 |
| TRATAMENTO*TEMPERATC | 16 | 11.371743 | 0.710734 | 2.228 | 0.0069 |
| erro | 135 | 43.069875 | 0.319036 | | |
| Total corrigido | 179 | 484.485566 | | | |
| CV (%) = | 29.69 | | | | |
| Média geral: | 1.9022778 | Número de observações: | 180 | | |

TABELA 7: Análise de variância do efeito de tratamentos, temperatura e período de armazenamento das sementes sobre a condutividade elétrica

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|-----------|------------------------|-----------|---------|--------|
| TEMPERAT | 2 | 20.463930 | 10.231965 | 33.576 | 0.0000 |
| TRAT | 2 | 23.682843 | 11.841422 | 38.858 | 0.0000 |
| TEMPO | 4 | 202.593564 | 50.648391 | 166.203 | 0.0000 |
| TEMPERAT*TRAT | 4 | 24.254197 | 6.063549 | 19.898 | 0.0000 |
| TEMPERAT*TEMPO | 8 | 129.143876 | 16.142984 | 52.973 | 0.0000 |
| TRAT*TEMPO | 8 | 231.281929 | 28.910241 | 94.869 | 0.0000 |
| TEMPERAT*TRAT*TEMPO | 16 | 136.758681 | 8.547418 | 28.048 | 0.0000 |
| erro | 135 | 41.139675 | 0.304738 | | |
| Total corrigido | 179 | 809.318695 | | | |
| CV (%) = | 15.44 | | | | |
| Média geral: | 3.5751667 | Número de observações: | 180 | | |

TABELA 8: Análise de variância do efeito de tratamentos, temperatura e período de armazenamento das sementes sobre a Malanaodeído (MDa).

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|------------|------------------------|------------|---------|--------|
| TEMPO | 4 | 3268.596307 | 817.149077 | 167.440 | 0.0000 |
| TRAT | 2 | 107.117022 | 53.558511 | 10.975 | 0.0001 |
| TEMPERAT | 2 | 392.424313 | 196.212156 | 40.205 | 0.0000 |
| TEMPO*TRAT | 8 | 41.367216 | 5.170902 | 1.060 | 0.3985 |
| TEMPO*TEMPERAT | 8 | 384.071991 | 48.008999 | 9.837 | 0.0000 |
| TRAT*TEMPERAT | 4 | 370.125024 | 92.531256 | 18.960 | 0.0000 |
| TEMPO*TRAT*TEMPERAT | 16 | 240.535325 | 15.033458 | 3.080 | 0.0004 |
| erro | 90 | 439.222925 | 4.880255 | | |
| Total corrigido | 134 | 5243.460121 | | | |
| CV (%) = | 16.99 | | | | |
| Média geral: | 13.0036296 | Número de observações: | 135 | | |

CAPÍTULO 5

TABELA 9: Análise de variância do efeito de tratamentos, temperatura e período de armazenamento das sementes sobre o teor de amido no endosperma

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|------------|------------------------|-------------|---------|--------|
| TEMPO | 4 | 24782.606240 | 6195.651560 | 192.139 | 0.0000 |
| TRAT | 2 | 248.048806 | 124.024403 | 3.846 | 0.0250 |
| TEMPERAT | 2 | 1389.148730 | 694.574365 | 21.540 | 0.0000 |
| TEMPO*TRAT | 8 | 806.260498 | 100.782562 | 3.125 | 0.0037 |
| TEMPO*TEMPERAT | 8 | 3073.285351 | 384.160669 | 11.914 | 0.0000 |
| TRAT*TEMPERAT | 4 | 1827.118096 | 456.779524 | 14.166 | 0.0000 |
| TEMPO*TRAT*TEMPERAT | 16 | 698.516378 | 43.657274 | 1.354 | 0.0436 |
| erro | 90 | 2902.114933 | 32.245721 | | |
| Total corrigido | 134 | 35727.099033 | | | |
| CV (%) = | 7.86 | | | | |
| Média geral: | 72.2714074 | Número de observações: | 135 | | |

TABELA 10: Análise de variância do efeito de tratamentos, temperatura e período de armazenamento das sementes sobre o teor de amido no embrião

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|------------|------------------------|-------------|---------|--------|
| TEMPO | 4 | 13761.190812 | 3440.297703 | 211.411 | 0.0000 |
| TRAT | 2 | 399.252686 | 199.626343 | 12.267 | 0.0000 |
| TEMPERAT | 2 | 3433.848099 | 1716.924050 | 105.507 | 0.0000 |
| TEMPO*TRAT | 8 | 461.494677 | 57.686835 | 3.545 | 0.0013 |
| TEMPO*TEMPERAT | 8 | 517.280108 | 64.660014 | 3.973 | 0.0005 |
| TRAT*TEMPERAT | 4 | 1667.285736 | 416.821434 | 25.614 | 0.0000 |
| TEMPO*TRAT*TEMPERAT | 16 | 459.478256 | 28.717391 | 1.765 | 0.0487 |
| erro | 90 | 1464.571533 | 16.273017 | | |
| Total corrigido | 134 | 22164.401908 | | | |
| CV (%) = | 6.15 | | | | |
| Média geral: | 65.5782963 | Número de observações: | 135 | | |

TABELA 11: Análise de variância do efeito de tratamentos, temperatura e período de armazenamento das sementes sobre o teor de açúcares solúveis totais (AST)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|------------|------------------------|---------------|---------|--------|
| TEMPO | 4 | 83287.894247 | 20821.973562 | 484.043 | 0.0000 |
| TRAT | 2 | 1128.674650 | 564.337325 | 13.119 | 0.0000 |
| TEMPERAT | 2 | 16775.070801 | 8387.535401 | 194.983 | 0.0000 |
| TEMPO*TRAT | 8 | 1598.327779 | 199.790972 | 4.644 | 0.0001 |
| TEMPO*TEMPERAT | 8 | 2583.507873 | 322.938484 | 7.507 | 0.0000 |
| TRAT*TEMPERAT | 4 | 1628.757585 | 407.189396 | 9.466 | 0.0000 |
| TEMPO*TRAT*TEMPERAT | 16 | 1658.305541 | 103.644096 | 2.409 | 0.0047 |
| erro | 90 | 3871.512800 | 43.016809 | | |
| Total corrigido | | 134 | 112532.051277 | | |
| CV (%) = | 7.10 | | | | |
| Média geral: | 92.4221481 | Número de observações: | 135 | | |

TABELA 12: Análise de variância do efeito de tratamentos, temperatura e período de armazenamento das sementes sobre o teor de proteínas

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|-------------|------------------------|---------------|---------|--------|
| TEMPO | 4 | 12476.346855 | 3119.086714 | 9.747 | 0.0000 |
| TRAT | 2 | 8681.609228 | 4340.804614 | 13.565 | 0.0000 |
| TEMPERAT | 2 | 77335.574597 | 38667.787299 | 120.837 | 0.0000 |
| TEMPO*TRAT | 8 | 3856.019194 | 482.002399 | 1.506 | 0.1661 |
| TEMPO*TEMPERAT | 8 | 8843.351892 | 1105.418986 | 3.454 | 0.0016 |
| TRAT*TEMPERAT | 4 | 7744.007550 | 1936.001887 | 6.050 | 0.0002 |
| TEMPO*TRAT*TEMPERAT | 16 | 2887.521339 | 180.470084 | 0.564 | 0.9027 |
| erro | 90 | 28799.882533 | 319.998695 | | |
| Total corrigido | | 134 | 150624.313188 | | |
| CV (%) = | 15.42 | | | | |
| Média geral: | 116.0377037 | Número de observações: | 135 | | |

TABELA 13: Análise de variância do efeito de tratamentos, temperatura e período de armazenamento das sementes sobre o teor de lipídios

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|------------|------------------------|------------|--------|--------|
| TEMPO | 4 | 658.906751 | 164.726688 | 9.117 | 0.0000 |
| TRAT | 2 | 61.229521 | 30.614760 | 1.694 | 0.1895 |
| TEMPERAT | 2 | 1942.369001 | 971.184501 | 53.749 | 0.0000 |
| TEMPO*TRAT | 8 | 150.388378 | 18.798547 | 1.040 | 0.4121 |
| TEMPO*TEMPERAT | 8 | 324.862924 | 40.607866 | 2.247 | 0.0309 |
| TRAT*TEMPERAT | 4 | 281.783977 | 70.445994 | 3.899 | 0.0058 |
| TEMPO*TRAT*TEMPERAT | 16 | 174.408377 | 10.900524 | 0.603 | 0.8736 |
| erro | 90 | 1626.185192 | 18.068724 | | |
| Total corrigido | 134 | 5220.134121 | | | |
| CV (%) = | 7.91 | | | | |
| Média geral: | 53.7343704 | Número de observações: | 135 | | |