

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS/AGRONOMIA

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE SEMENTES DE
Dipteryx alata VOG. NO PROCESSO DE GERMINAÇÃO E
ARMAZENAMENTO

Autora: Glicélia Pereira Silva
Orientadora: Dra. Juliana de Fátima Sales

RIO VERDE-GO
Julho 2017

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS/AGRONOMIA

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE SEMENTES DE
Dipteryx alata VOG. NO PROCESSO DE GERMINAÇÃO E
ARMAZENAMENTO

Autora: Glicélia Pereira Silva
Orientadora: Dra. Juliana de Fátima Sales

Tese apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias/Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – campus Rio Verde – Área de concentração Ciências Agrárias – Agronomia.

RIO VERDE-GO
Julho 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
Ficha elaborada por Igor Yure Ramos Matos – Bibliotecário CRB 1 – 2819

S58a Silva, Glicélia Pereira.

Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Dipteryx alata* Vog. no processo de germinação e armazenamento / Glicélia Pereira Silva. - 2017.

xvii, 63 f.: il., figs, tabs.

Orientadora: Dra. Juliana de Fátima Sales

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Agrárias - Agronomia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, 2017.

Inclui lista de figuras, tabelas, símbolos, siglas, abreviações e unidades.
Inclui biografia.

1. Baru (*Dipteryx alata* Vog.). 2. Semente - Germinação. 3. Semente - Armazenamento. 4. Semente - Cerrado. I. Sales, Juliana de Fátima, orientadora. II. Título.

CDU: 631.53.02(251.3)

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE SEMENTES DE
Dipteryx alata VOG. NO PROCESSO DE GERMINAÇÃO E
ARMAZENAMENTO.**

Autora: Glicélia Pereira Silva
Orientador: Dra. Juliana de Fátima Sales

TITULAÇÃO: Doutor (a) em Ciências Agrárias – Área de concentração
em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 24 de abril de 2017.

Prof. Dr. Jacson Zuchi
Avaliador externo
IFGoiano – Campus Rio Verde

Prof. Dr. Gessimar Nunes Camelo
Avaliador externo
IFMT – Campo Novo Parecis

Prof. Dr. Aurélio Rubio Neto
Avaliador interno
IFGoiano – Campus Rio Verde

Dra. Kelly Juliane Telles Nascimento
Avaliadora externa
IFGoiano – Campus Rio Verde

Profª. Dra. Juliana de Fátima Sales
Presidente da banca
IFGoiano – Campus Rio Verde

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais: José Inácio da Silva
e Maria Luzia Rodrigues Pereira,
meu irmão Gleydson Inácio da Silva
e minha saudosa avó Genoveva Rodrigues Pereira.
dedico!*

*Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu!
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu!
...E então fazer valer a pena cada verso daquele poema sobre acreditar!
(Ana Vilela)*

AGRADECIMENTO

À Deus, por permitir a realização de todas as atividades propostas neste projeto. Agradeço a Ele por me fortalecer nos momentos de extrema angústia e acreditar que este objetivo iria ser alcançado.

Agradeço a minha mãe Maria Luzia, por sonhar em conjunto esta conquista. Agradeço, pelo suporte e paciência nos dias de cansaço. Agradeço ao meu irmão Gelydson Inácio da Silva, pela amizade e cumplicidade. Ao meu pai José Inácio da Silva que embora não estivesse presente sempre foi um grande incentivador dos meus estudos.

Agradeço a minha orientadora Juliana de Fátima Sales, a quem me refiro com muito carinho e amizade. Agradeço, por participar da minha trajetória acadêmica desde à graduação até este momento. Agradeço, ainda pela paciência nos momentos mais inesperado ao longo destes anos. Sem dúvidas, são vínculos que permanecerão por longos períodos.

Agradeço a minha querida amiga Maíra Resende Paixão, a quem considero integrante da minha família. Agradeço também, aos seus pais Gláucia e Ariovaldo por tanto carinho recebido, por abrir as portas de sua casa e me acolher por todos estes anos.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Sementes do IFGoiano, aos alunos de iniciação científica, mestrandos e doutorandos. Agradeço pela colaboração e pela troca de experiências vividas. Agradeço de forma muito especial à Lílian Abadia da Silva, por não ser simplesmente uma integrante do grupo, mas alguém que fez a diferença. Através dos projetos, das novas atividades desenvolvidas e, sobretudo pela simplicidade que ela tem em lidar com próximo. Lílian, te agradeço por teres te tornado uma amiga tão próxima, és um exemplo de amizade que levarei para o resto da vida. Agradeço também

à Karine, Melissa, Ana Lúcia, Moara, Gabriele e todos os outros que de maneira direta ou indireta colaboraram para a realização dos meus trabalhos.

Agraço ao meu co-orientador Jacson Zuchi, pela disposição, orientação e discussão dos trabalhos e pela troca de conhecimentos, sempre pontual e cauteloso nos detalhes da pesquisa. Agradeço ao Gessimar Nunes Camelo, pela parceria, amizade e acima de tudo a forma dinâmica que sempre contagiou o ambiente de trabalho, tornado o nosso dia a dia agradável. Agradeço à Kelly Telles que esteve diretamente envolvida nos experimentos realizados sempre com muita competência e eficiência. Obrigada Kelly, sua participação foi fundamental nesta caminhada.

Agradeço, aos Laboratórios de Anatomia Vegetal em nome do professor Sebastião Vasconcelos, Arthur Almeida e Douglas Almeida, que contribuíram grandemente na proposta deste trabalho. Agradeço também, ao laboratório de Cultura de Tecidos por disponibilizar o espaço físico para a realização dos experimentos, agradeço em nome do professor Fabiano Guimarães Silva que além da coordenação do laboratório está à frente do IFGoiano com tanto afincamento na busca de inovação à pesquisa. Agradeço, ao professor Aurélio Rúbio Neto que ao longo desta caminhada se tornou além de colaborador com nossos projetos um grande amigo.

Agradeço a todos os profissionais do IFGoiano, aos professores e demais servidores que tornam possível a expansão do conhecimento técnico e científico. Agradeço em especial a secretária Vanilda por seu profissionalismo e simpatia.

Agradeço à parceria de, Heloísa, do Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Lavras e ao professor Eduardo Euclides do Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Viçosa. Agradeço a ambos, por nos auxiliar com o desenvolvimento das técnicas de raio x e análises enzimáticas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) ao Ministério da Educação (MEC) e Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação pelo suporte financeiro por meio da aprovação do projeto científico submetido ao edital **MEC/SETEC/CNPq/Nº 94/2013**.

BIOGRAFIA DO AUTOR

GLICÉLIA PEREIRA SILVA, filha de José Inácio da Silva e Maria Luzia Rodrigues Pereira, nasceu em Mineiros, Goiás, aos vinte e dois dias do mês de junho de 1982. Graduiu-se no curso de Licenciatura Plena em Biologia, no ano de 2006, pela Universidade de Rio Verde – UNIRV.

Em 2007, iniciou a dedicação ao ensino fundamental e médio no Colégio Ágape exercendo até o presente momento a profissão de professora de Ciências e Biologia.

Em agosto de 2011 ingressou no Programa de Pós-Graduação *STRICTO SENSU* em Ciências Agrárias, atuando em pesquisas com sementes de espécies nativas do Cerrado.

No dia 24 de junho de 2013, submeteu-se à defesa de dissertação, como requisito fundamental para a obtenção do título de mestre em Ciências Agrárias/Agronomia.

Em setembro de 2013, dando continuidade à pesquisa, ingressou no Programa de Pós-Graduação *STRICTO SENSU* em Ciências Agrárias/Agronomia atuando nos estudos fisiológicos, físicos e bioquímicos de sementes nativas do Cerrado.

Trabalhou na Instituição de Ensino Superior de Mineiros (UNIFIMES) no período de janeiro de 2014 a julho de 2015. Em janeiro de 2017 passou a fazer parte do corpo docente da mesma instituição como professora adjunta nos cursos de Medicina, Engenharia florestal, Agronomia e Engenharia Ambiental.

No dia 24 abril de 2017, submeteu-se à defesa de tese, como requisito fundamental para a obtenção do título de doutora em Ciências Agrárias/Agronomia.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.).....	3
2.2 Sementes Ortodoxas.....	4
2.3 Estresse oxidativo e enzimas removedoras de radicais livres.....	5
2.4 Açúcares não redutores	6
2.5 Hidratação de sementes	7
2.6 Armazenamento de sementes	7
2.7 Uso da análise de imagem de raio x	9
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CAPÍTULO I: ATIVIDADE DE α E β-AMILASE E ESTRESSE OXIDATIVO DE SEMENTES DE <i>Dipteryx alata</i> VOG	14
Resumo.....	14
Abstract.....	15
Introdução.....	16
Material e Métodos	17
Resultados e Discussão.....	22
Conclusões.....	30
Referências Bibliográficas.....	31
CAPÍTULO II: Definição do teste de tetrazólio para o vigor de sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog. (baru) e avaliação da qualidade fisiológica no armazenamento utilizando análise de imagem	35
Resumo.....	35
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	38

Resultados e Discussão.....	40
Conclusão.....	49
Referências Bibliográficas.....	99
CONCLUSÃO GERAL.....	53

ÍNDICES DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I: ATIVIDADE DE α E β-AMILASE E ESTRESSE OXIDATIVO DE SEMENTES DE <i>Dipteryx alata</i> VOG.....	14
Tabela 1: Histoquímica do tegumento e endosperma de sementes de baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.....)	26
CAPITULO II: DEFINIÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA O VIGOR DE SEMENTES DE <i>DIPTERYX ALATA</i> VOG. (BARU) E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA NO ARMAZENAMENTO UTILIZANDO ANÁLISE DE IMAGEM.....	35
Tabela 1: Tabela 1. Classificação de sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog. pelo teste de tetrazólio em função do tempo de exposição e de diferentes concentrações da solução padrão. Viável muito vigorosa (VMV), viável vigorosa (VV), viável pouco deteriorada (VPD), viável muito deteriorada (VMD) e inviável (INV). (Lote de 2014).....	41
Tabela 2: Classificação de sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog. pelo teste de tetrazólio em função do tempo de exposição e de diferentes concentrações da solução padrão. Viável muito vigorosa (VMV), viável vigorosa (VV), viável pouco deteriorada (VPD), viável muito deteriorada (VMD) e inviável (INV). (Lote de 2015).....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	1
Figura 1. (A) Planta adulta de <i>Dipteryx alata</i> Vog. (baru), com aproximadamente 20 m de altura. (B) Frutos maduros de baru coletados em julho de 2014 no Município de Portelândia-Go. (C) Sementes de baru, após a extração feita com prensa manual. (D) Plântulas de baru obtidas após 30 dias de emergência. Imagens registradas com câmera Nikon Coolpix L810 26 Optical zoom por Glicélia Pereira Silva, nos anos de 2014 e 2015.....	4
CAPÍTULO I: ATIVIDADE DE α E β-AMILASE E ESTRESSE OXIDATIVO DE SEMENTES DE <i>Dipteryx alata</i> VOG	16
Figura 1. Ganho de massa (g) nas sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog., durante absorção de água por até 196 horas de embebição.....	23
Figura 2. A) Atividade da enzima α -amilase e B) β -amilase. Em sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog. submetidas a 196 horas de absorção de água.....	24
Figura 3. Análise histoquímica das sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog. (A, B e C) Coloração com sudan III, para identificação de compostos lipídicos. (D, E e F). Coloração com xilidine ponceau (XP), para identificação de carboidratos totais. (G, H e I) Coloração com PAS para identificação de carboidratos totais. Alta intensidade dos compostos (A, D e G), média intensidade (B, E e H) e baixa intensidade (C, F e I).....	25
Figura 4. A) Taxa respiratória e B) teor de água. Em sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog. submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por 0, 48, 72 e 96 horas.....	26
Figura 5. Condutividade elétrica em sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog. submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por 0, 48, 72 e 96 horas.....	27
Figura 6. A) Concentração de proteína total e B) atividade da superóxido dismutase (SOD). Em sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog. submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por 0, 48, 72 e 96 horas.....	28

Figura 7. A) atividade da catalase (CAT) e B) atividade da peroxidase (POX). Em sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog. submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por 0, 48, 72 e 96 horas.....	29
Figura 8. A) Porcentagem de germinação e B) índice de velocidade de germinação. Em sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog. submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por 0, 48, 72 e 96 horas.....	30
CAPÍTULO II: DEFINIÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA O VIGOR DE SEMENTES <i>Dipteryx alata</i> VOG. (BARU) E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA NO ARMAZENAMNETO UTILIZANDO ANÁLISE DE IMAGENS.....	35
Figura 1. Avaliação de tetrazólio em <i>Dipteryx alata</i> Vog. (I) concentração 0,05 %, (II) concentração 0,075 %, (III), concentração 0,10 %. A) semente muito vigorosa, B) semente vigorosa pouco deteriorada, C) semente muito deteriorada; D) semente inviável.....	43
Figura 2. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog. (A) semente com necrose nos tecidos do endosperma indicado pela seta. (B e C) danos provocados por umidade indicados pela seta na região do embrião.....	43
Figura 3. A) Detalhes evidenciados pela seta indicam danos mecânicos e B) e C) danos provocados por insetos nas sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog.....	43
Figura 4. Teor de água de sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog., armazenadas em B.O.D a 10 e 20 °C por 12 meses.....	44
Figura 5. Condutividade elétrica de sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog., armazenadas em B.O.D a 10 e 20 °C, por 12 meses.....	46
Figura 6. Comparação de imagem de raios x nas sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog., e suas respectivas plântulas provenientes do armazenamento em B.O.D a 10 °C, durante 12 meses.	47
Figura 7 A) Porcentagem de germinação e B) porcentagem de plântulas normais de sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog., após o armazenamento em B.O.D a 10 e 20 °C, por 12 meses.....	48
Figura 8: Porcentagem de emergência de plântulas de <i>Dipteryx alata</i> Vog., após o armazenamento em B.O.D a 10 e 20 °C por 12 meses.....	49

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

APX.....	Ascorbato peroxidase
B.O.D.....	Câmara de germinação a seco
b.u.....	Base úmida
CaCl ₃	Cloreto de cálcio
CAT.....	Catalase
CE.....	Condutividade elétrica
CO ₂	Dióxido de carbono
DHAR.....	Dehidroascorbato redutase
EDTA.....	Ácido etilenodiaminotetracético
EROS.....	Espécies reativas de oxigênio
GERM.....	Germinação
GM.....	Ganho de massa
GPX.....	Guaiacol peroxidase
GPOX.....	Glutadiona peroxidase
GR.....	Glutadiona redutase
HCl.....	Ácido Clorídrico
H ₂ O ₂	Água oxigenada
IVG.....	Índice de velocidade de germinação
KOH.....	Hidróxido de potássio
LEA.....	Late embryogenesis abundants
MDH.....	Malato desidrogenase
MDHAR.....	Monodehidroascorbato reutase
Mi.....	Massa inicial
Mf.....	Massa final
mL.....	Mililitros
N ₂	Nitrogênio líquido
NBT.....	Azul de p-nitro tetrazólio
O ₂	Oxigênio
OH.....	Hidroxil
PAS.....	Carboidratos totais
Pf.....	Peso final
pH.....	Potencial de hidrogênio
PMSF.....	Phenyl methyl sulfonyl fluoride
POX.....	Peroxidase

PVPP.....	Polivinilpirrolidona
SOD.....	Superóxido dismutase
TAi.....	Teor de água inicial
TAf.....	Teor de água final
TR.....	Taxa respiratória
XP.....	Xilidine ponceau

RESUMO

SILVA, GLICÉLIA PEREIRA. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde – GO, julho de 2017. **Alterações Fisiológicas e Bioquímicas de Sementes de *Dipteryx alata* Vog. no Processo de Germinação e Armazenamento.** Orientadora: Juliana de Fátima Sales, Coorientador: Jacson Zuchi.

Um dos meios mais viáveis para preservar a vegetação nativa e manter as características genéticas é através da criação de bancos de sementes. Esta estratégia permite, além da manutenção da espécie, promover o conhecimento acerca da qualidade fisiológica e do vigor das sementes por um determinado tempo. Objetivou-se com o presente estudo avaliar o comportamento das sementes de *Dipteryx alata* Vog. (baru) na retomada do processo germinativo observando as fases no período de embebição. Para isto, foi avaliado em intervalos de 0 a 196 horas de embebição a atividade das enzimas α -amilase e β -amilase. Foram realizados estudos histoquímicos dos compostos presentes nas sementes bem como as alterações destes compostos durante a germinação. Para avaliar a resistência das sementes desta espécie realizou-se o envelhecimento acelerado em quatro tempos, sob temperatura e umidade relativa controlada. Durante a realização do teste estimou-se o estresse oxidativo por meio das enzimas catalase (CAT), superóxidodismutase (SOD), peroxidase (POX) e proteínas totais. Além disso, foram efetuados os testes de respiração, condutividade elétrica, germinação e índice de velocidade de germinação para avaliar o vigor das sementes diante das condições submetidas. A fim de se estabelecer novos protocolos de testes fisiológicos para as sementes florestais foi conduzido o teste de tetrazólio sob diferentes concentrações e tempos de embebição, determinando várias classes de vigor para esta espécie. Quanto ao armazenamento, as sementes foram mantidas em potes de vidro hermeticamente

vedados por 12 meses nas temperaturas de 10 e 20 °C. O período de avaliação ocorreu a cada três meses. Nestes intervalos avaliou-se a emergência de plântulas, teste de raios x, germinação e condutividade elétrica. Foi possível concluir que as sementes de baru na retomada da germinação expressam a atividade das principais enzimas relacionadas a síntese de “novo” e que estas promovem a mobilização das reservas para o eixo embrionário em aproximadamente 50 horas de embebição. Sendo possível caracterizar o padrão trifásico durante a embebição das sementes na germinação. Ao final de 196 horas, quando se encerrou a terceira fase da curva, observou-se grande consumo de carboidratos e proteínas que culminou com a formação da raiz primária. Concluiu-se também que mesmo diante de condições desfavoráveis as sementes de baru possuem aparatos bioquímicos eficientes na defesa de radicais livres e na peroxidação de lipídios. Já as sementes armazenadas por 12 meses a 10 e 20 °C se mantiveram viáveis com boa qualidade fisiológica, comprovada por meio dos testes de vigor realizados. O uso das imagens de raios-x permitiu a avaliação das sementes durante todo o período de armazenamento e não foi detectado nenhum dano proveniente do armazenamento nem mesmo danos à própria estrutura das sementes.

PALAVRAS-CHAVE: enzimas, envelhecimento acelerado, armazenamento

ABSTRACT

SILVA, GLICÉLIA PEREIRA. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde – GO, julho de 2017. **Physiological and Biochemical Changes of *Dipteryx alata* Vog. in the Germination and Storage Process.** Orientadora: Juliana de Fátima Sales, Coorientador: Jacson Zuchi.

One of the most viable means to preserve native vegetation and maintain genetic characteristics is the creation of seed banks. This strategy allows, besides the species maintenance, to promote the knowledge about physiological quality and seeds' vigor for a certain time. This study aimed to evaluate the behavior of *Dipteryx alata* Vog. seeds (baru) in the germination process resumption, observing the phases in the soaking period. For this purpose, the activity of the α -amylase and β -amylase enzymes was evaluated at soaking intervals of 0 to 196 hours, as well as histochemical studies of the compounds present in the seeds and their changes during the germination were carried out. To evaluate the seeds' resistance of this species, the accelerated aging was carried out in four times, under temperature and controlled relative humidity. During the test, oxidative stress was estimated using the catalase (CAT), superoxydodismutase (SOD), peroxidase (POX), and total proteins enzymes. In addition, tests of respiration, electrical conductivity, germination, and germination speed index were made to evaluate seeds' vigor under the submitted conditions. To establish new protocols of physiological tests for forest seeds, tetrazolium test was carried out under different concentrations and soaking times, determining various vigor classes for this species. As for storage, the seeds were kept in hermetically sealed glass jars for 12 months under 10 and 20 °C temperatures. Evaluation period occurred every three months. In these intervals, the seedling emergence, X-ray test, germination, and electrical conductivity were evaluated. It was possible to conclude that the baru seeds in the germination resumption express the activity of the main enzymes related to the synthesis of "new",

promoting the reserves mobilization to the embryonic axis under soaking for approximately 50 hours, making possible to characterize the three-phase pattern during seed soaking at germination phase. After 196 hours, end of the third curve's stage, it was observed a great carbohydrates and proteins consumption, culminating with the primary root formation. It was also concluded that, even under unfavorable conditions, baru seeds have efficient biochemical devices in the defense of free radicals and in the lipid peroxidation. Seeds stored for 12 months under 10 and 20 °C temperatures remained viable with good physiological quality, verified by vigor tests. The use of the X-ray images allowed seeds evaluation during all the storage period, and no damage from the storage process was detected, nor even to the seeds structure itself.

KEYWORDS: enzymes, accelerated aging, storage

1. INTRODUÇÃO GERAL

As espécies florestais da região do Cerrado de modo geral têm contribuído para a produção de alimentos, fibras e outros produtos que, sobretudo intensificam a economia local. As frutíferas do Cerrado se destacam com potencial agrícola pela grande produção de frutos, consumidos de diversas maneiras. Os frutos possuem cores atrativas e sabores característicos, além do alto valor nutricional em proteínas, sais minerais, vitaminas e exploração de recursos farmacológicos (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006; VERA *et al.*, 2005).

Embora, a extensão territorial represente cerca de dois milhões de quilômetros quadrados, apenas 2,2% de área é legalmente protegida, por isso, atualmente o Cerrado tem recebido atenção especial da comunidade científica, visto que se encontra entre os 25 *hotspots* do mundo. (KLINK; MACHADO, 2005; BRANNSTROM *et al.*, 2008).

Diante disto, é necessário criar estratégias que visem à conservação e manutenção das sementes de diferentes espécies em germoplasmas e bancos de sementes para garantir a formação e sobrevivência das plântulas (KOAHAAMA *et al.*, 2006).

A conservação *ex situ* de sementes contribui com a manutenção dos bancos de germoplasmas em todo o mundo, principalmente para espécies de grandes culturas com interesse econômico. No entanto, muitas espécies florestais, incluindo as espécies do Cerrado têm sido inseridas em programas que geram renda para agricultura familiar de pequenos produtores, sendo consideradas espécies de potencial agrícola, agroindustrial e agroenergético. Além disso, a produção de mudas de espécies florestais para a recuperação de áreas degradadas é um fator limitante para os viveiristas que

desconhecem os principais mecanismos fisiológicos das sementes (WALTERS *et al.*, 2005; NAGEL; BÖRNER, 2010; VIJAYAN *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2009).

Neste sentido, o armazenamento de sementes pode contribuir para formação de germoplasmas com valiosas informações sobre a diversidade genética (BORNER, 1990), fortalecendo a política ambiental sobre a demanda de espécies nativas para a recuperação dos ecossistemas (CARVALHO *et al.*, 2006). Porém, a manutenção de tais espécies exige maior conhecimento do comportamento das sementes em relação à longevidade e aos danos que ocorrem no armazenamento. Portanto, as informações disponíveis ainda são insuficientes para direcionar estratégias de conservação voltadas ao interesse social, econômico e sustentável devido à diversidade genética das espécies (COSTA, 2009).

Os estudos relacionados à tolerância à dessecação são complexos, envolvendo a interação de ajustes metabólicos e estruturais, permitindo que as células resistam a perdas consideráveis de água sem a ocorrência de prejuízos acentuados (MARCOS-FILHO, 2005). Com o início da dessecação há uma mudança na expressão gênica em sementes, em que os genes que codificam moléculas de proteção tem papel importante nesse período (RAMANJULU; BARTELS, 2002).

A fase de aquisição de tolerância à dessecação, ou a habilidade para tolerar potenciais de água muito baixos, estão correlacionada ao acúmulo de vários componentes protetores, incluindo açúcares e proteínas (WALTERS *et al.*, 2002). Entre os mecanismos que colaboram para a manutenção da viabilidade das sementes, destacam-se a presença de açúcares solúveis e de enzimas que atuam contra o sistema de oxidação lipídica, anti-oxidantes e de proteínas específicas (LEA proteínas) que se acumulam na fase de aquisição e a manutenção da tolerância à dessecação, conferindo proteção contra as consequências da perda de água, em diferentes níveis de hidratação (ANGELOVICI *et al.*, 2010).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Baru (*Dipteryx alata* Vog.)

O baru é uma espécie nativa do Cerrado que se destaca pela potencialidade de recursos, econômico, madeireiro, alimentício e oleicos entre outros, pode ser utilizado para reflorestamento de áreas impactadas pelas atividades agroindustriais (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Entre as espécies do Cerrado o barueiro se destaca pela ampla distribuição, principalmente em áreas mais secas. É a única espécie do gênero *Dipteryx* encontrada no Cerrado, podendo ocorrer outras espécie do gênero em outras regiões (SOARES *et al.*, 2008).

O baru pertence à família Fabaceae, as árvores atingem em média 15m de altura, podendo atingir até de 25m (Figura 1). O tronco é liso com casca de cor cinza-claro, as folhas são alternas, pecioladas sem estípulas e o número de folíolos varia entre 7 e 12. O fruto é do tipo drupa, ovoide, levemente achatado, de cor marrom sem alteração da coloração quando maduro, o endocarpo é lenhoso e tem uma única semente por fruto (VIEIRA *et al.*, 2010).

A espécie ocorre principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, reconhecida popularmente como, baru, cumbaru, barujo, cumaru, cumarurana entre outros. O fruto é bastante consumido, por ter polpa rica em proteínas e as sementes além de oleaginosas são constituídas por amido e fibras, utilizadas como fonte nutricional e propriedades medicinais (MACIEL; TAVARES, 2010).

O óleo extraído das sementes de baru tem grande importância na medicina popular atuando como fator antirreumático, sua polpa é consumida não só pela população humana como também, serve de alimento para animais silvestres e o rebanho bovino (CORRÊA *et al.*, 2000).

A espécie é considerada espécie chave para o Cerrado, tem alta taxa de germinação e estabelecimento de mudas, sendo assim promissora na recuperação de reservas legais e áreas de proteção permanentes. Entretanto, pela forma extrativista que os frutos são adquiridos são necessários estudos que envolvam o manejo e conservação, garantindo sua sobrevivência (SOARES *et al.*, 2008).



Figura 1: (A) Planta adulta de *Dipteryx alata* Vog. (baru), com aproximadamente 20 m de altura. (B) Frutos maduros de baru coletados em julho de 2014 no Município de Portelândia-Go. (C) Sementes de baru, após a extração feita com prensa manual. (D) Plântulas de baru obtidas após 30 dias de emergência. Imagens registradas com câmera Nikon Coolpix L810 26 Optical zoom por Glicélia Pereira Silva, nos anos de 2014 e 2015. *Barra 1 cm

2.2 Sementes Ortodoxas

O termo tolerância à dessecação foi introduzido inicialmente por Roberts (1973), que considerou duas classes distintas em relação à tolerância de desidratação das sementes. Em relação a este parâmetro, as sementes foram classificadas em ortodoxas e recalcitrantes. É importante ressaltar que o processo de tolerância à dessecação é prerequisite necessário para a conclusão do ciclo de vida das sementes. Neste caso, as sementes ortodoxas garantem a sobrevivência durante a secagem, mesmo em níveis abaixo de 7% do teor de água sem danos à viabilidade podendo ser armazenadas por períodos prolongados. No entanto, o momento exato em que as sementes adquirem sua dessecação depende da espécie, da taxa de perda de água e do teor final após a secagem (SAMARAH, 2009).

O regulamento fisiológico que leva à indução da tolerância ainda é desconhecido, mas sabe-se que várias atividades estão associadas à aquisição de tal comportamento. As sementes secas entram em um período de quiescência até a

reativação do metabolismo e posterior à germinação. (SAMARAH, 2009; ANGELOVICI *et al.*, 2010), ocasionando nas sementes uma série de eventos celulares e bioquímicos de proteção às membranas, incluindo o acúmulo de dissacarídeos, oligossacarídeos, síntese de proteínas, e a ativação de antioxidantes (ANGELOVICI *et al.*, 2010).

2.3 Estresse oxidativo e enzimas removedoras de radicais livres

A perda de viabilidade durante a dessecação de diversas sementes sensíveis a esta fase é acompanhada por um aumento na peroxidação de lipídios e acúmulo de radicais livres. Esses radicais livres podem reagir com peróxidos de hidrogênio, produzindo oxigênio singleto e radical hidroxil (OH⁻), tóxicos às células capazes de danificar constituintes celulares, como, proteínas, DNA's e membranas. Os radicais livres se acumulam porque os sistemas removedores não são efetivos em organismos desidratados (BOUDET *et al.*, 2006).

As principais enzimas utilizadas nas vias de limpeza das EROs em plantas são: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPOX) e guaiacol peroxidase (GPX) (EDREVA, 2005; MITTLER, 2002).

As moléculas removedoras de radicais livres incluem antioxidantes lipossolúveis (ácido ascórbico, glutatona). As sementes contêm altas concentrações de tais substâncias variando em diferentes tecidos e diferentes sementes. Sistemas enzimáticos processadores de radicais livres incluem superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação de superóxido (O₂⁻) em H₂O₂ e O₂ e aquelas enzimas envolvidas na desintoxicação de H₂O₂ (isto é, catalase, glutatona redutase, ascorbato e outras peroxidases).

É provável que sistemas enzimáticos estejam envolvidos em uma resposta anti-oxidante inicial pela neutralização do oxigênio ativado, potencialmente tóxico, formado durante a restrição hídrica (EDREVA, 2005).

Alterações nos padrões da enzima esterase evidenciam a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução na germinação das sementes à medida que são aumentados os níveis de fatores adversos de temperatura e teor de água das sementes, pois a esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de

ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios (SANTOS *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005).

2.4 Açúcares não redutores

De acordo com Guimarães *et al.* (2002), inúmeras evidências apoiam a visão de que açúcares agindo como “substitutos de água” podem desempenhar papel-chave na aquisição de tolerância à dessecação em sementes, por proteger membranas de mudanças de fase lipídica induzida por dessecação e também proteger proteínas, e pela formação de vidro a temperaturas fisiológicas.

Entre os carboidratos solúveis presentes principalmente em tecidos vivos tais como embriões e cotilédones, estão incluídos alguns monossacarídeos e dissacarídeos, principalmente a sacarose e oligossacarídeos, entre eles, a rafinose, estaquiase ou verbascose. Estes carboidratos, além da função de reserva, podem atuar na estabilidade das membranas durante a dessecação e a retomada do crescimento embrionário (HELLMANN *et al.*, 2008).

Na maioria das sementes ortodoxas, a sacarose, os oligossacarídeos da família rafinose e os monossacarídeos contribuem com 1 a 12% da matéria seca. Nas sementes ortodoxas maduras, o conteúdo de sacarose varia entre 15 e 90% dos carboidratos solúveis, sendo encontrado vestígio de monossacarídeos. O acúmulo de açúcares não reduzidos está envolvido na tolerância à dessecação. Tecidos tolerantes são caracterizados por apresentarem alta quantidade de sacarose e oligossacarídeos (estaquiase ou rafinose), e ausência ou reduzida quantidade de monossacarídeos redutores, como a galactose, manose, frutose e glicose (PUKACKA *et al.*, 2009).

Durante a desidratação, açúcares específicos podem prevenir os efeitos danosos da dessecação sobre as membranas celulares, na medida em que formam ligações de hidrogênio, repondo a água normalmente associada com as superfícies das membranas, mantendo assim o espaçamento dos grupos de lipídios, evitando a transição da fase líquida cristalina para a fase gel (BUTINK; LEPRINCE, 2004). A sacarose pode ter a função de manter a estrutura da bicamada líquida cristalina da membrana, em níveis baixos de hidratação.

2.5 Hidratação das sementes

A reativação do metabolismo celular é um período importante na viabilidade das sementes culminando com diversas manifestações fisiológicas essenciais para o processo de germinação. A germinação é considerada uma sucessão de eventos bioquímicos que partem de um estado inerte, quiescente e de baixo teor de água que as sementes se encontram antes da emergência do embrião (MARCOS-FILHO, 2015).

Neste sentido, a água é o fator mais importante, pois determinará a velocidade da germinação, sendo, que quanto maior a disponibilidade, mais rápido será o processo de embebição (CARVALHO; NAKAGAWA, 1983). Por isso, a fase de pré-embebição é um ponto crítico no estudo de sementes. É necessário o conhecimento das características químicas e físicas da espécie. Inicialmente a embebição ocorre pelas paredes celulares e em seguida, ativa macromoléculas que estão contidas nos tecidos de reservas em estado seco (BEWLEY; BLACK, 1994; BRADFORD, 1995; GUIMARÃES *et al.*, 2008).

O acúmulo dos compostos químicos nos tecidos de reservas das sementes é fundamental para impulsionar a formação do embrião logo após a hidratação da semente. Desta forma, os carboidratos e os lipídios servem como fonte de energia para a formação de plântulas (BUCKERIDGE *et al.*, 2004; CORTE *et al.*, 2006). Assim, a mobilização das reservas pode ser estimada por técnicas microscópicas que permitem avaliar as estruturas internas de corpos proteicos, lipídicos e dos carboidratos no preparo de formação radicular, culminado com a germinação das sementes (CORTE *et al.*, 2009).

2.6 Armazenamento de sementes

O armazenamento de sementes é um mecanismo seguro, viável e econômico para a conservação da diversidade genética de espécies vegetais. A preservação da qualidade fisiológica das sementes é fundamental para a manutenção do processo de repovoamento da vegetação em áreas degradadas, permitindo o uso de espécies vegetais em diferentes locais e período (KOHAMA *et al.*, 2006).

Esta prática compreende a formação de bancos de sementes, germoplasmas, e coleção de sementes *in situ* que ficam sob a influência do ambiente de origem em condições não controladas. No entanto, o armazenamento *ex situ* de algumas espécies se

torna possível por longos períodos, sem danos à sua viabilidade, toleram a desidratação e se mantêm em diferentes condições de temperatura (NAGEL *et al.*, 2009).

A temperatura e o teor de água são fatores determinantes no armazenamento, ambos influenciam diretamente vários aspectos biológicos, como aumento da atividade respiratória, que conseqüentemente desencadeia a proliferação de microrganismos provocando a deterioração das sementes (COSTA, 2009).

A temperatura atua diretamente sobre o processo de germinação, embora esta característica esteja associada às condições ambientais em que cada indivíduo se desenvolve, não havendo uma temperatura ideal para todas as espécies. No Cerrado, a temperatura na qual ocorre maior porcentagem de germinação está entre 25 e 35 °C. Levando em conta as características morfológica de cada semente e das particularidades do clima e da região, são necessárias mais investigações sobre o ambiente e temperatura adequada para as sementes florestais (BRANCALION *et al.*, 2010).

Vários fatores podem afetar a qualidade fisiológica das sementes, como por exemplo, manuseio, colheita, beneficiamento, armazenamento e secagem. No entanto, a redução do teor de água como resultado da secagem irá diminuir o metabolismo e conseqüentemente prolongar o período de armazenamento (ZONTA *et al.*, 2011).

Neste sentido, a redução do teor de água para prolongar a longevidade de espécies vegetais se faz necessária (KOAHAAMA *et al.*, 2006). Deve-se também considerar a composição química das diferentes espécies, que determina o estado fisiológico das sementes durante e após o armazenamento. Considerando o estado físico da água em sementes, cuja composição química se caracteriza pela maior presença de amido (amiláceas), haverá maior afinidade com as ligações químicas entre a água e as moléculas de amido, enquanto as sementes oleaginosas repelem estas ligações (VERTUCCI; ROOS, 1990; MARCOS FILHO, 2005).

Assim, a umidade relativa do ar, o teor de água e a temperatura atuam em conjunto determinando o equilíbrio higroscópico específico, garantindo a qualidade fisiológica por maior ou menor tempo. Estudos envolvendo temperatura e umidade do ar são cada vez mais frequentes, incluindo as espécies florestais, que por sua vez carecem de informações sobre o assunto, fortalecendo os programas de repovoamento de áreas impactadas (BORGES *et al.*, 2009; SCALON *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2009).

2.7 Uso da análise de imagens por raios x

O teste de raios x, atualmente tem sido considerado uma ferramenta acessível para avaliar danos nas sementes. A utilização do teste permite a visualização de danos mecânicos e até mesmo de danos provenientes da formação da semente (ARRUDA, 2012).

O teste criado na década de 50 por Simak e Gustafon, tem sido introduzido e recomendado na análise de sementes pela ISTA, para auxiliar nos estudos morfológicos e fisiológicos (MELO, 2009).

A otimização do teste de raios x depende de vários parâmetros. O resultado obtido nas imagens depende do tamanho, da espessura, densidade, composição, disposição e intensidade do comprimento de onda aplicado à semente sobre o filme radiográfico (BINO *et al.*, 1993; ISTA, 1999). O princípio da técnica consiste na absorção dos raios pelos tecidos da semente. No instante em que os raios ultrapassam a semente e atingem o filme, é gerada uma imagem em duas dimensões. As partes mais escuras, representam a área onde os raios penetraram com mais facilidade e as partes mais claras, delimitam as regiões onde os tecidos são mais densos (SIMAK, 1991; ARRUDA, 2012).

Por isso, a técnica de imagens de raios x tem sido potencialmente utilizada para a interpretação de dados que correlacionem a qualidade morfológica das sementes com os testes fisiológicos. Uma vez que, o uso dos raios não compromete a viabilidade da semente. Por utilizar baixas intensidades de radiação, é uma técnica vantajosa para avaliar a viabilidade das sementes (CARVALHO *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2013; COPELAND; McDONALD, 1985).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELOVICI, R.; GALILI, G.; FERNIE, A. R.; FAIT, A. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, v.15 n.4, p.211-218, 2010.

ARRUDA, N. Avaliação da estrutura e do potencial fisiológico de sementes de crotalária por meio de recursos de análise de imagens. Piracicaba, Dissertação (Mestre em Fitotecnia) **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, 2012.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. New York: Plenum Press. 1994.

- BINO, R.J.; ARTSE, J.W.; VAN DER BURG, W.J. Non destructive X-ray of *Arabidopsis* embryo mutants. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, p.167-170, 1993.
- BORGES, S.; BORGES, E. E. L.; CORREA, P. C.; BRUNE, A. Equilíbrio higroscópico e viabilidade de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina* (L.) Speng) em diferentes condições ambientais de armazenamento. **Scient. Forest.**, v.37, n.84, p.475-481, 2009.
- BONNER, F. T. Storage of seeds: Potencial and limitantes for germoplasm conservation. **Foreste and Management**, v.35, p.35-43, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRADFORD, K. J. Water relations in seed germination. In: KIJEL, J.; GALILI, G. (ed.) **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, p.351-395, 1995.
- BRANCALION, P. H. S; NOVENBRE, A. D. L. C; RODRIGUES, R. R. Temperatura ótima de germinação de espécies arbóreas brasileiras. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n. 4, p.015 – 021, 2010.
- BRANNSTROM, C.; JEPSON, W.; FILIPPI, A, M.; REDO, D.; XU, Z.; GANESH, S. Land change in the Brazilian Savana (Cerrado), 19986-2002: comparative analysis and implication for land-use policy. **Land Use Policy**, v.25, p.579-595, 2008.
- BUITINK J.; LEPRINCE, O. Glass formation in plant anhydro-biotes: survival in the dry state. **Cryobiology**, v.48, p.215–28, 2004.
- BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINE, M. A. S. Acumulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p.31-50, 2004.
- CARVALHO, F. M. V.; MARCO JÚNIOR, P.; FERREIRA, L. G. The Cerrado into-pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. **Biological Conservation**, v.142, p. 1392-1403, 2009.
- CARVALHO, M. L. M.; ALVES, R. A.; OLIVEIRA, L. M.; Radiography analysis in castor bean seeds (*Ricinus communis* L.) **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.170-175, 2010.
- CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.2, p.15-25, 2006.
- CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargil, p.429, 1983.

- COPELAND, L. O.; MC DONALD, M.B. Principles of seed science and technology. 2.ed. New York: **Macmillan**, p.321, 1985.
- COSTA, C. J. Armazenamento e conservação de sementes de espécies do Cerrado. **Embrapa Cerrados DF**, 2009.
- CORRÊA, G. C.; ROCHA, M. B.; NAVES, R. V. Germinação de sementes e emergência de plântulas de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nos Cerrados do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v.30 n. 2, p. 17-23, 2000.
- 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). **Brazilian Journal of Forest Science**, v.30, p.941-949, 2006.
- CORTE, V.B.; VENTRELL, M.C.; BORGES, E.E.C.; PONTES, C.A.; PINHO, D. Histochemical and ultrastructural study of *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae) Seeds. **Revista Árvore**, v.33, n.5, p.873-883, 2009.
- EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture. Ecosystem. Environ.** v.106, p.119-1133, 2005.
- GUIMARÃES, M.A.; DIAS, D.C.F.; LOUREIRO, M.E. Hidratação de Sementes. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v.2, n.1, p.30-39, 2008.
- GUIMARÃES, R.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; FRAGA, A.C.; VON PINHO, E.V.R.; FERRAZ, V.P. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.1, p. 128-139, 2002.
- HELLMANN, M.E.; MELLO, J.I.O.; BARBEDO, C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Variações dos carboidratos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) armazenadas sob diferentes temperaturas. **Hoehnea**, v.35, n.2, p.255-264, 2008.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). International Rules for Seed Testing. **Seed Science and Technology**, Supplement, v.27, p.333, 1999.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v.19, n.3, p.707-713, 2005.
- KOHAMA, S.; MALUF, A. M.; BILIA, D. A. C; BARBEDO, C. J. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliense* LAM. (Gruxumeira). **Revista Brasileira de Sementes**. v.28, n.1, p.72 – 78, 2006.
- LIMA, L.K.S.; DUTRA, A.S.; BARROS, G.L. Utilização da técnica na avaliação de sementes por imagem. **Revista Agropecuária no SemiÁrido**, v.9, n.3, p.01-06, 2013.
- MACIEL, P. M. C; TAVARES, M. I. B. Solid State and Proton Relaxation NMR Study of *Dipteryx alata* Vogel. **Journal. of Appl. Polyce. Science.**, v.116, p. 50–54, 2010.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. Piracicaba: Fealq. p. 495, 2005.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. Londrina: ABRATES, p.659, 2015.

MARTINS, L; LAGO, A. A; ANDRADE, A. C. S. Armazenamento de sementes de ipê branco teor de água e temperatura do ambiente. **Revista Bragantia**. v.68, n.3, p.775-780, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, n.9, p.405-410, 2002.

MELO, P.R.B.; OLIVEIRA, J.A.; CARVALHO, M.L.M.; GUIMARÃES, R.M.; CARVALHO, B.O.; Aplicação do teste de raios x no estudo da morfologia interna e da qualidade fisiológica de aquênios de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.146-154, 2009.

NAGEL, M.; VOGEL, H.; LANDJEVA, S.; BUCK-SORLIN, G.; LOHWASSER, U.; SCHOLZ, U.; BÖRNER, A. Seed conservation in *ex situ* genebanks-genetic studies on longevity in barley. **Euphytica**, v.170, p.5-14, 2009.

OLIVEIRA, A. N.; SILVA, A. C.; ROSADO, S. C. S.; RODRIGUES, E. A. C. Variações Genéticas Para Características do Sistema Radicular de Mudanças de Baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Revista Árvore**, v.30, n.6, p.905-909, 2009.

PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E.; KALEMBA, E. Non-reducing sugar levels in beech (*Fagus sylvatica*) seeds as related to withstanding desiccation and storage. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.1381-1390, 2009.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant Cell and Environment**, v. 25, n. 2, p. 141-151, 2002.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista. Ciências. Médicas, e Biológicas**. v.5, n.3, p.253-260, 2006.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499-514, 1973.

SAMARAH, N. H.; AL-MAHASNEH, M. M.; GHOSHEH, H. Z.; ALQUDAH, A. M.; TURK, M. The influence of drying methods on the acquisition of seed desiccation tolerance and the maintenance of vigour in Wheat (*Triticum durum*). **Seed Science and Technology**, v.38, p.193-208, 2009.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. V. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.110-119, 2004.

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

SCALON, S. P. Q.; NEVES, S. E. M.; MASETO, T. E.; PEREIRA, Z. V. Sensibilidade à dessecação e o armazenamento em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. (uvaia). **Revista brasileira sementes**, v.34, n.1, p.269-276, 2012.

SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by radiography. In; Gordon, A. G.; GOSLING, P.; WANG, B. S. P. (Ed.) **Tree and shrub seeds handbook**. Zurich, ISTA, p.1-28, 1991.

SOARES, T. N.; CHAVES, L. J.; TELLES, M. P. C.; DINIZ FILHO, J. A. F.; RESENDE, L. V. Distribuição espacial da variabilidade genética intrapopulacional de *Dipteryx alata*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43 n.9, p.1151-1158, 2008.

VERA, R.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L.; CHAVES, L. J.; LEANDRO, W. M.; SOUZA, E. R. B. Caracterização física de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* CAMB.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.35 n.2, p.71-79, 2005.

VERTUCCI, C. W; ROOS, E. E. Theoretical basis of protocols for seed storage. **Plant Physiology**, v.94, p.1019-1023, 1990.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINE-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R. Frutas nativas da região centro-oeste do Brasil. **Embrapa**, DF. 1ª Ed, 2010.

VIJAYAN, K.; SARATCHANDRA, B.; SILVA, J. A. T. Germplasm conservation in mulberry (*Morus* spp.). **Scientia Horticulturae**, v.128, p.371-379, 2011.

WALTERS, C.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Desiccation and Damage. In: **Black, M.; Pritchard, H. W.** (eds.) Desiccation and survival in plants. Drying without dying, p.263–291, 2002.

WALTERS C.; WHEELER, L. M.; GROTENHUIS, J. M. Longevity of seeds storage in a genebank: species characteristics. **Seed Science Research**. v.15, p.1-20, 2005.

ZONTA, J. B.; ARAUJO, E. F.; ARAUJO, R. F.; DIAS, L. A. S. Diferentes tipos de secagem: efeitos na qualidade fisiológica de sementes de pinhão manso. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.721-731, 2011.

CAPÍTULO I

ATIVIDADE DE α E β -AMILASE E ESTRESSE OXIDATIVO DE SEMENTES DE *Dipteryx alata* VOG.

(Revista Ciência Agronômica)

ACTIVITY OF α AND β -AMYLASE AND OXIDATIVE STRESS OF *Dipteryx* *alata* VOG. SEEDS

RESUMO: O baru, espécie nativa do Cerrado, destaca-se pela aplicabilidade de suas sementes como potencial alimentício, nutricional e medicinal. As sementes do barueiro são classificadas como ortodoxas. No entanto, existem poucos estudos sobre a qualidade e o desempenho fisiológico sobre as sementes em diferentes condições. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade das sementes durante a germinação e mensurar os danos ocorridos no envelhecimento acelerado. Para avaliar a atividade das enzimas α e β -amilase as sementes foram embebidas em papel germitest e mantidas em B.O.D por 196 horas. Em determinados intervalos, foram coletados material do endosperma e do embrião das sementes para obtenção dos extratos enzimáticos e cortes histoquímicos. As sementes submetidas ao envelhecimento acelerado foram mantidas em B.O.D à 41 °C, por 96 horas. Nos intervalos de 0, 48, 72 e 96 horas foram coletadas amostradas para o preparo dos extratos enzimáticos da cataláse, superóxido dismutase e peroxidase. Além disso, foram realizados os testes de respiração, condutividade elétrica e germinação. Os resultados indicam que, a síntese das enzimas amilases foram ativadas a

partir da 48^a hora de embebição, culminando na degradação do amido. Concomitantemente a degradação do amido no barueiro, lipídios e proteínas foram consumidos ao longo do processo de germinação. Em adição, o envelhecimento acelerado promoveu aumento na respiração e redução na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase. Enquanto a peroxidase, foi ativada por essa condição. Durante o estresse, foi observado o comprometimento das estruturas celulares, reduzindo o vigor das sementes. Assim, em conjunto, as alterações fisiológicas e bioquímicas ocorridas em função do envelhecimento acelerado interferiram de forma negativa na germinação das sementes de baru.

PALAVRAS-CHAVE: curva de embebição, vigor, histoquímica e envelhecimento acelerado

ABSTRACT: The *Dipteryx alata* Vog. (baru), native species from Cerrado (Brazilian Savannah), stands out due to the applicability of its seeds as food, nutritional, and medicinal potential. Baru seeds are classified as orthodox. However, there are few studies on their quality and physiological performance under different conditions. This study aimed to evaluate the seed quality during germination and to measure the damages caused by accelerated aging. To evaluate the activity of the α and β -amylase enzymes, the seeds were embedded in germitest paper and maintained in Biochemical Oxygen Demand (B.O.D) for 196 hours. At certain intervals, material from the endosperm and the seed embryo was collected to obtain the enzymatic extracts and histochemical cuts. The seeds submitted to accelerated aging were maintained in B.O.D at 41 °C for 96 hours. At the intervals of 0, 48, 72, and 96 hours, samples were collected for preparing the enzyme extracts of catalase, superoxide dismutase, and peroxidase. In addition, respiration, electrical conductivity, and germination tests were performed. Results indicate that the amylases enzymes synthesis was activated when reaching 48-hours soaking, culminating in the starch degradation. Simultaneously with the starch degradation in the baru plant, lipids and proteins were consumed during germination process. In addition, accelerated aging caused increased respiration and reduced activity to the superoxide dismutase and catalase enzyme, while peroxidase was activated by this condition. During stress, the cellular structures were compromised, reducing the

seeds' vigor. Thus, together, the occurred physiological and biochemical changes as a function of accelerated aging affected baru seeds germination negatively.

KEYWORDS: Soaking curve. Vigor. Histochemistry. Accelerated aging.

INTRODUÇÃO

O cerrado brasileiro é uma das maiores savanas tropicais do mundo abrigando um extenso inventário florístico. No entanto, estima-se que esteja havendo uma crescente demanda por área de pastagem e lavoura (BRANNSTRON *et al.*, 2008). O que culmina na redução de espécies nativas, que compõe a biodiversidade e a paisagem original do ambiente (KLINK; MACHADO, 2005; CARVALHO *et al.*, 2009).

Uma das espécies relevantes do cerrado é o *Dipteryx alata* Vog. (baru). Que pertencente à família Fabaceae. As árvores atingem aproximadamente 15 m de altura estando amplamente distribuídas na extensão deste domínio, principalmente em regiões *strictu sensu* (SOARES, 2008; VIEIRA *et al.*, 2010). Com grande potencial econômico, alimentício, madeireiro e oleico. Além, da possibilidade de emprego na recuperação de áreas degradadas (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Além disso, nos últimos anos, os estudos voltados para uso medicinal também têm sido explorados, pois o óleo das sementes tem propriedades antirreumáticas (MACIEL; TAVARES, 2010).

Pesquisas voltadas para o conhecimento de espécies florestais, bem como estudos relacionados ao comportamento da qualidade de sementes têm sido intensificados (ATAÍDE *et al.*, 2012). Contudo, esses estudos ainda são incipientes, dificultando a adequação de metodologias para os testes fisiológicos (ALVES, 2012).

As sementes de baru têm caráter ortodoxo, visto que no momento da dispersão dos frutos elas atingem teores de água próximo a 6%. Sementes ortodoxas atingem a maturidade fisiológica no período de dessecação quando já acumularam o máximo de biomassa. Este acúmulo de solutos antecede o processo de germinação, em contra partida, ocorre ativação de mecanismos protetores aos sistemas antioxidantes das membranas, intensificando-se a partir da reidratação dos tecidos (BEWLEY; BLACK, 1994; ANGELOVICI *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE, 2009; DANTAS *et al.*, 2008).

A embebição das sementes é caracterizada por três fases. Na primeira fase ocorre rápido aumento de água nos tecidos, síntese e degradação de enzimas e aumento da atividade respiratória. Na fase subsequente, o teor de água se estabiliza e tem início o

metabolismo pré-germinativo, principalmente pelo consumo de reservas que foram mobilizadas em função do crescimento do embrião. É nesta fase ocorre a síntese de “novo” da enzima α -amilase responsável pela degradação do amido contido no endosperma. Por último, na terceira fase nota-se intenso acúmulo de reservas na região do eixo embrionário promovendo aumento da turgescência celular e conseqüentemente ruptura da radícula (BEWLEY; BLACK, 1994; GUIMARÃES *et al.*, 2008).

Devido às alterações nas estruturas morfo-anatômicas e na mobilização de reservas durante o metabolismo o uso de técnicas histoquímicas têm sido uma importante ferramenta para compreender parte da dinâmica da germinação (BEWLEY, 1997; GALLÃO *et al.*, 2006; BEWLEY *et al.*, 2013). Contudo, adicionalmente à germinação objetivou-se avaliar o desempenho fisiológico das sementes de baru e a atuação de algumas enzimas do sistema antioxidativo durante envelhecimento acelerado.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos frutos: os frutos de *Dipteryx alata* foram coletados na Fazenda Bem Posta, localizada no Município de Portelândia GO a 17° 15' S – 52° 40' N e altitude de 549 m. Os frutos foram obtidos no mês de agosto de 2015, sendo coletados frutos maduros e inteiros dispersos pelo chão. Após a coleta, foram levados para o Laboratório de Sementes do Instituto Federal Goiano, município de Rio Verde. Onde, ocorreu o beneficiamento e instalação dos experimentos. A fim de avaliar as condições fisiológicas das sementes de *Dipteryx alata* foram realizados dois ensaios e posteriormente a realização dos testes de vigor.

Ensaio 1. Curva de embebição: o ensaio da curva de embebição das sementes foi feito com a finalidade de verificar a atividade das enzimas α e β amilase. Para instalação do ensaio, as sementes de baru foram distribuídas em quatro repetições de 15 sementes, em papel “germitest” (umedecido 2,5 vezes o peso seco). As sementes foram mantidas em B.O.D à 30 °C por oito dias, momento que se detectou a protusão radicular. Durante este período, as pesagens das sementes foram feitas com balança de precisão 0,001g. De acordo com os intervalos de pesagem, determinaram-se pontos específicos da curva e coletou-se material para as análises enzimática e histoquímica.

Durante as primeiras seis horas as sementes foram pesadas em intervalos 30 minutos, de seis até 12 horas foram pesadas em intervalos de uma hora. No período de

24 a 48 horas foram pesadas a cada três horas e nos demais intervalos, até o final de 196 horas, foram pesadas de 6 em 6 horas. As sementes utilizadas para o preparo dos extratos enzimáticos e os corte histoquímicos foram retiradas concomitantemente aos intervalos de pesagem. Porém, estas sementes foram reservadas em rolinhos de papel germitest à parte, correspondendo a: 0, 6, 12, 24, 36, 48, 96, 144 e 196 horas. Para calcular o ganho de peso das sementes foi utilizada a seguinte fórmula:

$$GM = \frac{Mf - Mi}{Mi} \times 100$$

Em que, Mf: massa final (ganho de massa a cada período de embebição); Mi: massa inicial das sementes antes da embebição.

Preparo dos extratos: As mensurações enzimáticas foram feitas em embriões isolados armazenados individualmente em papel alumínio e mantidos em nitrogênio (N₂) líquido durante as coletas e, em seguida, armazenados em ultrafreezer a -80 °C para posterior análise.

Extração de enzimas: quatro repetições de 400 mg da mistura de endospermas e eixo embrionário das sementes, de cada tratamento, foram utilizadas para a preparação do extrato enzimático. Os endospermas/eixos embrionários foram macerados com N₂ líquido em almofariz até obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) contendo ácido etilenodiaminotetracético 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 2% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 × g, por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante usado como extrato para as determinações enzimáticas.

Atividade das enzimas α e β-amilase: Para determinação da atividade da enzima α-amilase, alíquotas de 1,0 mL do sobrenadante foram adicionadas a 0,6 mL de um meio de reação contendo CaCl₂ 3 mM para inativação da β-amilase, sendo a reação incubada a 70 °C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas a 1,0 mL de solução tampão citrato 100 mM, pH 5,0 e 500 μL de solução de amido a 1 %, à temperatura de 30 °C. Após 5 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 2,0 ml do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico 1% (DNS) e aquecida em banho-maria fervente por 10 minutos (TÁRRAGO; NICOLÁS, 1976; BERNFELD, 1955; KISHOREKUMAR *et al.*, 2007). A determinação da atividade da enzima β-amilase foi iniciada pela adição de 1,0 mL de extrato enzimático a um meio de reação contendo 0,6 mL de EDTA 0,1 M, 1,0 mL de tampão citrato 100 mM, pH 3,4 e 0,5

mL da solução de amido 1%. A reação foi incubada a 30 °C durante 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2,0 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico 1% (DNS) com posterior aquecimento em água fervente por 10 minutos para desenvolvimento da coloração. Após completar o volume da reação, tanto da α -amilase quanto da β -amilase para 10,0 mL, os açúcares redutores formados pela ação das amilases foram quantificados pela leitura da absorbância em 540 nm, utilizando solução padrão de glicose 2 mg/mL (TÁRRAGO; NICOLÁS, 1976; BERNFELD, 1955; KISHOREKUMAR *et al.*, 2007).

Caracterização histoquímica dos tecidos de reserva (embrião e endosperma):

Durante a embebição das sementes, no tempo de (0, 6, 12, 24, 36, 48, 96, 144 e 196 horas) foram retiradas amostras da região do embrião e endosperma e posteriormente o material foi fixado em solução de Karnovsky (1965) por 24 horas. Após este período, o material vegetal foi desidratado em série etílica crescente, pré-infiltradas e infiltradas em historesina (Historesin Leica), conforme recomendações do fabricante. As amostras foram seccionadas transversalmente a 7 μ m de espessura, em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen scientific, China). Para identificação histoquímica os cortes foram submetidos à coloração com os seguintes reagentes: Sudan III para detecção de compostos lipídicos, Xilidine ponceau (XP) para proteínas totais (O'BRIEN; MCCULLY, 1981), e PAS para carboidratos totais (Mc MANUS, 1948). Foram feitas observações e as imagens fotografadas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão) acoplado com câmera DP-72 utilizando a opção de campo claro.

Ensaio 2. Envelhecimento acelerado: O teste de envelhecimento acelerado com quatro repetições de 60 sementes. As sementes de baru foram dispostas em caixas do tipo gerbox contendo 40 mL de água destilada, organizadas sobre tela de aço inox, coberta com duas folhas de papel mata borrão umedecida 2,5 vezes a massa seca do papel. O ensaio foi mantido em B.O.D regulada a 41 °C por 48, 72 e 96 horas. As sementes não submetidas a nenhum tratamento foram consideradas controle. Após cada período, foram feitas avaliações do teor de água (TA), taxa respiratória (TR), condutividade elétrica (CE), germinação (GERM) e avaliações bioquímicas das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX).

Teor de água: O teor de água das sementes foi quantificado pelo método de estufa à 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009 adaptado). Foram utilizadas quatro repetições de cinco sementes pesadas em balança de precisão (0,001g).

Taxa respiratória: O teste para quantificar a atividade respiratória das sementes foi determinado pelo método de titulação segundo metodologia (adaptada) de Crispim *et al.* (1994). Que quatro repetições de 15 sementes foram organizadas em caixas do tipo “gerbox” contendo 40 mL de KOH 0,1 mol L⁻¹ sobre tela de aço inox com duas folhas de papel mata borrão umedecida 2,5 vezes a massa seca do papel. As caixas “gerbox” foram vedadas com papel filme e mantidas em B.O.D regulada a 30 °C por 24 horas. Para cada amostra do teste foi feita uma prova em branco, em que o “gerbox” continha 40 mL de KOH 0,1 mol L⁻¹ sem as sementes. Posteriormente, foram retirados 25 mL da solução de KOH do interior dos “gerbox” e foram adicionadas três gotas de fenolftaleína para a titulação na presença de HCl 0,1 mol L⁻¹. No momento em que ocorreu o ponto de viragem foi registrado o volume consumido de HCl gasto para neutralizar a solução. O cálculo final da taxa respiratória foi segundo a seguinte equação:

$$TR = \frac{(B - L) \times C}{MS}$$

Em que, TR é a taxa respiratória; B é a leitura da prova em branco; L é a leitura da titulação utilizando HCl; C é a constante denominada fator de correção com valor de 3,52 e MS é a massa seca das sementes submetidas as avaliações. Os resultados foram expressos em mg de CO₂ por grama de semente seca.

Condutividade elétrica: para avaliar a condutividade elétrica das sementes de baru adaptou-se a metodologia proposta por Vieira e Krizyanovisk (1999). Foram utilizadas quatro repetições contendo cinco sementes imersas em 75 mL de água destilada por 24 horas em B.O.D regulada à 30 °C. Após este período, a leitura da solução de embebição foi feita em condutímetro digital de bancada da marca Technal, modelo TEC-4MP, e os resultados expressos em µS.cm⁻¹.g⁻¹.

Germinação: As sementes de baru foram organizadas em quatro repetições de 20 sementes em papel “germitest” umedecida 2,5 vezes a massa seca do papel mantidas em B.O.D regulada a 30 °C. A avaliação da germinação de sementes ocorreu durante 10 dias, período em que todas as sementes havia formado radícula igual ou superior à 0,5 cm. Os valores de sementes germinadas foram expressos em porcentagem e

concomitantemente ao teste de germinação foi calculado o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo metodologia proposta por Maguire (1962).

Preparo dos extratos: Das sementes reservadas em cada tempo do envelhecimento acelerado foram extraídos embriões inteiros correspondendo a 0,1g de material vegetal (aproximadamente cinco embriões). As mensurações enzimáticas foram feitas em embriões isolados armazenados individualmente em papel alumínio mantidos em nitrogênio (N₂) líquido durante as coletas e, em seguida, armazenados em ultrafreezer a -80 °C para posterior análise. A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Extração de enzimas: Foram utilizadas quatro repetições de 100 mg de embriões de cada tratamento para a preparação do extrato enzimático. Os embriões foram macerados com N₂ líquido em almofariz até obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 2% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 xg, por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante usado como extrato para as determinações enzimáticas.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 60 µL do extrato de embrião em 1,94 mL de mistura de reação constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), 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 ocorreu a 25 °C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 10 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotoredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - EUA), a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). As amostras controle tiveram suas absorbâncias medidas a 560 nm utilizando mistura de reação mantida no escuro por 10 min. Os valores obtidos foram subtraídos das leituras das amostras das repetições dos tratamentos que receberam iluminação. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Cakmak e Marschner (1992). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) e de H₂O₂ 20 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato de embrião e a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 240 nm,

durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995) foi usado para determinar a atividade das CAT, a qual foi expressa em $\text{mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol, de acordo com a metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 15 μL do extrato de embrião e a atividade foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 420 nm, durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHANCE; MAEHLEY, 1955) foi usado para calcular a atividade da POX, a qual foi expressa em μmol de purpurogalina produzida $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curva de embebição: De acordo com o gráfico ilustrado pela curva de absorção de água das sementes de *Dipteryx alata*, foi observado que a hidratação dos tecidos ocorreu lentamente (Figura 1). Ao contrário do que acontece com a maioria das espécies cultivadas, que o teor de água se eleva nas primeiras horas de embebição. A primeira fase da curva de embebição provavelmente tenha ocorrido até as 60 horas, quando o peso das sementes aumentou consideravelmente. Já a fase II se prolongou de 60 até o final de 144 horas. A partir deste ponto houve protusão radicular em mais de 50% das sementes. O momento exato que ocorreu o fim da terceira fase não foi preciso pois o ganho de peso das sementes foi contínuo mas, no fim de 196 horas todas as sementes já apresentavam emissão de radícula quando o ensaio foi interrompido.

Estes resultados, juntamente obtidos com a atividade das enzimas α e β -amilase confirmam que o metabolismo das sementes de *Dipteryx alata* foi intensificado a partir de 48 horas de embebição. Segundo Marcos Filho (2005), as fases I e II são responsáveis pelo maior fornecimento de energia para as células, permitindo a intensa mobilização de reservas contidas no endosperma para a região do embrião. Para que ele tenha nutriente suficiente para a formação da radícula. Neste sentido, o mesmo intervalo para a protusão da radícula foi observado em sementes de *Schimopsis brasiliensis* Engl., por Dantas *et al.* (2008), que em 144 horas completou a terceira fase de absorção de água pelas sementes.

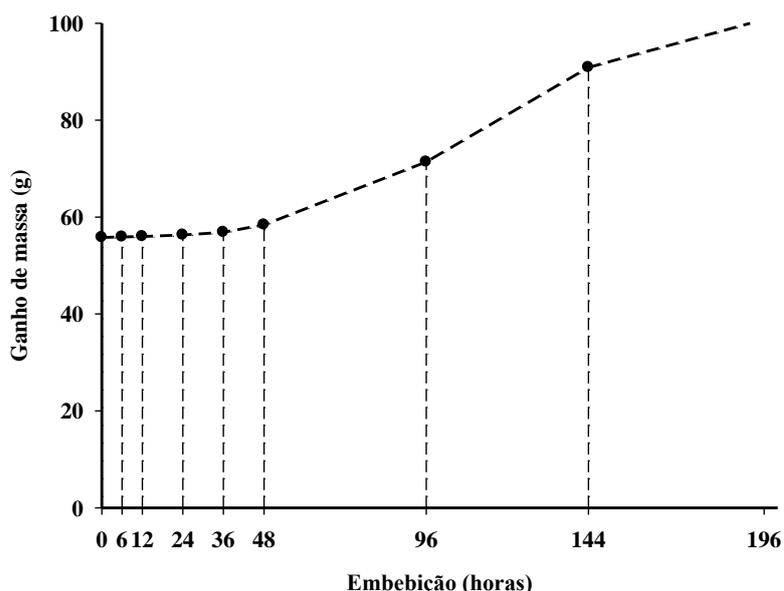


Figura 1: Ganho de massa (g) nas sementes de *Dipteryx alata* Vog., durante absorção de água por até 196 horas de embebição.

Atividade das enzimas α e β -amilase durante a embebição: Existem muitas evidências de que as amilases são liberadas para o endosperma pelas células epiteliais do escutelo durante o processo de germinação (DURE, 1960). Nesse estudo, a detecção dessas enzimas no barueiro traz os primeiros resultados de que são necessários, aproximadamente, 48 horas de embebição de água para que a α -amilase e a β -amilase sejam ativadas e liberadas para o endosperma. Em adição, a emissão radicular do barueiro está diretamente relacionada com a ativação das amilases. Esses resultados, em conjunto, evidenciam que a atividade das amilases necessita de uma síntese de novo, provavelmente ativada por giberelina, pois nas primeiras horas de embebição as atividades da β -amilase e α -amilase permaneceram, de modo geral, constantes (Figura 2).

A atividade das enzimas α -amilase e β -amilase foram acentuadas a partir da 48ª hora após o início do processo de embebição, sendo que a maior atividade se deu entre 144 e 196 horas a partir da protusão radicular. Sabe-se que a α -amilase participa do processo de mobilização de reservas via hidrólise das ligações α -1,4 internas de glicanos lineares e/ou ramificados da amilopectina da molécula do amido (SMITH *et al.*, 2005). Após a atuação desta enzima, a β -amilase hidrolisa as ligações 1,4- α -D-glicosídeos a partir de extremidade não redutora da maltose do amido (VALERIO *et al.*, 2011). Em estudo com sementes de sucupira preta, foi observado maior período de absorção para a nova síntese da enzima α -amilase. Segundo os autores, após 72 horas a atividade foi

intensificada e se manteve constante até 126 horas, reduzindo à partir desse ponto até o final da germinação (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

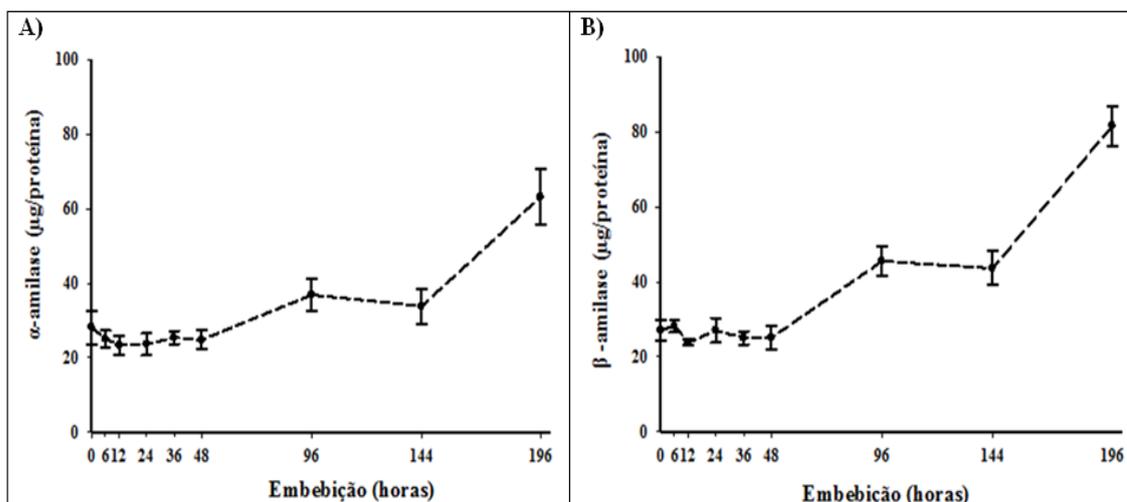


Figura 2: A) Atividade da enzima α -amilase e B) β -amilase. Em sementes de *Dipteryx alata* Vog. submetidas a 196 horas de absorção de água.

Caracterização histoquímica do endosperma e embrião das sementes durante a embebição: A partir das análises histoquímicas realizadas com as sementes de *Dipteryx alata* foi possível detectar a presença de proteínas totais, lipídios e carboidratos (Figura 3). Desta forma, esses compostos foram separados conforme sua intensidade nas células: alta intensidade (Figura 3 A, D e G), média (Figura 3 B, E e H) e baixa intensidade (Figura C, F e I) e posteriormente expostos na tabela de grupos metabólicos (Tabela 1). A identificação e intensidade dos compostos foram representados nos intervalos de 0 a 196 horas da curva de embebição (Tabela 1). Nestes intervalos, as sementes do controle, apontaram tais compostos, tanto no embrião quanto no endosperma. Em sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, foram identificados inúmeros corpos lipídicos e proteicos na região dos cotilédones (CORTE *et al.*, 2009).

Esses compostos são reservas importantes consumidas nos estágios iniciais da germinação (BEWLEY; BLACK, 1983). Nesse sentido, a intensidade de lipídeos e carboidratos não degradados nas células tende a reduzir o vigor natural das sementes ao longo do armazenamento, acarretando efeitos no processo de germinação (COPELAND; McDONALD, 2001; PEREIRA *et al.*, 2013).

Durante os períodos de embebição notou-se pequena variação na organização estrutural dos compostos no interior das células das sementes de *Dipteryx alata*.

Entretanto, no final de 196 horas em todos os cortes verificou-se menor concentração dos corpos proteicos, lipídicos e de carboidratos (Tabela 1).

Aparentemente, os carboidratos e lipídeos foram às reservas mais consumidas na terceira fase do período de embebição, culminando com a protusão radicular. As observações histoquímicas feitas por Corte *et al.* (2008), nas sementes de *Caesalpinia peltophoroides* durante a germinação demonstram que a quantidade de lipídios nos cotilédones é superior aos demais compostos e que a fragmentação deste, ocorreu de forma gradativa até o final da germinação, enquanto que as proteínas se alteraram mais rapidamente entre os 10 e 20 dias após a sementeira. Em estudo, Bau *et al.* (1997), relataram rápido decréscimo no conteúdo lipídico de sementes de *Glycine max*, enquanto o nível de proteínas aumentava gradativamente durante o processo de germinação.

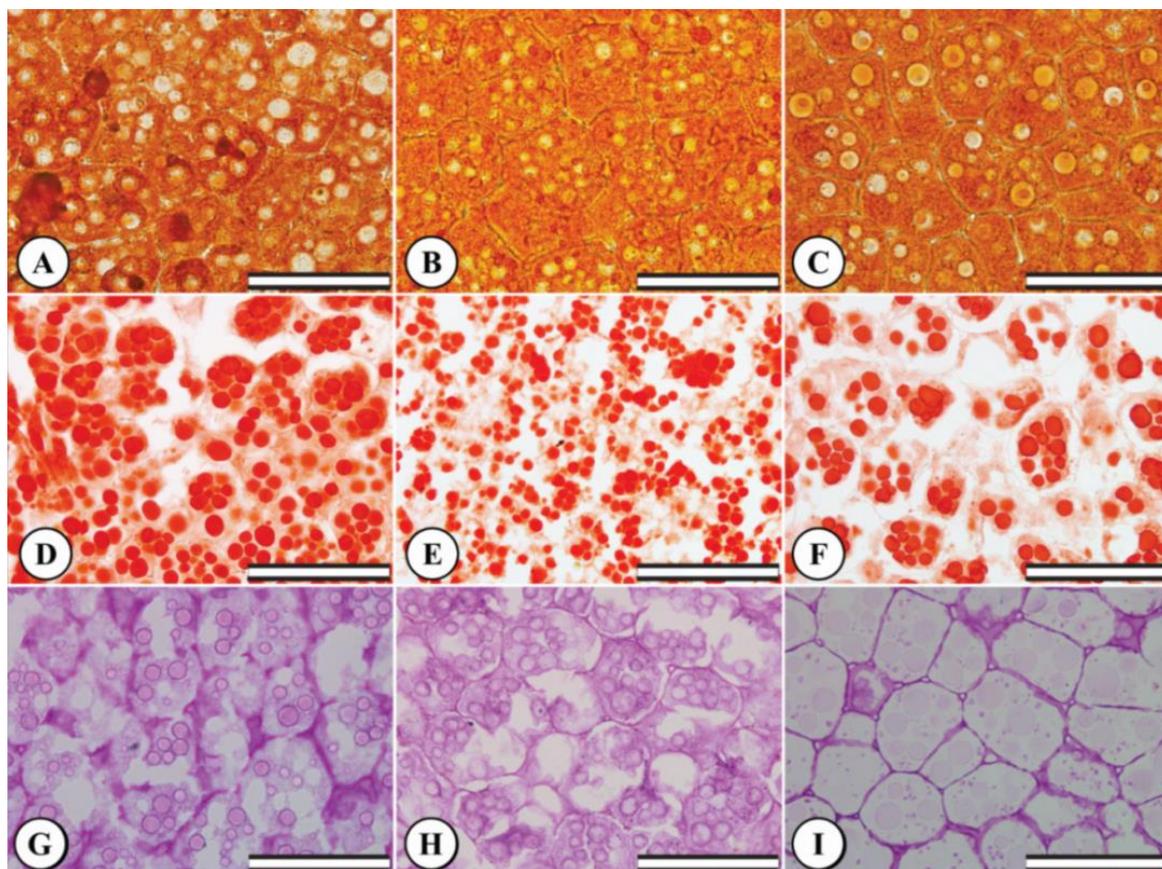


Figura 3: Análise histoquímica das sementes de *Dipteryx alata* Vog. (A, B e C) Coloração com sudan III, para identificação de compostos lipídicos. (D, E e F). Coloração com xilidine ponceau (XP), para identificação de carboidratos totais. (G, H e I) Coloração com PAS para identificação de carboidratos totais. Alta intensidade dos compostos (A, D e G), média intensidade (B, E e H) e baixa intensidade (C, F e I). Barras de 100 μ m

Tabela 1: Histoquímica do embrião e endosperma de sementes de (*Dipteryx alata* Vog.)

Tratamentos (Horas)	Teste Grupo de Metabólitos					
	Sudan IV		Xilidine Ponceau		PAS	
	Embrião	Reserva	Embrião	Reserva	Embrião	Reserva
0	+	++	++	+++	+	++
6	+++	++	++	+	+++	+++
12	+	++	++	+++	++	++
24	+	+	++	+	++	++
36	+	+	+	+	+	+++
48	++	+	+	+++	+	+++
96	++	+	+	++	++	++
144	+++	++	+++	++	+++	+
196	+	+	+	+	+	+

* (+) indica resultado positivo sendo (+) baixa intensidade, (++) média intensidade, (+++) alta intensidade.

Envelhecimento Acelerado: Ao longo do período de estresse oxidativo que as sementes de baru foram submetidas observou-se pequeno aumento na atividade respiratória. Esse aumento, embora tenha sido observado não foi significativo e por isso, não foi possível ajustar um modelo estatístico (Figura 4 A). No entanto, o envelhecimento acelerado promove aumento na respiração e desencadeia incremento das EROs, formadas a partir do aumento de oxigênio molecular.

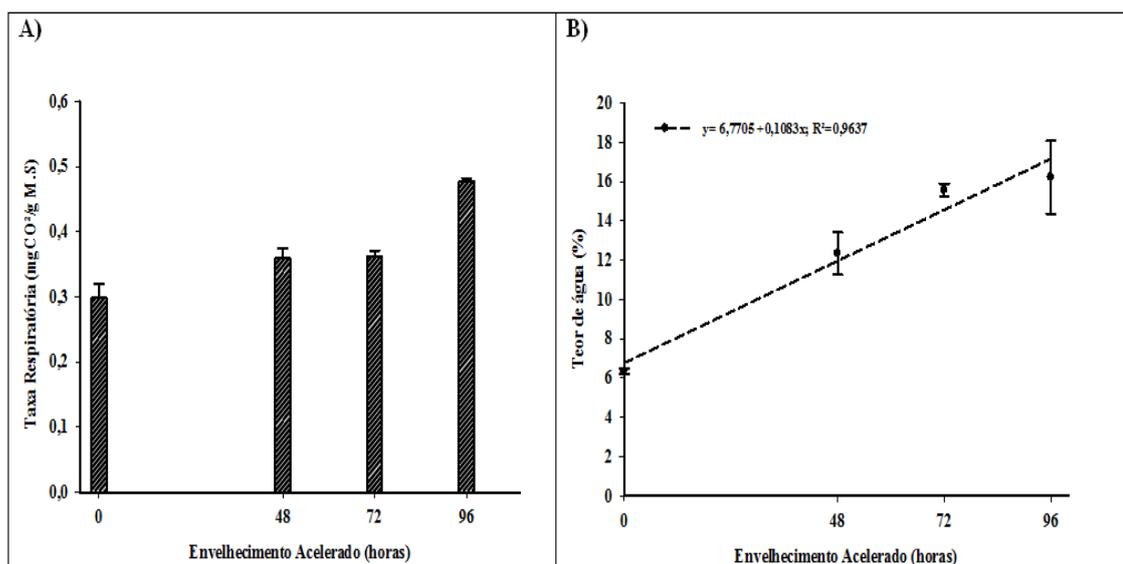


Figura 4: A) Taxa respiratória e B) teor de água. Em sementes de *Dipteryx alata* Vog. submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por 0, 48, 72 e 96 horas.

De acordo com Crispim (1994), o CO₂ liberado na respiração e capturado pela solução de KOH é uma variável importante, que permite avaliar o nível de deterioração e logo, a qualidade do lote de sementes. Provavelmente, a atividade respiratória das sementes de *Dipteryx alata* não foi intensificada em virtude do tempo de exposição ao

envelhecimento acelerado. Desta forma, não houve alterações significativas nas enzimas que controlam a respiração celular no interior dos mitocôndrios. De acordo com Spinola *et al.* (2000), poucas horas de envelhecimento acelerado em sementes de soja não afetam a malato desidrogenase (MDH) uma das principais enzimas que regulam o ciclo de Krebs. Em contrapartida, estudos realizados por Dode *et al.* (2013), foi verificado que o envelhecimento acelerado promoveu aumento na respiração das sementes de soja e conseqüentemente a deterioração das mesmas. Os autores relataram que o grau de deterioração está diretamente relacionado à desestruturação das membranas celulares, promovendo a perda gradativa da seletividade e aumento da condutividade elétrica, devido à lixiviação de íons.

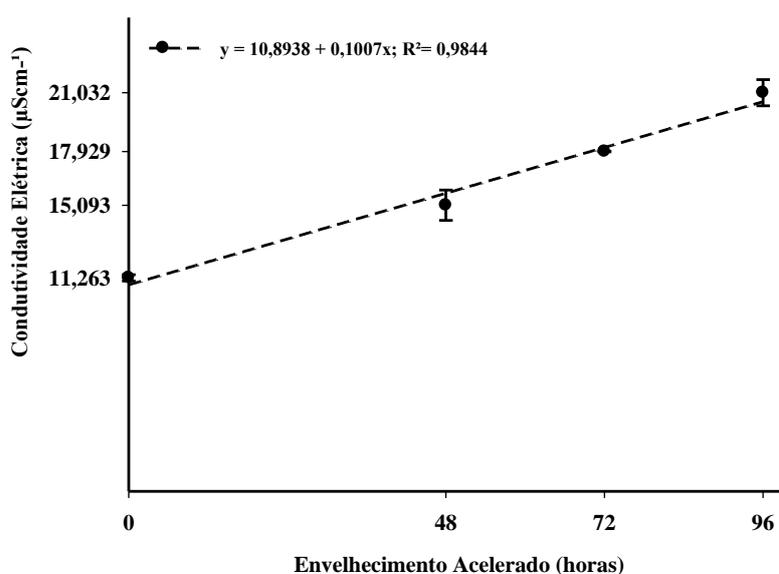


Figura 5: Condutividade elétrica em sementes de *Dipteryx alata* Vog. submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por 0, 48, 72 e 96 horas.

Durante os quatro tempos do ensaio, observou-se aumento linear nos valores da condutividade elétrica, indicando possíveis danos ocorridos pela condição do estresse (Figura 5). Por isso, quanto maior os valores referentes à condutividade maior serão os danos de deterioração das membranas desencadeando a peroxidação dos lipídios e comprometendo o vigor (KRUSE *et al.*; 2006; ATAÍDE *et al.*, 2012; SCHWEMBER; BRADFORD, 2010.) O comportamento das sementes de *Dipteryx alata* permitiu realizar a correlação ($r = 0,93$) entre a respiração e a condutividade elétrica. O aumento das duas variáveis é diretamente proporcional ao teor de água e temperatura aumentada ao longo das 96 horas.

O envelhecimento acelerado pode, em diferente magnitude, tanto inativar enzimas quanto comprometer sua síntese. Neste estudo, a concentração de proteínas nas sementes de barueiro reduziu gradativamente até as 72 horas (Figura 6 A). A redução nos níveis proteicos se deve, possivelmente, à degradação por proteases, conforme reportado por Basavarajappa *et al.* (1991) em sementes de milho.

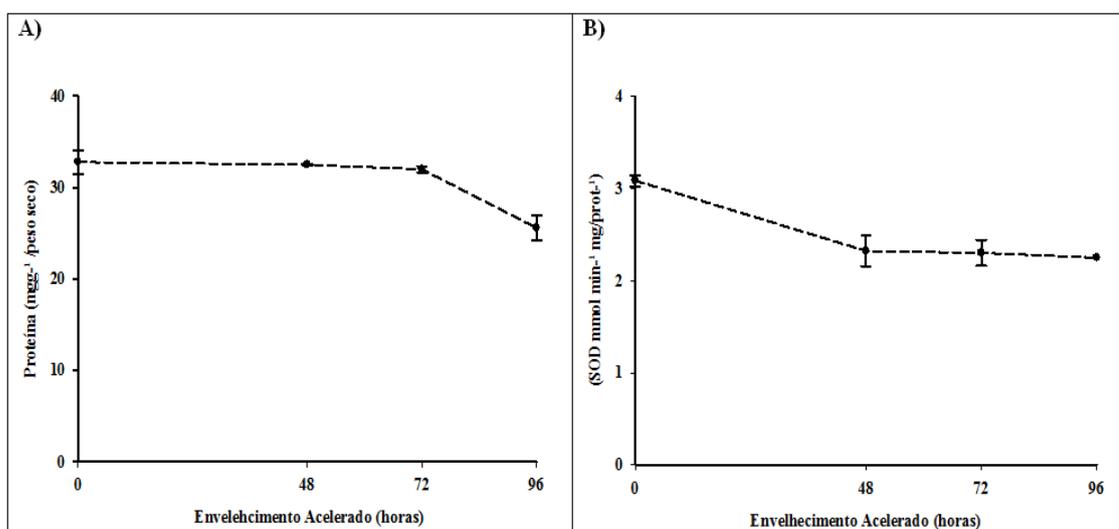


Figura 6: **A)** Concentração de proteína total e **B)** atividade da superóxido dismutase (SOD). Em sementes de *Dipteryx alata* Vog. submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por 0, 48, 72 e 96 horas.

Bailly *et al.* (1996) relataram que o envelhecimento acelerado pode inativar enzimas do sistema antioxidativo em diferente extensão. Essa informação corrobora com dados deste estudo, pois a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (Figuras 6 B) e da catalase (CAT) (Figura 7 A), reduziu a partir de 48 horas de exposição à temperatura de 41 °C, condição escolhida para induzir o envelhecimento das sementes. Assim, a redução na atividade dessas enzimas se deve, possivelmente, a degradação dessas enzimas e/ou a inativação das mesmas pela alteração da homeostase celular, comprovada pelo aumento de extravasamento de eletrólitos.

A redução na atividade das enzimas foi observada em diversos estudos que avaliaram o envelhecimento acelerado de sementes. Sung (1996), constatou ocorrência de peroxidação lipídica como indicativo da degradação de membranas celulares em sementes de amendoim, acarretando redução da atividade tanto da CAT quanto da SOD.

É evidente que o envelhecimento acelerado culminou com redução de tais enzimas nas sementes de *Dipteryx alata*. Corroborando estes resultados foi observado, em sementes de *Pterogyne nitens* submetidas por até 72 horas de envelhecimento

acelerado decréscimo na atividade da CAT de 0,040 para 0,010 U mL⁻¹ (ATAÍDE *et al.*, 2012).

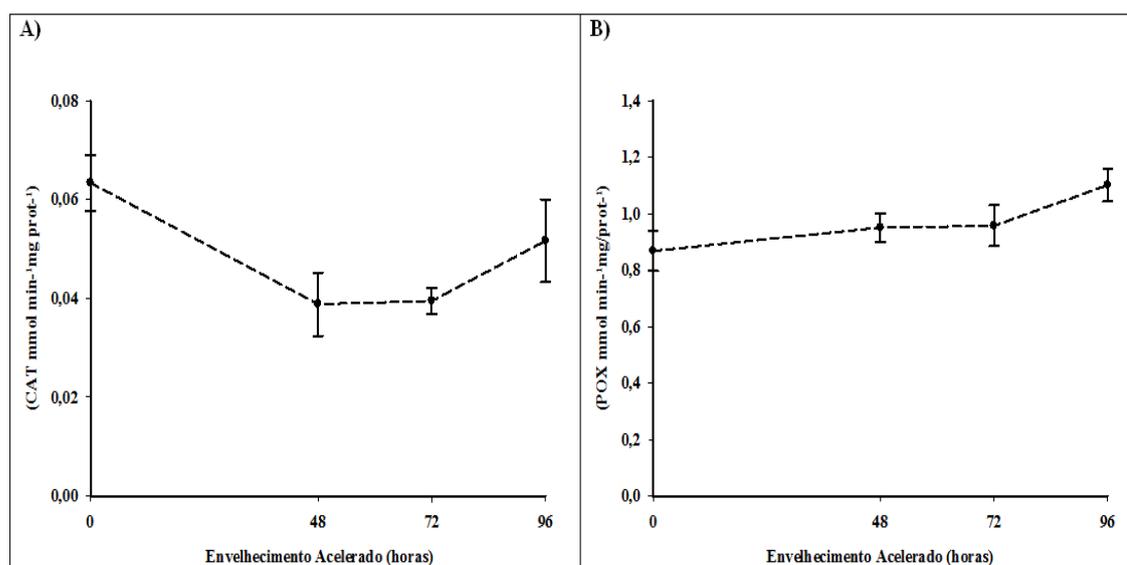


Figura 7: **A)** atividade da catalase (CAT) e **B)** atividade da peroxidase (POX). Em sementes de *Dipteryx alata* Vog. submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por 0, 48, 72 e 96 horas.

As alterações na atividade das enzimas CAT e SOD, estão relacionadas de maneira geral a fatores que desestabilizam a semipermeabilidade das membranas. Em estudos com sementes de *Melanoxylon brauna* Schott armazenadas em condições de alta umidade relativa, houve redução da atividade enzimática de ambas. Porém, os autores ressaltaram que a perda da qualidade das sementes nem sempre estará associada à peroxidação dos lípidios, uma vez que, a síntese desses compostos pode não ocorrer (BORGES *et al.*, 2015)

A atividade da enzima peroxidase (POX) (Figura 7 B), nas sementes de *Dipteryx alata* aumentou ao longo do processo de envelhecimento. Resultado contrário foi reportado por Chandel *et al.* (2016) em sementes de soja. Esses resultados demonstram que a sensibilidade da POX à alta temperatura é espécie-específica. Assim, em sementes de barueiro a POX é ativada pelo envelhecimento, indicando a importância dessa enzima na defesa das sementes dessa espécie a essa condição estressante.

Embora a atividade enzimática da CAT e SOD tenha sido aumentada ao longo do envelhecimento acelerado, a germinação das sementes de *Dipteryx alata* não foi drasticamente afetada. Porém, não foi possível ajustar um modelo significativo para expressar o comportamento das sementes relacionado à germinação, independente do

tempo de envelhecimento acelerado avaliado a germinação manteve-se acima de 95% (Figura 8 A).

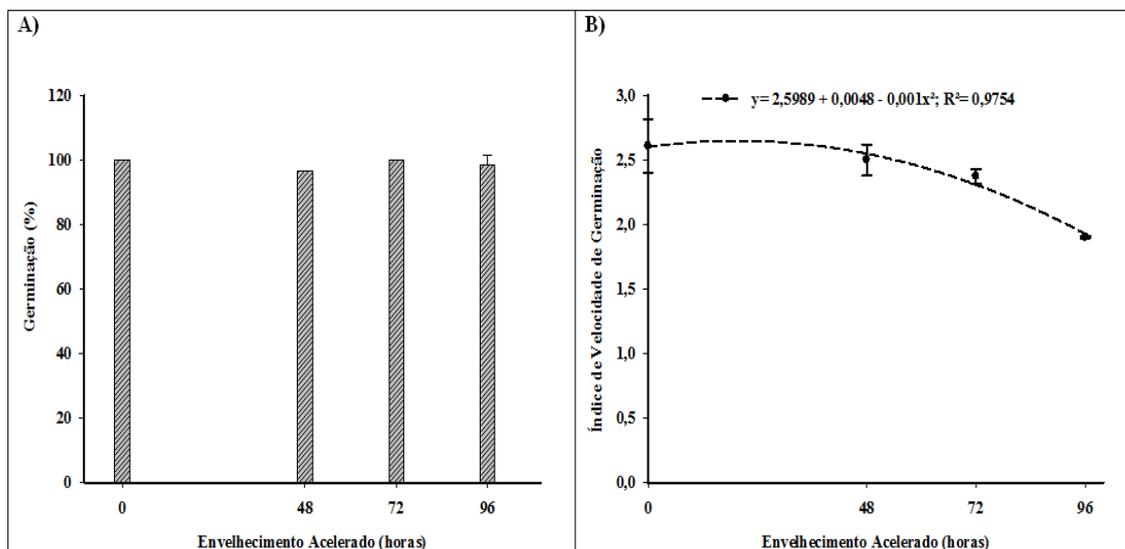


Figura 8: A) Porcentagem de germinação e B) índice de velocidade de germinação. Em sementes de *Dipteryx alata* Vog. submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por 0, 48, 72 e 96 horas.

O índice de velocidade de germinação das sementes reduziu à medida que se aumentou o tempo do envelhecimento acelerado. Na Figura 8 B nota-se o desempenho do vigor das sementes de 2,6 para 1,8 até 96 horas. Estes resultados sugerem que o vigor das sementes de baru não foi proeminentemente afetado. Diferentes períodos de envelhecimento são necessários para desencadear grandes mudanças bioquímicas nas sementes.

CONCLUSÕES

A síntese das enzimas amilases foi ativada a partir da 48^a hora de embebição, culminando na degradação do amido. Concomitantemente à degradação do amido, lipídios e proteínas são consumidos ao longo do processo de germinação das sementes de baru.

As enzimas SOD e CAT foram sensíveis ao estresse imposto pelo envelhecimento acelerado, enquanto a POX foi ativada por essa condição estressante.

O envelhecimento acelerado acarretou em conjunto com as outras alterações supracitadas no vigor das sementes de *Dipteryx alata* Vog.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, K.S.; GUIMARÃES, R.M.; ALMEIDA, I.F.; CLEMENTE, A.C.S. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth). **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.12-19, 2009.

ALVES, M.V.P.; Armazenamento, viabilidade e emergência de sementes e diásporos de *Emmotuns nitens* (Benth) Miers. **Revista Verde**, v.7, n.3, p.163-168, 2012.

ANGELOVICI, R; GALILI, G; FERNIE, A. R; FAIT, A. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, v. 15 n. 4, p. 211-218, 2010.

ATAÍDE, G.D.; FLORES, A.V.; BORGES, E.E.L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogyne nitens* Tull. Durante o envelhecimento artificial. **Revista Agropecuária Tropical**, v. 42, n.1, p.71-76, 2012.

BAILY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; COME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Plant Physiology**, v.97, p.104-110, 1996.

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seeds Science and Technology**, v.19, p.279-286, 1991.

BAU, H.M; VILLAUME, C.; NICOLAS, J.P; MÉJEAN, L. Effect of Germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. *J. Sci. Food Agric.* 73, p. 1-9, 1997.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analyt. Biochem**, v.44, p.276-287, 1971.

BERNFELD, P. Amylase α and β . **Methods in Enzymology**, v.1, p.149-151, 1955.

BEWLEY, J.D; BLACK, M. Physiology and biochemistry of germination in relation to germination. New York: Springer. V.1.306p.1983.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. 2^a ed. New York: **Plenum Press**. 445p, 1994.

BEWLEY, J. D. Seed Germination and Dormancy. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1055-1066, 1997.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Structure and Composition. In: Seeds: **Physiology of Development, Germination and Dormancy**. New York: Springer, p.1-25, 2013

BORGES, E. E. L.; FLORES, A.V.; ATAÍDE, G.M.; MATOS, A.C.B.; Alterações fisiológicas e atividade enzimática em sementes armazenadas de *Melanoxylon brauna* Schott. **Revista Cerne**, v.21, n.1, p.75-81, 2015.

BRADFORD, M.N. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt. Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.

BRANNSTROM, C.; JEPSON, W.; FILIPPI, A.M.; REDO, D.; XU, Z.; GANESSH, S. Land change in the Brazilian savanna (Cerrado), 1986-2002: comparative analysis and implications for land-use policy. **Land Use Polyci**, v.25, p.579-595, 2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília, DF: Mapa/ACS, p.395, 2007

CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. **Plant Physiol**, v.98, p.1222-1227, 1992.

CARVALHO, F.M.V.; JÚNIOR, P.D.M.; FERREIRA, L.G.; The Cerrado into-pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. **Biological Conservation**, v.142, p.1392-1403, 2009.

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

CHANDEL, R.K.; GEETANJLY.; KHAN Z.; RADHAMANI J. Changes in enzyme activity during accelerated ageing in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Legume Genomics and Genetics**, v.7, n.9, p.1-7, 2016.

COPELAND, L.O; McDONALD, M.B. Principles of seed science and technology. 4th ed. Boston: Kluwer Academic Publishers, 430p.2001.

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.; VENTRELLA, M.C.; LEITE, I.T.A.; BRAGA, A.J.T. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. **Revista Árvore**, v.32, n.4, p.641-650, 2008.

CORTE, V.B.; VENTRELLA, M.C.; BORGES, E.E.; PONTES, C.A.; PINHO, D. Histochemical and ultrastructural study OF *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae) seeds. **Revista Árvore**, v.33, n.5, p.873-883, 2009.

CRISPIM, J. E.; MARTINS, J. C.; PIRES, J. C.; ROSOLEM, C. A.; CAVARIANI, C. Determinação da taxa de respiração em sementes de soja pelo método da titulação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.10, p. 1517-1521, 1994.

DANTAS, B. F.; SOARES, F. S. J.; LÚCIO, A. A.; ARAGÃO, C. A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de braúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.), **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.2, p.214-219, 2008.

- DEL, LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v. 34, p.1023-1028, 1993.
- DODE, J.S.; MENEGHELLO, G.E.; TIMM, F.C.; MORAES, D.M.; PESKE, S.T.; Teste de respiração em sementes de soja para avaliação da qualidade fisiológica. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.43, n.2, p.193-198, 2013.
- DURE, L. Site of origin and extent of activity of amylases in maize germination. **Plant Physiology**, XX: 925-934, 1960.
- GALLAO, M.I.; DAMASCENO, L.F.; DE BRITO, E. S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agrônômica**, v.37, p.106-109, 2006.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.
- GUIMARÃES, M. A.; DIAS, D. C. F. S.; LOUREIRO, M. E.; Hidratação de sementes, **Revista trópica – ciências agrárias e biológicas**, v.2, n. 1, p.31-39, 2008.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.
- KARNOVSKY, M. J. A. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol**, v.27, p.137-138, 1965.
- KISHOREKUMAR, A.; JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B. SRIDHARAN, R.; PANNEERSELVAM, R. Comparative effects of different triazole compounds on growth, photosynthetic pigments and carbohydrate metabolism of *Solenostemon rotundifolius*. **Colloids and Surfaces**, v.60, p.207-212, 2007.
- KLINK C.A.; MACHADO, R.B. 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation biology**, v.19, n.3, p.707-713, 2005.
- KRUSE, N. D. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazone. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 379-390, 2006.
- MACIEL, P. M. C.; TAVARES, M. I. B. Solid State and Proton Relaxation NMR Study of *Dipteryx alata* Vogel. **Journal. of Appl. Polyce. Science.**, v.116, p. 50–54, 2010.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-177, 1962.
- MARCOS FILHO, J. Dormência de sementes. In: MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, p. 253-289, 2005.

MCMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Spot Technology**, v.23, n.108, 1948.

O'BRIEN, T. P. & McCULLY, M. E. The study of plant structure principles and selected methods, Melbourne, **Temarcarphi Pty**, 1981.

OLIVEIRA, A. N.; SILVA, A. C.; ROSADO, S. C. S.; RODRIGUES, E. A. C. Variações Genéticas Para Características do Sistema Radicular de Mudas de Baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.6, p.905-909, 2006.

PEARSE, A. G. E. 'Histochemistry: theoretical and applied. Vol.2' 3^a ed. (The Williams & Wilkins Company Baltimore). 1972.

PEREIRA, M.D.; DIAS, D. C. F. S.; BORGES, E. E. L.; MARTINS FILHO, S.; DIAS, L. A. S.; SORIANO, P. E. Physiological quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds during storage. *Journal of Seed Science*, v.35, n.1, p.21-27, 2013.

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**, Oxford, v.61, n.15, p.4423-4436, 2010.

SMITH, A. M. *et al.* Starch degradation. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, n.1, p.73-98, 2005.

SOARES, T. N.; CHAVES, L. J.; TELLES, M. P. C.; DINIZ FILHO, J. A. F.; RESENDE, L. V. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* Vog. ("baru tree": Fabaceae) from. **Cerrado region of central Brazil. Genética**, p.9-19, 2008.

SPINOLA, M. C. M.; CÍCERO, S. M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, v.57, n.2, p.263-270, 2000.

SUNG, J. M.; JENG, T. L.; Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Plant Physiology**, v.91, p.51-55, 1994.

TÁRRAGO, J.F.; NICOLÁS, G. Starch degradation in the cotyledons of germinating lentils. **Plant Physiology**, n.58, p.618-621, 1976.

VALERIO, C. *et al.* Thioredoxin-regulated β -amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.2, p. 545-555, 2011.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: Krzyzanowsky, F. C.; Vieira, R. D.; França-Neto, J. B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: **ABRATES**, p.4/1-4/26, 1999.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINE-COSTA, T.S.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R. Frutas nativas da região centro-oeste do Brasil. **Embrapa**, DF. 1^a Ed., 2010.

CAPÍTULO II

(Revista Ciência Agronômica)

DEFINIÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA O VIGOR DE SEMENTES *Dipteryx alata* VOG. (BARU) E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA NO ARMAZENAMNETO UTILIZANDO ANÁLISE DE IMAGENS

THE TETRAZOLYT TEST DEFINITION FOR VIGOR OF *Dipteryx alata* VOG. (BARU) SEEDS AND EVALUATION OF PHYSIOLOGICAL QUALITY IN THEIR STORAGE USING IMAGES ANALYSIS

RESUMO: Atualmente, os testes que avaliam a qualidade fisiológica de sementes florestais não são totalmente definidos. São poucas metodologias descritas em relação a estas espécies. Os testes utilizados em sua maioria são adaptados de metodologias para sementes de grandes culturas. Em busca do melhor entendimento sobre o comportamento das sementes de baru, espécie nativa do Cerrado, procurou-se no primeiro ensaio deste estudo adequar o teste de tetrazólio visando a avaliar as condições bioquímicas das sementes e estabelecer diferentes classes de vigor. Neste estudo dois lotes de sementes coletados nos anos de 2014 e 2015 respectivamente, três concentrações da solução de sal de tetrazólio e dois tempos de pré-embebição das sementes. Das concentrações utilizadas no teste observou-se que 0,10% e 36 horas de pré-embebição são necessárias para melhores resultados nas sementes de baru.

Foi avaliado no segundo ensaio deste trabalho o armazenamento das sementes durante 12 meses nas temperaturas de 10 e 20 °C. A cada três meses uma amostra do lote inicial foi retirada para as avaliações fisiológicas e análise de imagem obtidas por raios x.

Os resultados foram significativos apenas para o tempo de armazenamento, não tendo as temperaturas influenciado na qualidade das sementes. Ao longo dos 12 meses de avaliação, foi observada na redução na germinação e emergência de plântulas. Os demais teste fisiológicos avaliados também mostraram redução significativa na qualidade das sementes, sem comprometer seu vigor. O teste de raio x não apontou nenhuma alteração nas sementes em virtude do armazenamento nem tampouco deformidades na estrutura morfológica.

Palavras-chave: concentrações, pré-embebição, classes de vigor, raios x, plântulas

ABSTRACT: Currently, tests evaluating physiological quality of forest seeds are not fully defined. There are few published methodologies in relation to these species. However, the used tests are the mostly ones adapted from methodologies for seeds from large crops. In searching for the best understanding about the baru plant seeds' behavior, native species from Cerrado (Brazilian savannah), the first test of this study was designed to adjust the tetrazolium test for evaluating their biochemical conditions and establish different vigor classes. Two seed lots collected in 2014 and 2015, respectively, three concentrations of the tetrazolium salts solution, and two times of seed pre-soaking were used in this study. Among the concentrations used in the test, it was observed that 0.10% and 36-hours pre-soaking are necessary for better results for baru seeds. Every three months, a sample of the initial lot was taken for the physiological evaluations and analysis was made of image obtained by X-ray. Results were significant only for the storage time; temperatures did not affect seeds' quality. During evaluation for 12 months, a small reduction in germination and seedlings' emergence was observed; the other physiological tests also showed a significant reduction in seeds' quality, but did not compromise their vigor. The X-ray test did not indicate any changes in the seeds due to storage, nor any deformities in their morphological structure.

KEYWORDS: Concentrations. Pre-soaking. Vigor classes. X-rays. Seedlings.

INTRODUÇÃO

Os fatores que determinam a qualidade e o vigor das sementes são definidos por diferentes condições que elas são expostas. Para garantir a viabilidade das sementes é necessário maximizar as condições de estocagem, evitando a deterioração e morte na germinação (TOLEDO *et al.* 2009; HERNANDEZ *et al.*, 2011).

O armazenamento é viável para a manutenção da qualidade fisiológica ao longo do tempo, contribuindo para a conservação das informações genéticas (WALTERS *et al.*, 2005). Várias técnicas têm sido testadas para a conservação e redução do metabolismo como, baixos teores de água e redução da temperatura (KOHAMA *et al.* 2006).

Diante disto, a aplicação de testes rápidos e eficientes requer adaptação para contribuir com o conhecimento e manutenção das sementes (CORTE *et al.* 2010; DEMINICIS *et al.* 2009). Entre estes testes, destaca-se o teste de tetrazólio que se baseia na viabilidade dos tecidos. Durante a respiração, no interior dos mitocôndrios são liberados íons de hidrogênio que reagem com o sal de tetrazólio, formando uma coloração avermelhada com diferentes intensidades, indicando o nível de deterioração (FRANÇA NETO, 1998; DEMINICIS *et al.*, 2009).

Outro método que tem contribuído para avaliar o vigor de sementes é a análise de imagens por raios x. O método é preciso, rápido e não destrutivo, permitindo a detecção de danos internos nas sementes. A análise de imagens possibilita a visualização de danos que podem ser provenientes de má formação, decorrentes da colheita, da secagem ou por ataque de insetos (CÍCERO; JÚNIOR, 2003; PINTO *et al.*, 2007; ISTA, 2004).

As sementes que não apresentam uma das estruturas internas de forma íntegra aumentam as chances de formação de plântulas de baixo vigor ou, sua ausência (BURG *et al.*, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Neste sentido, a técnica permite a seleção de sementes de alta qualidade, que incidirá na melhor formação de plântulas (LIMA *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2012).

Em decorrência da falta de informações científicas com espécies florestais tem-se a necessidade da definição de metodologias para o estudo das sementes (ATAÍDE *et al.*, 2012). Neste caso, o baru (*Dipteryx alata* Vog.) espécie nativa do domínio Cerrado se destaca como frutífera de alto potencial, utilizada na alimentação, na área medicinal e industrial. As sementes contém alto valor nutricional, composta por elevada taxa de proteínas, aminoácidos essenciais, considerável quantidade de sais minerais e fibras,

sobrepondo-se como excelente ingrediente na dieta alimentar (FERNANDES *et al.*, 2010).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi adequar a metodologia do teste de tetrazólio a sementes de baru e avaliar a qualidade fisiológica de sementes armazenadas durante 12 meses nas temperaturas de 10 e 20 °C, utilizando imagens de raios x como ferramenta de detecção de danos ao longo do período.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos frutos: Os frutos de baru foram coletados na Fazenda Bem Posta, localizada no Município de Portelândia GO a 17° 15' S – 52° 40' N e altitude de 549 m. Os frutos foram obtidos no mês de agosto de 2014 e 2015, sendo coletados frutos maduros e inteiros dispersos pelo chão. Após a coleta, foram levados para o Laboratório de Sementes do Instituto Federal Goiano, município de Rio Verde, onde ocorreram o beneficiamento e instalação dos experimentos. O primeiro ensaio do trabalho foi feito com sementes dos anos de 2014 e 2015, com a finalidade de avaliar o vigor e definir a metodologia pelo teste de tetrazólio. No segundo ensaio, foram utilizadas sementes obtidas somente no ano de 2015. As sementes foram submetidas ao armazenamento por 12 meses, para avaliar, os possíveis danos ocasionados por ele foi feito o teste de raios x.

Teor de água: Inicialmente, foi determinado o teor de água das sementes após a coleta. Para a obtenção das sementes, os frutos foram quebrados com auxílio de prensa manual da marca PIT BULL®. Na sequência, determinou-se o teor de água inicial das sementes, pelo método de estufa a 105±3 °C por 24 horas, adaptado de Brasil (2009), utilizando quatro repetições de cinco sementes, o correspondente a 10 gramas.

Ensaio 1. Definição da metodologia do teste de tetrazólio nas sementes de baru: Os frutos de baru colhidos em 2014 foram estocados em caixas de isopor não vedadas e mantidos em temperatura ambiente de 25 ± 3 °C por 12 meses. Os frutos colhidos em 2015 permaneceram sob a mesma condição durante 60 dias. Posteriormente, para obtenção das sementes os frutos foram quebrados com auxílio de prensa manual da marca PIT BULL®. À medida que os frutos foram quebrados as sementes foram retiradas e guardadas em B.O.D a 20 °C. Foram testadas três concentrações da solução de sal de tetrazólio equivalente a 0.05, 0.075 e 0.10% em dois tempos de pré-embebição. Inicialmente, três repetições de 10 sementes foram

distribuídas em papel “germitest” umedecidos três vezes em relação a seu peso seco, e mantidas em B.O.D. por 24 e 36 horas. O período de pré-embebição estabelecido teve por objetivos facilitar a retirada do tegumento e ativar o metabolismo celular. A remoção do tegumento foi feita com auxílio de lâmina de bisturi, com corte superficial e longitudinal no sentido da rafe. Após a remoção do tegumento, as sementes pré-embebidas foram imersas em 30 mL de solução de sal de tetrazólio nas concentrações definidas durante duas horas e meia em B.O.B. a 35 °C.

A avaliação do vigor das sementes foi feita por leitura individual, com apoio de lupa de mesa. Durante a leitura do teste, foi possível definir cinco classes de vigor para as sementes de baru, viável muito vigorosa (**VMV**), viável vigorosa (**VV**), viável pouco deteriorada (**VPD**), viável muito deteriorada (**VMD**) e inviável (**INV**) (Figura 1 a 5).

Ensaio 2. Armazenamento das sementes: As sementes foram armazenadas com teor de água inicial de 5.6 % (b.u). O lote inicialmente obtido foi dividido em 10 amostras aleatoriamente. Cada amostra representou respectivamente um período do armazenamento por zero (controle), três, seis, nove e doze meses. As sementes foram acondicionadas em potes de vidro com tampa hermeticamente vedada e os espaços vazios foram preenchidos com algodão para reduzir a troca de oxigênio com o material. Neste ensaio, as sementes foram mantidas em B.O.Ds a 10 e 20 °C. A cada período, as amostras eram retiradas e submetidas a avaliações de vigor por meio dos testes de condutividade elétrica, imagens de raios x, germinação e emergência.

Teste de Condutividade Elétrica (CE): A condutividade elétrica da solução de embebição das sementes foi medida segundo a metodologia adaptada de Vieira e Krzyzanowski (1999). Foram utilizadas para o teste quatro repetições de cinco sementes previamente pesadas e imersas em 75 mL de água destilada por 24 horas em B.O.D a 30 °C. A leitura da solução de embebição foi feita em condutivímetro de bancada da marca TECNAL modelo TEC-4MP.

Teste de raios x e análise de imagem radiográfica: A obtenção das imagens por raios x, foi feita no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Para isto, utilizou-se o aparelho de raios x MX-20 da Faxitron X-Ray Corporation.

Para a padronização da leitura do teste foram utilizadas 100 sementes, as sementes foram separadas em dez repetições de dez unidades, fixadas com fita dupla face em placas de acrílico transparente e numeradas sequencialmente. O tempo de exposição e a intensidade de radiação foram ajustados a 45 segundos e 30 kv respectivamente. As

imagens radiográficas foram salvas e analisadas quanto à morfologia interna das sementes.

Teste de Germinação: As sementes foram dispostas em papel “germitest” umedecido com água destilada 2,5 vezes o peso seco do papel e mantidas em germinador do tipo *Mangesdorf* a 30 °C. A avaliação da germinação ocorreu durante oito dias sendo, cada semente avaliada individualmente de acordo com a sequência numérica das imagens de raios x. Durante este período, praticamente todas as sementes tinham radícula com comprimento igual ou superior a 0,5 cm. Após a germinação, as plântulas foram mantidas no germinador até 15 dias para uniformizar o crescimento.

Teste de Emergência de Plântulas: A emergência de plântulas foi conduzida em casa de vegetação com irrigação automatizada por aspersão (28,4 °C ± 4 °C e umidade relativa do ambiente de 75 ± 5 %) quatro vezes ao dia durante oito minutos sobre os canteiros contendo areia lavada como substrato. A distribuição das sementes no substrato foi de quatro repetições com 25 sementes dispostas horizontalmente com o hilo voltado para baixo na profundidade de 2,5 cm. O critério utilizado para emergência das plântulas foi quando os dois cotilédones se apresentavam acima do substrato. As plântulas foram mantidas nos canteiros por 30 dias.

Delineamento estatístico: O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições contendo 25 sementes. No armazenamento utilizou-se o esquema fatorial com duas temperaturas e cinco tempos de armazenamento. Os resultados foram submetidos à análise de regressão pelo programa estatístico SISVAR. Para o teste de tetrazólio foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações da solução de tetrazólio utilizada nesta metodologia foram eficientes para identificar diferentes classes de vigor bem como, avaliar danos ocorrem nas sementes de *Dipteryx alata*. Houve interação entre o tempo de embebição e as concentrações utilizadas. Porém, para cada classe de vigor avaliada houve variação entre as concentrações. No lote de 2014 (Tabela 1), o melhor tempo de pré-embebição para as sementes viáveis muito vigorosas foi de 24 horas. Enquanto que nas sementes viáveis vigorosas o melhor tempo de pré-embebição foi de 36 horas na solução de 0,05%. O tempo de estocagem interfere diretamente na qualidade do lote. Visto que, o lote de 2015 apresentou maior porcentagem de sementes viáveis muito vigorosas. Tanto, que

a concentração de 0,05% foi suficiente para diagnosticar o vigor das sementes independente do tempo de pré-embebição. Segundo Azêredo *et al.* (2011), o tempo de pré-embebição das sementes é fundamental para que os tecidos se tornem permeáveis à solução do sal de tetrazólio bem como a ativação das enzimas envolvidas na respiração o que torna possível a interpretação de viabilidade do teste. Necessariamente as sementes de *Dipteryx alata* não necessita de muitas horas de pré-embebição para a realização do teste. Pensando na viabilidade e rapidez do teste, quanto menor o tempo e menor a concentração, mais econômico e acessível será o teste.

Tabela 1. Classificação de sementes de *Dipteryx alata* Vog. pelo teste de tetrazólio em função do tempo de exposição e de diferentes concentrações da solução padrão. Viável muito vigorosa (VMV), viável vigorosa (VV), viável pouco deteriorada (VPD), viável muito deteriorada (VMD) e inviável (INV). (Lote de 2014).

Variáveis	Tempo (Horas)	Concentrações (%)			CV (%)
		0,05	0,075	0,10	
VMV	24	00,00 aB*	26,65 bA	3,35 bB	94,58
	36	6,65 aA	0,00 aA	0,00 aA	
VV	24	3,32 bB	3,33 aB	60,00 aA	40,82
	36	43,32 aA	3,32 aB	3,32 bB	
VPD	24	58,32 aA	70,00 aA	20,00 bB	21,13
	36	46,65 aB	70,00 aA	46,65 aB	
VMD	24	30,00 aA	0,00 bB	10,00 bB	44,41
	36	3,32 bC	20,00 aB	50,00 aA	
INV	24	6,65 aA	0,00 aA	6,65 aA	96,08
	36	0,00 bA	0,00 aA	0,00 bA	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, para cada variável analisada, não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Classificação de sementes de *Dipteryx alata* Vog. pelo teste de tetrazólio em função do tempo de exposição e de diferentes concentrações da solução padrão. Viável muito vigorosa (VMV), viável vigorosa (VV), viável pouco deteriorada (VPD), viável muito deteriorada (VMD) e inviável (INV). (Lote de 2015).

Variáveis	Tempo (Horas)	Concentrações (%)			CV (%)
		0,05	0,075	0,10	
VMV	24	40,59 aA*	40,62 aA	23,00 bA	32,90
	36	30,00 aA	3,33 bB	46,54 aA	
VV	24	24,96 aA	12,50 bA	20,00 bA	31,75
	36	33,32 aB	53,32 aA	40,00 aAB	
VPD	24	20,81 aB	34,37 aAB	43,32 aA	42,17
	36	26,65 aA	30,00 aA	10,00 bA	
VMD	24	7,28 aA	9,37 aA	10,00 aA	91,98
	36	10,00 aA	13,32 aA	3,33 aA	
INV	24	0,00 aA	3,12 aA	0,00 aA	96,08
	36	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, para cada variável analisada, não diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A detecção das classes de vigor para as sementes de baru foi feita tanto pela observação na região do embrião quanto endosperma, indicando diferentes tonalidades em relação à coloração avermelhada típica da reação provocada pelo sal de tetrazólio (Figuras 1, 2 e 3). Os tecidos considerados viáveis e muito vigorosos foram detectados pela coloração rósea, tonalidade suave e sem danos aparentes. Já as sementes vigorosas pouco deterioradas reagiram de forma mais acentuada, destacando a intensidade do vermelho na região do embrião. As sementes muito deterioradas se destacaram pela coloração de vermelho carmim intenso em todo o endosperma e com algumas regiões no embrião sem pigmentação, ou seja, tecidos mortos que não reagiram ao sal de tetrazólio. Por último, as sementes consideradas inviáveis foram identificadas por um vermelho muito intenso e presença de tecidos mortos (sem coloração) tanto no embrião quanto no endosperma.

Segundo França Neto (1999), a variação na coloração ocorre pela presença da enzima desidrogenase do ácido málico que reduz o sal durante a respiração e transfere os íons de hidrogênio para os tecidos vivos da semente. Os tecidos deteriorados indicam células descoloridas incapaz de reagirem com o composto formado por esta reação ou

ainda tecidos com coloração muito intensa indica saturação na cadeia respiratória e colapso celular.



Figura 1: Avaliação de tetrazólio em *Dipteryx alata* Vog. (I) concentração 0,05 %, (II) concentração 0,075 %, (III), concentração 0,10 %. A) semente muito vigorosa, B) semente vigorosa pouco deteriorada, C) semente muito deteriorada; D) semente inviável.

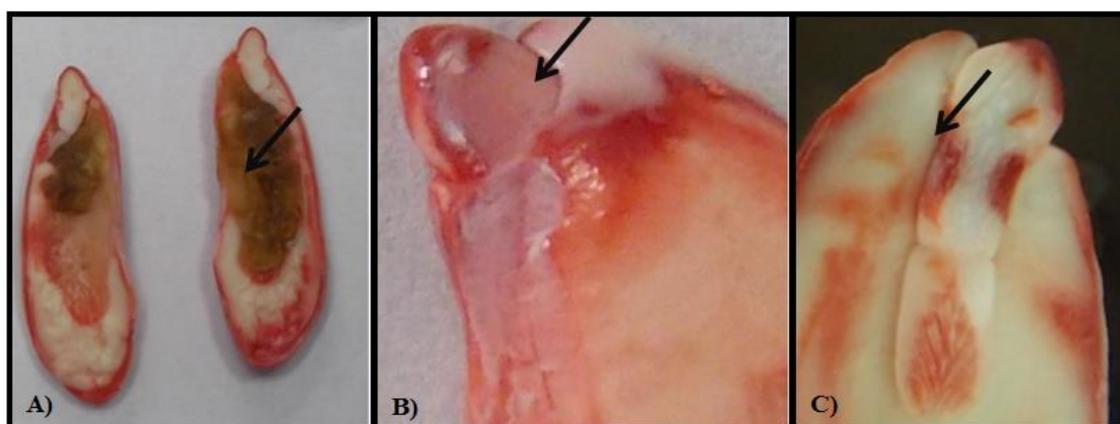


Figura 2: Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Dipteryx alata* Vog. (A) semente com necrose nos tecidos do endosperma indicado pela seta. (B e C) danos provocados por umidade indicados pela seta na região do embrião.

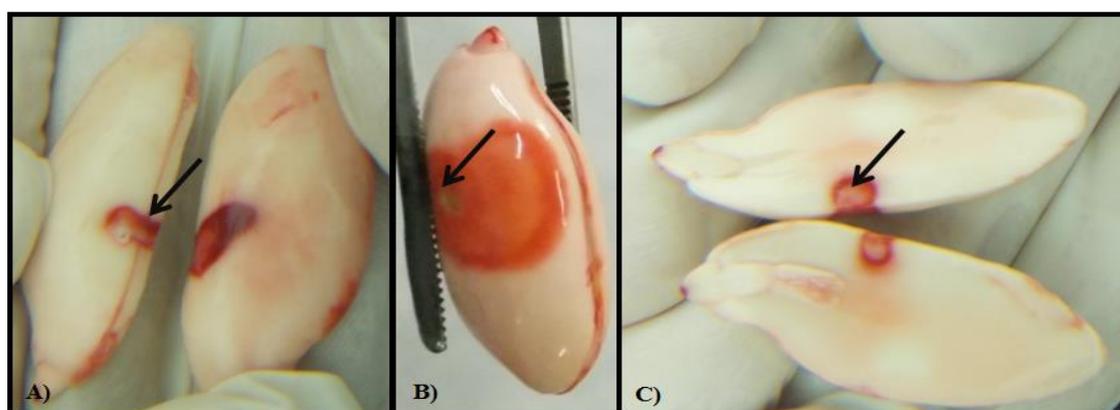


Figura 3: A) Detalhes evidenciados pela seta indicam danos mecânicos e B) e C) danos provocados por insetos nas sementes de *Dipteryx alata* Vog.

Um dos aspectos mais importantes a serem avaliados durante o armazenamento de sementes é o teor de água, pois interfere diretamente no seu metabolismo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; NAGEL; BÖRNER, 2010). Nas sementes de *Dipteryx alata* houve redução do teor de água ao longo dos 12 meses e a interação entre o tempo e a temperatura foi significativa. As sementes armazenadas inicialmente com teor de água a 7,49 reduziu para 6,12 e 5,39% (b.u) a 10 e 20 °C respectivamente (Figura 4).

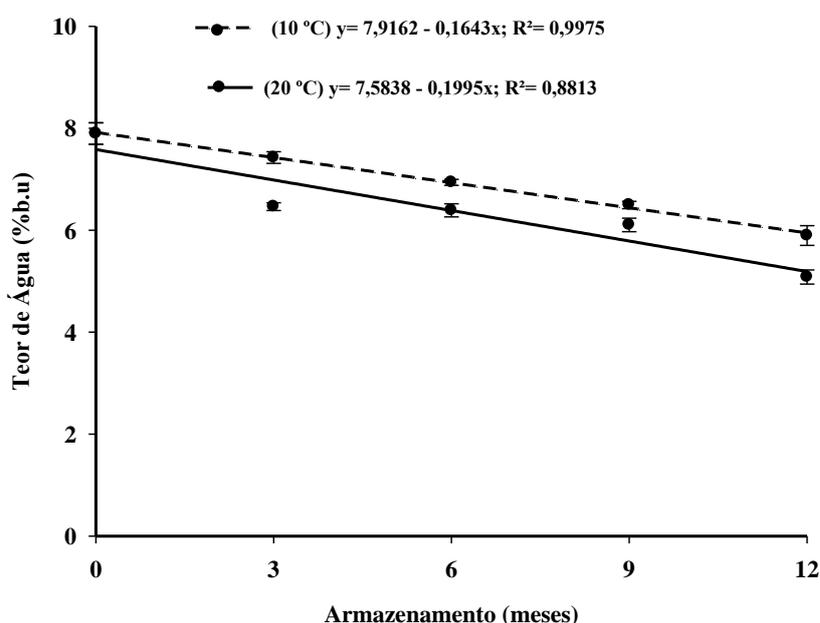


Figura 4: Teor de água de sementes de *Dipteryx alata* Vog., armazenadas em B.O.D a 10 e 20 °C por 12 meses.

Resultado contrário foi reportado por Silva et al. (2011), durante o armazenamento de sementes de *Tabebuia serratifolia* por até 12 meses em câmara fria na temperatura de 8 °C. Segundo os autores houve incremento de umidade nas sementes entre o primeiro e o terceiro mês de armazenamento.

O ganho de umidade em sementes armazenadas nem sempre é favorável, pois pode promover aumento da atividade respiratória e proliferação de microrganismos (COSTA, 2009). Por outro lado, resultados que corroboram o comportamento descrito pelas sementes de *Dipteryx alata* foram registrados em sementes de soja armazenadas a 20 °C durante seis meses, cujo teor de água reduziu nesse período (SMANIOTTO *et al.*, 2014).

A deterioração das sementes pode ocorrer no armazenamento, se as condições do ambiente não estiverem favoráveis. Um dos primeiros sinais, possíveis de se verificar

este tipo de dano é por meio da permeabilidade das membranas, que nem sempre indicará elevado grau de deterioração, uma vez que as estruturas celulares podem ser recompensadas (PANOBIANCO *et al.*, 2007).

Diante disto, os resultados observados para o teste de condutividade elétrica das sementes de *Dipteryx alata* mostraram aumento no decorrer dos 12 meses de armazenamento (Figura 5). No entanto, este aumento não está diretamente ligado à deterioração das mesmas, pois na germinação, na análise de imagem e no teste de emergência foi verificado sementes de alta qualidade fisiológica.

Estudo com sementes de soja feitos por Fessel *et al.* (2010), corroboram os resultados do presente estudo. Os autores verificaram que condições de 10 e 20 °C por até 15 meses de armazenamento promoveram aumento dos solutos presentes na solução de embebição da condutividade elétrica sem deterioração das sementes. Já em sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, submetidas ao armazenamento por até oito meses, a temperatura de 20 °C promoveu aumento de lixiviados na solução de embebição enquanto, nas sementes mantidas à 5 °C os valores foram constante ao longo do tempo (PONTES *et al.*, 2006).

O teste de condutividade elétrica feito em sementes de girassol híbrido, armazenadas por até 12 meses a 10 e 25 °C indicou deterioração nas sementes mantidas a 25 °C (ABREU *et al.*, 2011). Assim, quanto maior a situação de estresse em que as sementes são submetidas, menor será sua viabilidade, conseqüentemente menor a capacidade de formação de plântulas (BINOTTI *et al.*, 2008).

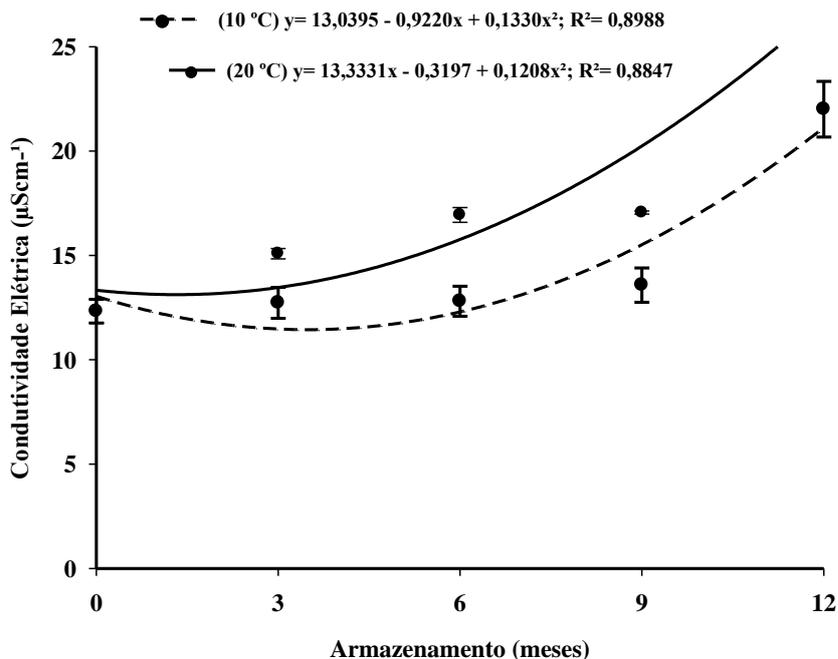


Figura 5: Condutividade elétrica de sementes de *Dipteryx alata* Vog., armazenadas em B.O.D a 10 e 20 °C, por 12 meses.

A análise de imagem aplicada nas sementes de *Dipteryx alata* no decorrer do armazenamento confirmou que elas apresentaram características viáveis. As estruturas das sementes não foram afetadas por umidade e não se observou danos provenientes da extração do fruto. Os quais poderiam interferir na qualidade do lote. Segundo Simak e Gustafsson (1953), o teste pode ser utilizado para avaliar tanto danos fisiológicos quanto morfológicos para diversas espécies.

As imagens representadas pela Figura 6 evidenciam sementes provenientes do armazenamento a 10 °C e suas respectivas plântulas, em que todas as estruturas aparecem intactas.

A longevidade das sementes de *Dipteryx alata* no armazenamento pode estar associada à disponibilidade do material de reserva, bem como as características reservadas às sementes ortodoxas. Uma vez que, o teor de água a composição química, a densidade e a espessura interferem diretamente na qualidade das imagens de raios x (SILVA *et al.*, 2014).

No entanto, ao longo do tempo a longevidade é afetada por fatores intrínsecos a cada espécie (MURTHY *et al.*, 2003). Machado e Cícero (2003) ressaltaram que as sementes de espécies florestais geralmente, pela desuniformidade de maturação e/ou desenvolvimento, promovem danos internos a si próprias. Os autores ao avaliarem

sementes de aroeira-branca, verificaram que a redução de 50 a 75% da área embrionária geram plântulas anormais ou não germinam.



Figura 6: Comparação de imagem de raios x nas sementes de *Dipteryx alata* Vog., e suas respectivas plântulas provenientes do armazenamento em B.O.D a 10 °C, durante 12 meses. *Barra 1cm.

Neste estudo, a porcentagem de sementes mortas foi inferior a 15% e a germinação foi superior a 85% (Figura 7A). Este resultado foi observado após nove meses de armazenamento e mais acentuado no 12º mês, não tendo sido observado redução de área entre o endosperma e o tegumento. Segundo Oliveira et al. (2003), o estudo da morfologia interna das sementes permite associar tipos de danos com a redução da germinação, como foi observado em sementes de canafístula, cuja redução da área de reserva comprometeu a qualidade das sementes.

Ao longo do tempo o vigor pode ser afetado por fatores intrínsecos de cada espécie (MURTHY *et al.*, 2003). Os testes de vigor para sementes florestais ainda não são totalmente definidos, sendo o teste de germinação um dos mais indicados para comparar a qualidade das sementes em diferentes condições (ALVES, 2012; MEDEIROS; ABREU, 2006). Resultados reportados por Pinho *et al.* (2009), indicaram redução da germinação em sementes de *Anadenanthera peregrina* armazenadas por cinco meses a 5 °C em câmara fria. Comportamento semelhante também foram encontrados em sementes de *Araucaria angustifolia* armazenadas por seis meses (GARCIA *et al.* (2014) e com sementes de sementes de ipê-roxo, armazenadas por 12 meses a 20 °C, que tiveram o desempenho fisiológico afetado (MARTINS, *et al.*, 2012).

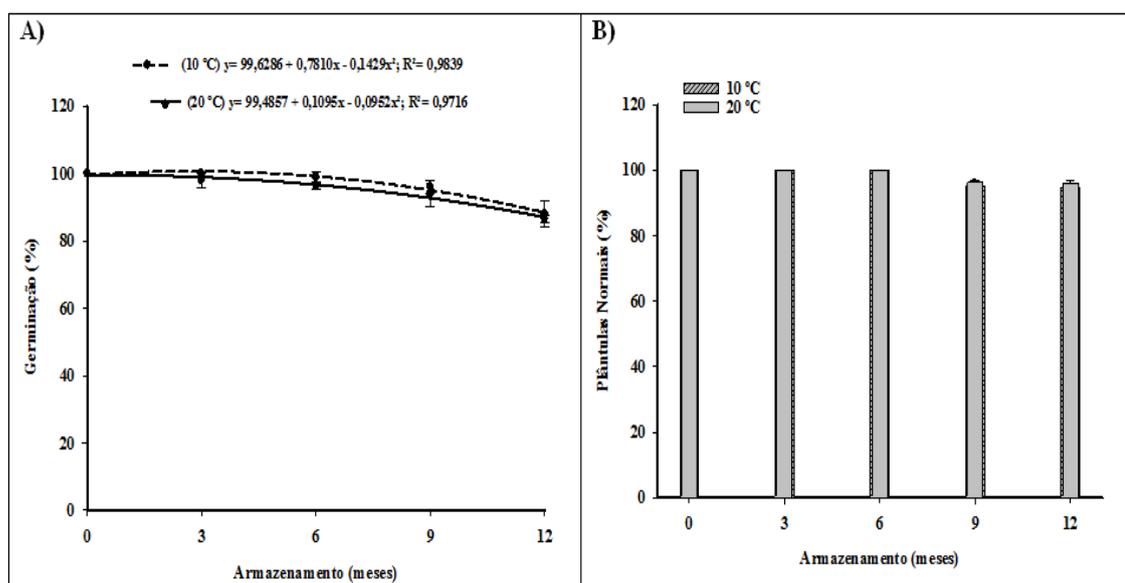


Figura 7: A) Porcentagem de germinação e B) porcentagem de plântulas normais de sementes de *Dipteryx alata* Vog., após o armazenamento em B.O.D a 10 e 20 °C, por 12 meses.

A menor porcentagem de emergência de plântulas foi observada na temperatura de 20 °C. Houve redução de 99% para 73%, aos 12 meses do armazenamento (Figura 8). Resultados semelhantes foram observados em sementes de *Myracrodruon urundeuva* em que a emergência foi afetada negativamente em virtude do armazenamento por oito meses (GUEDES *et al.*, 2012).

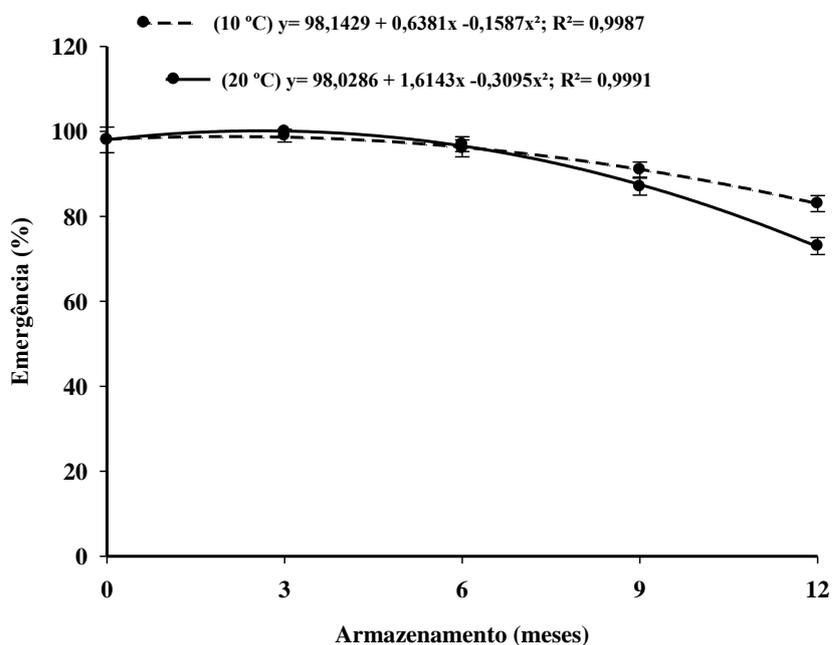


Figura 8: Porcentagem de emergência de plântulas de *Dipteryx alata* Vog., após o armazenamento em B.O.D a 10 e 20 °C por 12 meses.

CONCLUSÃO

O teste de tetrazólio foi uma ferramenta importante para avaliar o vigor das sementes de *Dipteryx alata* Vog., sendo a concentração de 0,075% e o tempo de pré-embrição de 24 horas o mais indicado. Nas condições avaliadas a análise de imagens por raios x não foi detectado nenhuma alteração morfológica das sementes. Porém, o vigor das sementes foi reduzido após nove meses de armazenamento.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. A. S.; CARVALHO, L. M.; PINTO, C. A. G.; KATAOKA, V. Y. Teste de condutividade elétrica na avaliação de sementes de girassol armazenadas sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.593-601, 2011.

ALVES, M.V.P.; Armazenamento, viabilidade e emergência de sementes e diásporos de *Emmotum nitens* (Benth) Miers. **Revista Verde**, v.7, n.3, p.163-168, 2012.

ATAÍDE, G. D.; FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogyne nitens* Tull. Durante o envelhecimento artificial. **Revista Agropecuária Tropical**, v.42, n.1, p.71-76, 2012.

AZERÊDO, G. A.; PAULA, R. C.; VALER, S. V. Viabilidade de sementes de *piptadenia moniliformis* Benth pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.01, p.061-068, 2011.

BINNOTTI, F. F. S.; HAGA, K. I.; CARDOSO, E. D.; ALVES, C. Z.; SÁ, M. E. A. R. F. O Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Acta Scientiarum Agrônômica**, v.30, n.2, p.347-254, 2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, p.395, 2009.

BURG, W. J.; VANDER, A. A. R.; TESE, J. W.; ZWOL, R. A.; VAN JALINK, H.; BINO, R. J. Predicting tomato seedling morphology by x-ray analysis of seeds. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.119, n.2, p.258-263, 1994.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p, 2000.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciências, tecnologias e produção**. 5.ed., Jaboticabal; FUNEP, p. 590, 2012.

CÍCERO, M. S.; JUNIOR, H. L. B.; Avaliação do relacionamento entre danos mecânicos e vigor, em sementes de milho, por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.29-36, 2003.

COSTA, C. J. Armazenamento e conservação de sementes de espécies do Cerrado. **Embrapa Cerrados DF**, 2009.

DEMINICIS, B. B.; VIEIRA, H. D.; SILVA, R. F.; Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Clitoria ternateal*. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.54-62, 2009.

FESSEL, S. A.; PANOBIANCO, M.; SOUZA, C.R.; VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica em sementes de soja armazenadas sob diferentes temperaturas. **Revista Bragantia**, v.69, n.1, p.207-214, 2010.

FERNANDES, D. C.; FREITAS, J. B.; CZEDERA, L. P.; NAVESB, M. M. V. Nutritional composition and protein value of the baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the Brazilian Savana. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, p.1650-1655, 2010.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. O teste de tetrazólio em sementes de soja. Londrina: **EMBRAPA-CNPSO**, 72p. (EMBRAPA-CNPSO, Documentos, 116) 1998.

FRANCA-NETO, J. B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, p.1-7, 1999.

GARCIA, C. COELHO, C. M. M.; MARASCHIN, M.; OLIVEIRA, L. M. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angusfolia* (Bertol) Kuntze durante o armazenamento. **Ciência Floresta, Santa Maria**, v.24, n.4, p.857-867, 2014.

GUEDES, R. S.; ALVES, E.U.; BRUNO, R. L. A.; GONÇALVES, E. P.; COSTA, E. G.; MEDEIROS, M. S. Armazenamento de sementes de *Myracrodruon rundeuva* Fr. All. em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.14, n.1, p.68-75, 2012.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **International Rules for Seed Testing**. Zurich, p. 174, 2004.

KOHAMA, S.; MALUF, A.M.; BILIA, D.A.C; BARBEDO, C.J. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliense* LAM. (Gruxumeira). **Revista Brasileira de Sementes**. v.28, n.1 p.72 – 78, 2006.

LIMA, L. K. S.; DUTRA, A. S.; SANTOS, C. S.; BARROS, G. L.; Utilização de técnicas na avaliação de sementes por imagem. **Revista Científica Agropecuária no Semiárido**, v.9, n.3, p.01-06, 2013.

MACHADO, C. F.; CICERO, S. M. Aroeira-branca [*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. - anacardiaceae] seed quality evaluation by the x-ray test. **Scientia Agricola**, v.60, n.2, p.393-397, 2003.

MARTINS, L.; LAGO, A. A.; CÍCERO, S. M. Conservação de sementes de ipê-roxo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.1, p.108-112, 2012.

MURTHY, U. M. N.; KUMAR, P. P.; SUN, W. Q. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.384, p.1057-1067, 2003.

NAGEL, M.; BÖRNER, A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. **Seed Science Research**, v.20, p.1-12, 2010.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; DAVIDE, A. C. Utilização do teste de raios-x na avaliação da qualidade de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.116-120, 2003.

PANOBIANCO, M.; VIEIRA, R. D.; PERECIN, D. Electrical conductivity as an indicator of pea seed aging of stored at different temperatures. **Scientia Agricola**, v.64, n.2, p.119 – 124, 2007.

PINTO, T. L.; CÍCERO, M. S.; FORTI, V. A. Avaliação de danos por umidade, em sementes de soja, utilizando a técnica da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p.28-34, 2007.

PINTO, T. L. F.; MONDO, V. V.; GOMES JÚNIOR, F. G.; CÍCERO, S. M. Análise de imagem na avaliação de danos mecânicos em soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, n.3, p.310-316, 2012.

PONTES, C. A.; CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; SILVA, A.G.; BORGES, R.C.G. Influência da temperatura de armazenamento na qualidade das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Sibipiruna). **Revista Árvore**, v.30, n.1, p.43-48, 2006.

SILVA, D. G.; CARVALHO, M. L. M.; NERY, M. C.; OLIVEIRA, L. M.; CALDEIRA, C. M.; Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento de sementes de *Tabebuia serratifolia*. **Revista Cerne**, v.17, n.1, p.1-7, 2011.

SILVA, P. P.; FREITAS, R. A.; CÍCERO, S.M.; MARCOS FILHO, J.; ASCIMENTO, W. M. Análise de imagem no estudo morfológico e fisiológico de sementes de abóbora. **Horticultura Brasileira**, v.32, n.2, p.210-214, 2014.

SIMAK, M.; GUSTAFSSON, A. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. **Hereditas**, v. 39, n.3/4, p.458-468, 1953.

SMANIOTTO, T.A.; RESENDE, O.; MARÇAL, K.AF.; OLIVEIRA, D.E.C.; SIMON, G.A.; Qualidade fisiológica das sementes de soja armazenadas em diferentes condições. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.4, p.4443-453, 2014.

TOLEDO, M. Z.; FONSECA, N. R.; CÉSAR, M. L.; SORATTO, R. P.; CAVARIANI, C. CRUSCIOL, C. A. C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Revista agropecuária tropical**, v.39, n.12, p.124-133, 2009.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: Krzyzanowsky, F. C.; Vieira, R. D.; França-Neto, J. B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: **ABRATES**, p.4/1-4/26, 1999.

WALTERS, C.; WHEELER, L. M.; GROTENHUINS, J. M. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. **Seed Science Research**, v.15, p.1-20, 2005.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos com a atividade das enzimas no estresse oxidativo indicam que, mesmo após determinadas condições adversas, as sementes de *Dipteryx alata* Vog. são aptas para a retomada da germinação, garantindo a sobrevivência da espécie. As metodologias do teste de tetrazólio e do teste de raios x foram eficientes para avaliar o vigor e a qualidade das sementes.

O armazenamento por até 12 meses garantem a sua viabilidade, permitindo que as sementes possam ser utilizadas posteriormente às diversas finalidades. Principalmente aos interesses ecológicos da espécie.