

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

SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA, ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS DE SEMENTES DE *Sapindus saponaria* L. NO
PROCESSO DE GERMINAÇÃO DURANTE O ARMAZENAMENTO

Autora: Ana Lúcia Cabral
Orientadora: Dr.^a Juliana de Fátima Sales

RIO VERDE-GO
Fevereiro, 2018

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

SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA, ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS DE SEMENTES DE *Sapindus saponaria* L. NO
PROCESSO DE GERMINAÇÃO DURANTE O ARMAZENAMENTO

Autora: Ana Lúcia Cabral
Orientadora: Juliana de Fátima Sales

Tese apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTORA 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 em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

RIO VERDE-GO
Fevereiro, 2018

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

CC117s Cabral, Ana Lúcia
SUPERANÇA DE DORMÊNCIA, ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS DE SEMENTES DE *Sapindus saponaria* L. NO
PROCESSO DE GERMINAÇÃO DURANTE O ARMAZENAMENTO / Ana
Lúcia Cabral;orientadora Juliana de Fátima Sales. -
Rio Verde, 2018.
68 p.

Tese (Doutorado em Ciências Agrárias - Agronomia)
-- Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde, 2018.

1. Histoquímica. 2. Enzimas antioxidativas. 3.
Criopreservação. I. Sales, Juliana de Fátima, orient.
II. Título.

**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 EM
SEMENTES DE *Sapindus saponaria* L. DURANTE O ARMAZENAMENTO.**

Autora: Ana Lúcia Cabral
Orientadora: Dra. Juliana De Fátima Sales

TITULAÇÃO: Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de Concentração
em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 26 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Gessimar Nunes Camelo
Avaliador externo
IFMT– Campus Campo Novo do
Parecis/MT

Prof.^a Dra. Cibele Silva Minafra
Avaliadora externa
IF Goiano – Campus Rio
Verde

Prof. Dr. Jacson Zuchi
Avaliador externo
IF Goiano – Campus Rio Verde

Prof.^a Dra. Gisele Cristina De Oliveira
Menino
Avaliadora externa
IF Goiano – Campus Rio Verde

Prof.^a Dra. Juliana de Fátima Sales
Presidente da banca
IF Goiano – Campus Rio Verde

DEDICATÓRIA

*A minha filha Maria Fernanda de Araújo Cabral,
meus pais Divino Alberto Cabral
e Vera Lúcia Pires Cabral,
meu irmão Divino Alberto Cabral,
minha avó Alaides Pires Cabral,
e meu saudoso avô Rafael Vieira Cabral.
Dedico!*

*“Semeia um pensamento e colherás um desejo; semeia um desejo e colherás uma ação;
semeia uma ação e colherás um hábito; semeia o hábito e colherás um caráter.”*
(Galileu Galilei)

AGRADECIMENTO

A Deus, por abençoar e guiar minha trajetória, em todos os momentos de minha vida, sempre me fortalecendo nos momentos de fraqueza.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, pela oportunidade de participar do programa de Pós-Graduação em Ciência Agrárias, para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Agrárias-Agronomia.

A minha filha, Maria Fernanda de Araújo Cabral, meus pais, Divino Alberto Cabral e Vera Lúcia Pires Cabral, meu irmão Divino Alberto Cabral Júnior, meus sobrinhos Miguel Alecrim Cabral, Rafael Alecrim Cabral e todos os meus familiares, pela força, amor e por tudo que representam na minha vida. Amo muito vocês!

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Juliana de Fátima Sales, pela oportunidade de ser sua orientada, por todos ensinamentos, paciência, companheirismo e incentivo na vida profissional.

Aos membros da banca examinadora, Prof.^a Dr.^a Juliana de Fátima Sales, Prof. Dr. Jacson Zuchi, Prof. Dr. Gessimar Nunes Camelo, Prof.^a Dr.^a Cibele Silva Minafra e Dr.^a Gisele Menino.

Ao Prof. Dr. Glauter Lima de Oliveira (*In memoriam*), Dr. Jacson Zuchi e Dr.^a Kelly Juliane Telles, pelo auxílio e contribuição na condução das pesquisas.

Aos estagiários e bolsistas de iniciação científica, mestrandos e doutorandos do Laboratório de Sementes, por toda ajuda nos experimentos.

A todos os professores, servidores e amigos do IFGoiano, pela atenção sempre dispensada.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, principalmente Arthur Almeida Rodrigues e Douglas Almeida Rodrigues, que sempre estão dispostos a ajudar com toda simpatia e eficiência.

A Jennifer Maiara Domingues Silva, que se tornou muito mais que uma colega de pesquisa, mas uma amiga para todas as horas, sua ajuda foi essencial para a conclusão desse trabalho.

A irmã que o doutorado me deu, Karine Feliciano Barbosa, pelo apoio em todos os momentos e principalmente pelo amor incondicional. Sem você essa tese jamais seria concluída.

A todos que de uma forma ou de outra colaboraram para o encerramento desta etapa tão importante da minha vida.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA DO AUTOR

ANA LÚCIA CABRAL, filha de Divino Alberto Cabral e Vera Lúcia Pires Cabral, nasceu em Rio Verde, Goiás, aos vinte e um dias do mês de agosto de 1976.

Graduada no curso de Licenciatura Plena em Biologia, no ano de 1999, pela Universidade de Rio Verde – UniRV.

Em 1999, iniciou a dedicação ao Ensino Fundamental e Médio no Colégio Ápice e que atuou até ano de 2016.

Em julho de 2000, foi aprovada no concurso público da Prefeitura Municipal de Rio Verde como professora de Biologia no Ensino Fundamental e Médio, onde atuou até agosto de 2016.

Em março de 2009, ingressou no Programa de Pós-Graduação *STRICTO SENSU* em Ciências Agrárias, atuando em pesquisas com produção de biodiesel.

No dia 28 de fevereiro de 2011, submeteu-se a defesa de dissertação, como requisito fundamental para a obtenção do título de mestre em Ciências Agrárias/Agronomia.

Em março de 2014, dando continuidade a 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.

Em agosto de 2016, foi aprovada no concurso público para professora de Biologia do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Mato Grosso do Sul - Campus Aquidauana, onde atua atualmente.

No dia 26 fevereiro de 2018, submeteu-se a defesa de tese, como requisito fundamental para a obtenção do título de Doutora em Ciências Agrárias/Agronomia.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	xiii
RESUMO	15
ABSTRACT	17
1.INTRODUÇÃO GERAL	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Sabãozinho (<i>Sapindus saponaria</i> L.)	2
2.2 Enzimas antioxidativas	3
2.3 Germinação	4
2.4 Dormência	5
2.5 Armazenamento	6
2.6 Criopreservação	8
3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
OBJETIVO GERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
CAPÍTULO I: Germinação e superação de dormência de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L	
Resumo	15
Introdução	15
Material e métodos	16
Resultados e Discussão	19
Conclusões	29

Referências Bibliográficas	29
CAPÍTULO II: Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes armazenadas de <i>Sapindus saponaria</i> L.	
Resumo	33
Introdução	34
Material e Métodos	35
Resultados e Discussão	38
Conclusões	43
Referências Bibliográficas	43
CAPÍTULO III: Criopreservação de sementes armazenadas de <i>Sapindus saponaria</i> L.	
Resumo	48
Introdução	49
Material e Métodos	50
Resultados e Discussões	53
Conclusão.....	63
Referências Bibliográficas	64
Considerações Finais	68

ÍNDICES DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I: Germinação e superação de dormência de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L.....	26
Tabela 1: Histoquímica do endosperma de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L. após testes de superação de dormência.....	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	
Figura 1. A. Planta de <i>Sapindus saponaria</i> L.; B. Frutos de <i>Sapindus saponaria</i> L.; C. Frutos de <i>Sapindus saponaria</i> L.; D. Sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L..	3
CAPÍTULO I: Germinação e superação de dormência de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L.	
Figura 1. Porcentagem de emergência de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos	20
Figura 2. Índice de Velocidade de emergência de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos	21
Figura 3. Massa seca de raiz (MMSR) e massa de matéria seca de parte aérea (MMSA) de plântulas de <i>Sapindus saponaria</i> L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos	22
Figura 4. Comprimento de raiz (CR), comprimento caulinar (CC), massa de seca raiz (MMSR) e massa seca de parte aérea (MMSA) de plântulas de <i>Sapindus saponaria</i> L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativo	23
Figura 5. Anatomia do endosperma de semente de <i>Sapindus saponaria</i> L. após testes de superação de dormência. (A) sem superação de dormência, (B) imersão em ácido sulfúrico concentrado por 60, (C) 75 e (D) 90 min, escarificação manual com lixa d'água n° 80 na região oposta ao hilo (E), escarificação manual com lixa d'água n° 80 na região oposta ao hilo e imersão em água durante 24 h (F), imersão em água à temperatura de 70°C por 30 min (G), escarificação manual com lixa d'água n° 80 e imersão em ácido giberélico (1000 ppm) durante 24 h a 25°C (H), armazenamento a 41°C durante 72 h (I), embebição a 10°C por 72 h (J). Setas indicam espaços intracelulares e colapso celular	24
Figura 6. (A): Percentual de Germinação (%G) e (B): Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes <i>Sapindus saponaria</i> L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos	27
Figura 7. (A): Sementes Duras (%) e (B): Sementes Intumescidas (%) de sementes <i>Sapindus saponaria</i> L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos	28

CAPÍTULO II: Alterações Fisiológicas e Bioquímicas em Sementes Armazenadas de <i>Sapindus Saponaria</i> L.	
Figura 1. Porcentagem de Germinação (F), Porcentagem de Emergência (G); Porcentagem de Germinação do Envelhecimento Acelerado (H), Comprimento de Plântula (cm) (I), Massa Seca de Plântula (g) (J) de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L. durante 12 meses de armazenamento em temperaturas de 10, 20 e 25°C	39
Figura 2: Atividade da CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot) (A), Atividade da SOD (B), Atividade da POX ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot) (C), MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de massa fresca) (D), concentração de proteínas mg/g de massa fresca) (E) de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L., durante 12 meses de armazenamento em temperaturas de 10, 20 e 25 °C.	41
CAPÍTULO III: Criopreservação de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L.	
Figura 1. Percentual de emergência de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L. sob armazenamento criogênico com uso de diferentes teores de água (b.u.%) e métodos de descongelamento	54
Figura 2. Percentual de germinação de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L. sob armazenamento criogênico com uso de diferentes teores de água (b.u.%) e métodos de descongelamento	55
Figura 3. Índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L. sob armazenamento criogênico com uso de diferentes teores de água (b.u.%) e métodos de descongelamento	56
Figura 4. Percentual de germinação do envelhecimento acelerado de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L., sob armazenamento criogênico com uso de diferentes teores de água (b.u.%) e métodos de descongelamento	57
Figura 5. Comprimento total de plântulas (cm) de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L. sob armazenamento criogênico com uso de diferentes teores de água (b.u.%) e métodos de descongelamento	58
Figura 6. Percentual de germinação (A), percentual de emergência (B), comprimento de plântulas (cm) (C), massa de matéria seca (g) (D) e teor de água (b.u.) (E) de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L. sob armazenamento criogênico com uso de diferentes crioprotetores em diferentes períodos de armazenamento	60
Figura 7. Proteínas totais (mg/mg de massa fresca) (A), Catalase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot) (B) e Superóxido dismutase (U SOD) (C) de sementes de <i>Sapindus saponaria</i> L. sob armazenamento criogênico com uso de diferentes crioprotetores em diferentes períodos de armazenamento	61

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

μL	Micro Litro
μmol	Micro Mol
ATP.....	Trifosfato de adenosina
b.u.....	Base úmida
BOD.....	Câmara de germinação a seco
CAT.....	Catalase
CC.....	Comprimento Caulinar
cm.....	Centímetros
CR.....	Comprimento da Raiz
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
EDTA.....	Ácido etilenodiaminotetracético
EROS.....	Espécies reativas de oxigênio
g.....	Gramas
H_2O_2	Água oxigenada
IVE.....	Índice de Velocidade de Emergência
IVG.....	Índice de Velocidade de Emergência
IVG.....	Índice de velocidade de germinação
mL.....	Mililitros
MSA.....	Massa Seca da Parte Aérea
MSR.....	Massa Seca da Raiz
N_2	Nitrogênio líquido
NBT.....	Azul de p-nitro tetrazólio
nm.....	Nanômetro
O_2	Oxigênio
$^\circ\text{C}$	Graus Celsius
PAS.....	Ácido Periodio/Reagente de Schiff
pH.....	Potencial de hidrogênio
PMSF.....	Phenyl methyl sulfonyl fluoride
POX.....	Peroxidase
ppm.....	Parte por Milhão
PVPP.....	Polivinilpirrolidona
RAS.....	Regras para Análise de Sementes
SOD.....	Superóxido dismutase
TCA.....	Ácido Tricloroacético

UR..... Umidade Relativa
VE..... Velocidade de Emergência

RESUMO

A demanda por sementes e mudas de *Sapindus saponaria* L. tem aumentado ao longo dos anos, particularmente para o seu plantio como árvore ornamental, devido ao baixo porte (até 8m), copa densa e globosa e, também, como planta medicinal. Esse último caso, ocorre porque as raízes, frutos e casca de *S. Saponaria* apresentam substâncias adstringentes, antiespasmódicas, calmantes, antitussígenas, larvicidas e fungicida. O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes tratamentos pré-germinativos, características histoquímicas e o desempenho fisiológico de sementes de *S. saponaria* em função da temperatura e de substrato para a germinação; estudar a influência de diferentes condições e tempo de armazenamento sobre a germinação e o vigor de sementes de *S. saponaria*; avaliar o comportamento fisiológico e o vigor de sementes de *S. saponaria* durante a criopreservação com diferentes teores de água, testando métodos de descongelamento e crioprotetores durante o armazenamento por 180 dias. Para a superação de dormência o ensaio foi composto por 10 tratamentos de superação de dormência, enquanto para o teste de germinação foram avaliados 2 substratos (papel e areia) e 4 temperaturas 20, 25, 30 e alternadas de 20–30 °C ($\pm 0,5$ °C) por 35 dias. Na avaliação do armazenamento convencional, as sementes foram acondicionadas em embalagens de saco plástico de alta densidade, as quais foram lacradas e mantidas nas seguintes condições ambientais: armazenadas em temperatura ambiente de laboratório 25 °C (± 2 °C); BOD 20 \pm 2 °C e 50 a 60% UR e BOD 10 \pm 2 °C e 50 a 60 % UR. Inicialmente, depois de 3 meses, 6 meses, 9 meses e 12 meses, as sementes foram submetidas aos testes de germinação, emergência, envelhecimento acelerado e ensaios bioquímicos. Na avaliação de criopreservação, o estudo foi dividido em dois ensaios, Ensaio 1: As sementes foram submetidas ao processo de secagem em estufa de circulação forçada, com temperatura de 40 °C, até que obtivessem os teores estabelecidos (8, 7, 6, e 5 % b.u.), depois foram acondicionadas em nitrogênio líquido a -

196 °C por 10 dias; então, as sementes foram submetidas a descongelamento lento, rápido e micro-ondas. Ensaio 2: Após a determinação do melhor teor de água para a criopreservação de sementes de *S. saponaria*, as sementes foram submetidas aos diferentes tratamentos de crioproteção: nitrogênio líquido sem o crioprotetor, nitrogênio líquido com o crioprotetor glicerol (10%) e com o crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) (10%), em todos os tratamentos as sementes foram acondicionadas em nitrogênio líquido a -196 °C e armazenadas de 30 a 180 dias. Após o descongelamento e o armazenamento com e sem crioprotetores, as sementes foram submetidas à avaliação fisiológica e testes de vigor. A escarificação de sementes de *S. saponaria* com ácido sulfúrico concentrado por 90 min proporcionou maior velocidade e percentual de emergência em relação aos demais tratamentos, não acarretando danos anatômicos. Tratamentos pré-germinativos, com uso de estresse por alta ou baixa temperatura, podem provocar danos celulares na região do endosperma de sementes de *S. saponaria*. A condução do teste de germinação de sementes de *S. saponaria* em substrato papel e a 30 °C proporcionou maior porcentagem de germinação. Sementes de *S. saponaria* mantêm suas qualidades fisiológicas e vigor ao longo do armazenamento por um período de 9 meses, independentemente das temperaturas avaliadas (10 °C, 20 °C e 25 °C). Sementes de *S. saponaria* podem ser criopreservadas, sendo que nesse estudo o teor de água 6 % (b.u.) demonstrou ser o melhor teor para sua criopreservação. O micro-ondas apresentou o melhor método de descongelamento. Este estudo indica que para criopreservação de sementes de *S. saponaria* não há necessidade do uso de soluções crioprotetoras.

Palavras-chave: Histoquímica; Enzimas antioxidativas; Criopreservação

ABSTRACT

The demand for *Sapindus saponaria* L. seeds and seedlings has increased over the years, because of its planting as an ornamental tree, due to the small size (up to 8 m), dense and globose canopy, and also as a medicinal plant. The latter case is due to the fact that the roots, fruits and bark of *Sapindus saponaria* L. present astringent, antispasmodic, calming, antitussive, larvicidal and fungicidal substances. The objective of this study was to evaluate different pre-germination treatments, histochemical characteristics and the physiological performance of *Sapindus saponaria* L. seeds in function of temperature and substrate for germination; to study the influence of different conditions and storage time influence on germination and seed vigor of *Sapindus saponaria* L.; to evaluate the physiological behavior and vigor of *Sapindus saponaria* L. seeds during cryopreservation with different water contents, testing methods of thawing and cryoprotectants during storage for 180 days. In order to overcome dormancy, the test consisted of 10 dormancy surpassing treatments, whereas for the germination test, 2 substrates (paper and sand) and 4 temperatures 20, 25, 30 and alternated of 20-30 °C (± 0.5 °C) for 35 days. In the conventional storage evaluation the seeds were stored in high density plastic bags, which were sealed and kept in the following environmental conditions: stored at laboratory room temperature 25 °C (± 2 °C); BOD 20 ± 2 °C and 50 to 60 % b.u. and BOD 10 ± 2 °C and 50 to 60 % b.u.. Initially, after 3, 6, 9 and 12 months, the seeds were submitted to germination, emergency, accelerated aging and biochemical tests. In the cryopreservation evaluation, the study was divided in two tests, Test 1: The seeds were submitted to the drying process in a forced circulation oven, with a temperature of 40°C, until they reached the levels established (8, 7, 6, 5 % b.u.), and were packed in liquid nitrogen at -196° C for 10 days; then the seeds were subjected to slow, rapid thawing and microwave. After

the determination of the best water content for *Sapindus saponaria* L. seeds, cryopreservation the seeds were submitted to different cryoprotection treatments: liquid nitrogen without cryoprotectant, liquid nitrogen with cryoprotectant glycerol (10 %) and the cryoprotectant dimethylsulfoxide (DMSO-10 %), in all treatments the seeds were conditioned in liquid nitrogen at -196°C and stored for 30 to 180 days. After thawing and storage with and without cryoprotectants the seeds were submitted to physiological evaluation and vigor tests. Scarification of *S. saponaria* seeds with concentrated sulfuric acid for 90 min provided higher speed and percentage of emergence in relation to the other treatments, without causing anatomical damage. Pre-germination treatments, using high or low temperature stress, can cause cellular damage in the endosperm region of *Sapindus saponaria* L. The seed germination test of *Sapindus saponaria* L. on paper substrate and at 30 °C presented highest percentage of germination. Seeds of *Sapindus saponaria* L. maintains its physiological qualities and vigor throughout storage for a period of 9 months, regardless of the temperatures evaluated (10 °C, 20 °C and 25 °C). Seeds of *Sapindus saponaria* L. may be cryopreserved, and in this study the water content 6 % (b.u.) was shown to be the best one for their cryopreservation. The microwave presented the best method of thawing, possibly because it caused less damage to the cell membrane. For cryopreservation of *Sapindus saponaria* L. seeds cryopreservation it is not necessary to use solutions, however, due to the complexity of the evaluation of these variables, further studies are necessary for this species.

Keywords: Histochemistry; Antioxidative enzymes; Cryopreservation

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado brasileiro é um bioma típico da zona tropical, constituído por uma formação savânica que ocupa uma área territorial de aproximadamente 2,0 milhões de km² e corresponde a quase 25 % do território nacional, compreendendo vários estados das regiões centro-oeste, norte e nordeste do Brasil.

Apesar das limitações impostas ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas pelo regime de chuvas e pelas características do solo, o Cerrado apresenta surpreendente variabilidade de espécies nativas. Segundo Barbosa (1996), algumas dessas espécies podem constituir potenciais fontes de exploração econômica, desde que a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias viabilizem seu aproveitamento. Para viabilizar, é preciso primeiro conservar esse patrimônio biológico, pois devido aos avanços das fronteiras agrícolas no Brasil nos últimos vinte anos, muitos desses materiais estão desaparecendo.

Assim sendo, o armazenamento de sementes constitui uma forma segura e econômica de conservação da diversidade genética de espécies vegetais nativas, além de representar uma estratégia segura para suprir a demanda contínua por sementes em períodos de escassez. Todavia, segundo Costa (2009), para o armazenamento eficiente das sementes, sua qualidade fisiológica deve ser mantida pelo maior período possível, o que depende do conhecimento prévio do comportamento fisiológico das sementes durante o armazenamento.

Para muitas espécies arbóreas nativas, a produção de sementes é irregular, podendo ser escassa em determinados anos e abundante em outros (Carneiro; Aguiar, 1993). Desse modo, o armazenamento das sementes é uma forma de regular sua disponibilidade para fins de recuperação de áreas degradadas, reflorestamentos e plantios comerciais, além de representar a maneira mais simples, viável e econômica de conservar e preservar a variabilidade genética vegetal *ex situ*, por meio do estabelecimento de bancos de germoplasma (Van Slageren, 2003). Entretanto, para a maioria das espécies arbóreas nativas, o conhecimento das condições ideais para a manutenção da qualidade das

sementes ao longo do armazenamento é limitado ou inexistente, dada a grande diversidade de espécies da flora brasileira (Carvalho et al., 2006).

Durante o armazenamento, a conservação da qualidade das sementes é influenciada, entre outros fatores, pela sua qualidade inicial, teor de água, umidade relativa e temperatura do ar, ação de fungos e insetos, tipos de embalagens, disponibilidade de oxigênio e período de armazenamento (Carvalho; Nakagawa, 2012).

Considerando que a deterioração das sementes durante o armazenamento é um processo inevitável e irreversível, são essenciais estudos que possam esclarecer os eventos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem nas sementes de espécies nativas, durante o armazenamento com vistas a reduzir perdas e aumentar o período de conservação dessas sementes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sabãozinho (*Sapindus saponaria* L.)

Sapindus saponaria L., pertencente à família Sapindaceae, conhecida vulgarmente como sabão de macaco, saboeiro, sabão de minas, sabonete e saboneteira, é uma árvore pereniforme ou semidecídua, de ocorrência em florestas pluviais e semidecíduas (Região Amazônica até Goiás e Mato Grosso). (Lorenzi, 2002). Segundo Oliveira et al. (2012), essa espécie é de grande importância para o reflorestamento de áreas degradadas, confecção de brinquedos, uso de suas sementes para o artesanato e exploração de sua madeira para o emprego na construção civil.

A demanda por sementes e mudas de *S. saponaria* tem aumentado ao longo dos anos, particularmente para o seu plantio como árvore ornamental, pelo baixo porte (até 8m), copa densa e globosa e, também, como planta medicinal. Esse último caso se dá pelo fato de que as raízes, frutos e casca de *Sapindus saponaria* apresentam substâncias adstringentes, antiespasmódicas, calmantes, antitussígenas (Lorenzi, 2002), larvicidase fungicida (Tsuzuki et al., 2007). Sua composição fitoquímica é bem conhecida e inclui grande diversidade de produtos químicos compostos, tais como saponinas (Pelegri et al., 2008).

As saponinas presentes nos seus frutos possuem propriedades tensoativas e farmacológicas. Esses compostos são classificados como triterpenoides e apresentam atividade antiulcerativa e antineoplásica (Albiero et al., 2001). Embora se conheça a composição fitoquímica do fruto dessa espécie e seus efeitos como propriedades

farmacêuticas, poucos trabalhos se referem ao seu potencial alelopático sobre outras espécies de plantas. O interesse na exploração de compostos do metabolismo secundário é visto como alternativa estratégica na agricultura, inclusive para o controle de ervas daninhas (Alves et al., 2003).

A propagação *S. saponaria* pode ser realizada por sementes ou por estacas (Ferriani et al., 2010). Essa espécie produz anualmente grande quantidade de sementes com viabilidade de armazenamento superior a um ano. Na produção de mudas por sementes, os frutos devem ser coletados diretamente da árvore e, quando iniciarem sua queda espontânea, devem ser levados ao sol para secar e facilitar a retirada das sementes, que podem germinar sem tratamento, porém, com taxas geralmente moderadas a baixas (Lorenzi, 1992). A dormência das sementes é resultante do tegumento impermeável que as reveste; as condições ideais para o teste de germinação ainda não foram definidas (Oliveira et al., 2012).



Figura 1. A. Planta de *Sapindus saponaria* L.; B. Frutos de *Sapindus saponaria* L.; C. Frutos de *Sapindus saponaria* L.; D. Sementes de *Sapindus saponaria* L..

2.2 Enzimas antioxidativas

Para muitos autores, os primeiros sinais da deterioração de sementes estão relacionados com a alteração ou perda da integridade das membranas celulares. Porém, tem sido observado que mesmo antes desse fenômeno, a redução ou aumento da atividade de determinadas enzimas são indicativo do início deste processo (Marcos Filho, 2009).

A peroxidação de lipídios é frequentemente citada como a principal causa da perda da integridade da membrana e, conseqüentemente, da deterioração de sementes (McDonald Jr., 1999). Dessa forma, a intensidade e velocidade do processo deteriorativo nas sementes pode estar relacionado à composição química das mesmas. A longevidade das sementes no armazenamento depende, além da composição química, de fatores como teor de água, conteúdo de óleo, genótipo, condições de ambiente, embalagem, dentre outros fatores (Carvalho; Nakagawa, 2012; Marcos Filho, 2005).

De acordo com Medeiros (2001), o processo de deterioração teria como alteração bioquímica inicial a desestruturação do sistema de membranas em nível celular, por meio da ação de radicais livres. Segundo Bewley et al. (2013), a peroxidação de um ácido graxo insaturado ocorre, inicialmente, com a remoção de um átomo de hidrogênio ligado ao carbono adjacente à dupla ligação, para produzir um radical livre, reagindo com o oxigênio molecular, resultando num rearranjo na cadeia do ácido graxo e na formação de um radical peróxido. Os principais agentes oxidantes gerados são: hidroxilas (OH^\cdot), ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

As células apresentam um complexo sistema de defesa antioxidante para proteção dos danos causados pelas espécies de oxigênio ativo (McDonald Jr., 1999). O sistema de defesa antioxidativo enzimático das plantas inclui diversas enzimas antioxidantes nos diferentes compartimentos celulares. Dentre as principais enzimas são citadas as peroxidases (POD; EC 1.11.1.1), a superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) e a catalase (CAT; EC 1.11.1.6) que juntamente com outras enzimas, protegem as células dos efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Resende, Salgado; Chaves, 2003; Bailly, 2004; Cavalcantiet al., 2004; Soares; Machado, 2007).

2.3 Germinação

A germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado pelos botânicos como a retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento da cobertura protetora pela raiz primária. Entretanto, para os tecnologistas de sementes, a germinação é definida como a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, manifestando a sua capacidade para dar origem a uma planta normal, sob condições ambientais favoráveis (Marcos Filho, 2005).

Höfs et al. (2004) descrevem a germinação como uma sequência de reações bioquímicas em que substâncias de reserva são desdobradas, transportadas e ressintetizadas no eixo embrionário. O processo germinativo inicia com a absorção de água pelas sementes e culmina com o alongamento do eixo embrionário (Bewley, 1997; Egley, 1999). Brasil (2009) e ISTA (1993) definem a germinação como a emergência e o desenvolvimento da plântula até alcançar um estado que permita indicar a capacidade desta em se transformar em uma planta, sob condições favoráveis no solo (Lucca; Reis, 1995).

A germinação em geral é afetada por fatores internos e externos. Os internos são intrínsecos da semente, como a longevidade e viabilidade; os fatores externos estão

relacionados às condições ambientais como a temperatura, disponibilidade de água e oxigênio (Galindo et al., 2012).

Machado e Cícero (2002) afirmam que a resposta das sementes ao ambiente é variável entre espécies, motivo pelo qual há necessidade da padronização. Para a ocorrência da germinação, a semente viva e não dormente necessita dispor de condições ambientais favoráveis como as propiciadas nos laboratórios de sementes, em que se tem o controle de temperatura, substrato, água e luz (Piña-Rodrigues et al., 2004).

2.4 Dormência

Algumas espécies retardam a germinação de suas sementes, até que as condições do ambiente estejam adequadas para o seu estabelecimento e sobrevivência. Esse mecanismo, denominado dormência, constitui numa estratégia benéfica às sementes, pela distribuição da germinação ao longo do tempo, aumentando, assim, a probabilidade de sobrevivência das espécies (Fowler e Bianchetti, 2000).

Assim, a dormência se apresenta vantajosa para a perpetuação e o estabelecimento de muitas espécies vegetais nos mais variados ambientes (Zaidan e Barbedo, 2004), ampliando a possibilidade de estabelecimento de novos indivíduos ou a colonização de novas áreas por distribuir a germinação no espaço e no tempo (Carvalho e Nakagawa, 2000).

Por outro lado, a dormência é, geralmente, uma característica indesejável na agricultura, em que a rápida germinação e crescimento são requeridos (Tedesco et al., 2001) e também para os viveiristas, cuja dormência acaba por gerar problemas como desuniformidade entre as mudas, além de maior tempo de exposição às condições adversas, como a ação de pássaros, insetos, doenças, além de maior risco de perda de sementes por deterioração (Eira et al., 1993; Carvalho, 1994).

No entanto, a presença de dormência é vantajosa pelo menos durante o desenvolvimento da semente (Bewley e Black, 1994), uma vez que ela é capaz de impedir a germinação antes que ocorram condições propícias, ou como proteção contra danos durante a dispersão (Borges e Rena, 1993).

2.5 Armazenamento

A semente é a forma pela qual a planta sobrevive o máximo de tempo com o mínimo de atividade fisiológica, por isso, a forma mais fácil de armazenar recursos genéticos é através da conservação de suas sementes (Bachiller, 1997). Nos últimos anos, técnicas de conservação têm sido desenvolvidas para aumentar a longevidade das sementes, dentre as quais estão o armazenamento em condições não controladas de ambiente, o armazenamento em câmaras frias e secas, além das técnicas de criopreservação (Stanwood, 1984).

A longevidade é caracterizada pelo período em que a semente se mantém viva, com capacidade de germinar quando se encontrar em condições favoráveis, se não for dormente (Carvalho; Nakagawa, 2012). Como a longevidade é uma característica genética inerente à espécie, somente a qualidade inicial das sementes e as condições do ambiente de armazenamento podem ser manipuladas para uma adequada conservação.

Durante o período de armazenamento, a temperatura e a umidade relativa do ar são os principais fatores físicos que afetam a manutenção da qualidade das sementes (Macedo et al., 1998). Desses dois fatores, a umidade relativa é considerada mais importante, dada a sua relação direta com o teor de água das sementes, uma vez que o aumento no teor de água da semente eleva a sua atividade metabólica. Entretanto, a temperatura contribui significativamente, afetando a velocidade dos processos bioquímicos (Marcos filho, 2005). Conseqüentemente, o período de viabilidade da semente pode ser aumentado não somente pela redução da umidade, mas também pela redução da temperatura de armazenamento. Para seringueira, Paula *et al.* (1997), verificaram que a temperatura de 5 °C foi mais eficiente em prolongar a longevidade das sementes quando comparada a 20 °C. Trabalhando com sementes de cedro-rosa, Figliolia et al. (1988) observaram que sementes armazenadas em ambiente frio ou seco conservam o poder germinativo (96 %) por 240 dias, enquanto aquelas mantidas em ambiente não controlado apresentaram 34 % de germinação, após o mesmo período. Os mesmos constataram que resultados mais favoráveis foram observados em sementes com 7,5 % de água em relação àquelas com 12,4 % que perderam a viabilidade rapidamente.

O armazenamento de sementes assume papel importante na preservação dessa qualidade, e quando bem conduzido minimiza tanto o processo deteriorativo, como também mantém a viabilidade do material genético por muito tempo. Assim, o armazenamento constitui em uma etapa obrigatória de um programa de produção de sementes. De acordo com Vieira et al. (2008), o objetivo básico do armazenamento é

manter o nível de qualidade das sementes, reduzindo ao mínimo o seu processo de deterioração, que pode ser mais rápido ou mais lento, dependendo das características ambientais e da própria semente.

As melhores condições para a manutenção da qualidade de sementes ortodoxas são a baixa umidade relativa do ar e a baixa temperatura, por reduzirem a atividade metabólica do embrião (respiração) e a mobilização de reservas (carboidratos e lipídios) que conseqüentemente resulta na deterioração destas (Carvalho; Nakagawa, 2012; Marcos Filho, 2005). Vários autores observaram decréscimos na viabilidade e no vigor das sementes durante o período de armazenamento (Arrigoni-Blank et al., 1997; Macedo et al., 1998; Corvello et al., 1999; Freitas et al., 2000; Pádua; Vieira, 2001).

As principais alterações que ocorrem na cadeia lipídica durante o processo deteriorativo são atribuídas às hidrólises enzimáticas, à peroxidação e à autooxidação. A temperatura necessária para a degradação ou desestabilização da cadeia do amido é mais elevada quando se compara com a temperatura crítica para a desestruturação da cadeia lipídica. Por exemplo, em espécies tipicamente oleaginosas, como a mamona e o algodão, uma elevação moderada que seja da temperatura da massa da semente, como consequência do processo respiratório, é suficiente para a decomposição dos lipídios e elevação da taxa de deterioração. Assim as sementes oleaginosas devem ser armazenadas com grau de umidade inferior ao recomendado para sementes de espécies amiláceas. O teor de proteínas também pode contribuir para a redução do potencial de armazenamento, por causa da elevada afinidade dessa substância com a água que pode vir a aumentar a taxa respiratória da semente (Braccini et al., 2001; Marcos Filho, 2005).

A deterioração das sementes envolve uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas e físicas que provocam a queda progressiva e irreversível da qualidade, culminando com a morte das mesmas. Dentre as principais alterações envolvidas na deterioração das sementes, destacam-se a alteração das membranas celulares (redução da integridade, aumento da permeabilidade e desorganização), redução da produção de ATP, diminuição na síntese de proteínas e ácidos nucleicos além de degeneração cromossômica (Marcos Filho, 2005; Bewley et al., 2013).

O processo de deterioração das sementes pode ser atenuado quando essas são mantidas sob condições adequadas de armazenamento. A temperatura e a umidade relativa do ar são os principais fatores físicos que afetam diretamente a velocidade da deterioração, sendo a umidade relativa considerada mais importante, dada a sua relação direta com o teor de água das sementes, uma vez que aumento no teor de água da semente

eleva a sua atividade metabólica. Entretanto, a temperatura também contribui significativamente, afetando a velocidade dos processos bioquímicos (Delouche; Baskin, 1973). Altos teores de água nas sementes, combinados com altas temperaturas, aceleram os processos naturais de degeneração dos sistemas biológicos, de maneira que, sob essas condições, as sementes perdem vigor rapidamente e, algum tempo depois, a viabilidade (Almeida et al., 2000; Freitas et al., 2004).

A conservação de germoplasma é altamente relevante para a manutenção de recursos genéticos, pois é através da conservação a curto, médio e longo prazo que os materiais se tornam disponíveis aos usuários destes.

2.6 Criopreservação

A criopreservação é um processo de armazenamento de células vivas, tecidos e órgãos a temperaturas ultrabaixas (nitrogênio líquido, -196 °C), sendo considerado o melhor procedimento para a preservação do germoplasma a longo prazo sem alterações genéticas e fisiológicas (Ashmore & Engelmann 1997; Engelmann & Takagi, 2000). Mais de 100 espécies já foram criopreservadas com sucesso ao longo dos últimos 25 anos (Flachsland et al., 2006). Esse processo tem sido vantajoso por requerer pequeno espaço para a instalação do banco de germoplasma, baixo custo e proteção contra contaminação (Engelmann, 2011).

A técnica de criopreservação é eficaz para armazenar recursos genéticos a longo prazo. Porém o teor de água é um dos fatores mais críticos nesse processo, tendo que ser reduzido até o ponto que evite a formação de cristais de gelo, no intuito de preservar a integridade dos tecidos da semente (Lambardi et. al., 2004).

Na técnica de criopreservação, não só o teor de água deve ser levado em consideração, mas também o método de descongelamento. De acordo com Molina et al., 2006, descongelamento a temperatura ambiente se torna questionável, uma vez que existe a possibilidade do recongelamento durante esse período, necessitando, desta forma, de estudos em relação aos métodos mais rápidos como o descongelamento em banho-maria e a utilização do micro-ondas, pois quanto mais rápido ocorrer o descongelamento das sementes, melhor a preservação de suas características fisiológicas.

Uma alternativa interessante para a utilização da técnica de criopreservação é a utilização de agentes crioprotetores à base de dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etileno glicol, metanol e propileno glicol, entre outros (Salomão, 2002). Os agentes

crioprotetores penetrantes são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que o congelamento causa sobre a célula (Gonzalez, 2004).

Para que se possa atingir um longo período de criopreservação é necessário obter um protocolo adequado para congelamento e descongelamento. Uma dificuldade na elaboração desse protocolo é que as sementes apresentam comportamento distinto entre as espécies (Kholina, 2010). Tais diferenças de comportamento entre vegetais, ou mesmo entre partes de uma mesma espécie, tem dificultado o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação com caráter universal (Goldfarb et al., 2010). Um bom exemplo disso são os trabalhos realizados com a espécie *Hancornia speciosa* no qual Silva et al. (2010) não obtiveram sucesso na criopreservação de embriões, enquanto Sartor et al. (2012) realizaram a criopreservação de gemas com êxito. Existem sementes que, quando submetidas ao criocongelamento, o potencial germinativo decresce (Meletti et al., 2007). Nesses casos, a saída para redução dos efeitos do armazenamento em nitrogênio líquido é o tratamento prévio das sementes com agentes crioprotetores.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, F. de A.C.; Pita Villamil, J.M.P.; Gouveia, J.P.G. Efeito de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 2000.
- Arrigoni-Blank, M.F.; Alvarenga, A.A.; Blank, A.F.; Carvalho, D.C. Armazenamento e viabilidade de sementes de *Campomanesia rufa*. *Ciência e Agrotecnologia*, 1997.
- Ashmore S. E., Engelmann, F. Status Report on the Development and Application of In Vitro Techniques for the Conservation and Use of Plant Genetic Resources, International Plant Genetic Resources Institute, 1997.
- Bachiller, C.G. Semillas de arboles y arbustos florestales. Madri, ICONA (M.A.P.A.), 1997.
- Barbosa, A. S. Sistema biogeográfico do cerrado: alguns elementos para sua caracterização. Goiânia: UCG, 1996.
- Bewley, D.; Bradford, K. J.; Hilhorst, H. W. H.; Nonogaki, H. Mobilization of Stored Reserves. *Seeds*. Springer, 2013.
- Bewley, J. D. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, Rockville, 1997.
- Bewley, J.D.; Black, M. *Seeds: physiology of development and germination*, 1994.

- Borges, E.E.L.; Rena, A.B. Germinação de sementes. In: Aguiar, I.B.; Pina-Rodrigues, F.C.M.; Figliolia, m.b. (coord.). Sementes florestais tropicais. Brasília, DF: ABRATES, 1993.
- Braccini, A.L.; Braccini, M.C.L.; Scapim, C.A. Mecanismos de deterioração das sementes: aspectos bioquímicos e fisiológicos. Informativo ABRATES, 2001.
- Brasil, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009.
- Carneiro, J.G.A.; Aguiar, I.B. Armazenamento De Sementes. In: Aguiar, I.B.; Piñarodrigues, F.M.C.; Figliolia, M.B. Sementes Florestais Tropicais. Brasília: ABRATES, 1993.
- Carvalho, L.R.; Silva, E.A.A.; Davide, A.C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. Revista Brasileira de Sementes, 2006.
- Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4 ed. Jaboticabal: FUNEP, 590p., 2012.
- Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000.
- Carvalho, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA- CNPF. Brasília, DF: EMBRAPA/SPI, 1994.
- Cavalcanti, F. R.; Oliveira, J. T. A.; Martins-Miranda, A. S.; Viégas, R. A.; Silveira, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. New Phytologist, 2004.
- Corvello, W.B.V. Época de colheita e armazenamento de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). Revista Brasileira de Sementes, 1999.
- Costa, J.C. Armazenamento e conservação de sementes de espécies do cerrado. Embrapa Cerrados, Planaltina, 2009.
- Delouche, J.C.; Baskin, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. Seed Science and Technology, 1973.
- Egley, G. H. Reflections on my career in weed seed germination research. Seed Science Research, Cambridge, 1999.
- Eira, M.T.S.; Freitas, R.W.A.; Mello, C.M.C. Superação da dormência de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) morong. – Leguminosae. Revista Brasileira de Sementes, 1993.
- Engelmann, F&Takagi, H. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm, Japan International Research Center for Agricultural Sciences/ International Plant Genetic Resources Institute, 2000.

- Engelmann, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*, 2011.
- Ferriani, A. P.; Zuffellato-Ribas, K. C.; Wendling, I. Revisão Temática. *Revista Agro@mbiente On-line*, 2010.
- Figliolia, M. B.; Silva, A. Da.; Jardim, D. C. P.; Ywane, M. S. Viabilidade de sementes liofilizadas de essências florestais nativas. *Silvicultura em São Paulo*, 1988.
- Flachslan, E.; Terada, G.; Scocchi, A.; Rey, H.; Mroginski1, L.; Engelmann, F. Cryopreservation of Seeds and in Vitro-Cultured Protocorms of *Oncidium Bifolium* Sims. (Orchidaceae) by Encapsulation-Dehydration, Royal Veterinary College, 2006.
- Fowler, J.A.P.; Bianchetti, A. Dormência em sementes florestais. Colombo: Embrapa Florestas, 2000.
- Freitas, R. A.; Dias, D. C. F. S.; Dias, L. A. S.; Oliveira, M. G. A. Testes fisiológicos e bioquímicos na estimativa do potencial de armazenamento de sementes de algodão. *Revista Brasileira de Sementes*, 2004.
- Freitas, R.A.; Dias, D.C.F.S.; Cecon, P.R.; Reis, M.S. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodão durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 2000.
- Galindo, E.A.; Alves, E.U.; Silva, K.; Matos, L.; Santos, S. Germinação e vigor de sementes de *Crataeva tapia* L. em diferentes temperaturas e regimes de luz. *Revista Ciência Agronômica*, 2012.
- Goldfarb, M.; Duarte, M.E.M.; Cavalcanti Mata, M.E.R.M.; Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. *Biotemas*, 2010.
- Gonzalez, R.A.F. Efeito da criopreservação usando técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino. Pirassununga: RAF, 2004.
- Höfs, A.; Schuch, L. O B.; Peske, S. T.; Barros, A. C. S. A. Emergência e crescimento de plântulas de arroz em resposta à qualidade fisiológica de sementes. *Revista Brasileira de Sementes*, 2004.
- ISTA - International Seed Testing Association. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, Zürich, 1993.
- Kholina, A.B.; Voronkova, N.M. Conserving the gene pool of far Eastern plants by means of seed cryopreservation. *Biology Bulletin*, 2010.
- Lambardi, M.; De Carlo, A.; Biricolli, S.; Puglia, A.M.; Lombardo, G.; Siragusa, M.; de Pasquale, F. Zygotic and nucellar embryo survival following dehydration/cryopreservation of Citrus intact seeds. *CryoLetters*, 2004.

- Lorenzi, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. Nova Odessa: *Plantarum*, 2002.
- Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1992.
- Macedo, E.C.; Groth, D.; Soave, J. Influência da embalagem e do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de algodão. *Revista Brasileira de Sementes*, 1998.
- Machado, C. F.; Cícero, S. M. Metodologia para a condução do teste de germinação e utilização de raios-x para a avaliação da qualidade de sementes de aroeirabranca (*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.) Informativo ABRATES, Brasília, 2002.
- Marcos Filho, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq, 2005.
- Mcdonald, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, Zúriche, 1999.
- Medeiros, A. C. S. Armazenamento de Sementes de Espécies Florestais nativas. Embrapa Floresta, Colombo, 2001.
- Meletti, L.M.M.; Barbosa, W.; Veiga, R.F.A. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. *Scientia Agrária Paranaensis*, 2007.
- Molina, T.F.; Tillmann, M.A.A.; Dode, L.B.; Viegas, J. Crioconservação em sementes de cebola. *Revista Brasileira de Sementes*, 2006.
- Oliveira, L. M.; Bruno, R.L.A.; Silva, K.R.G.; Silva, V.D.M.; Ferarri, C.S.; Silva, G.Z. Germinação e vigor de sementes de *Sapindus saponaria* L. submetidas a tratamentos pré-germinativos, temperaturas e substratos. *Ciência Rural*, Santa Maria, 2012.
- Pádua, G.P.; Vieira, R.D. Deterioração de sementes de algodão durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 2001.
- Paula, N.F.; Borges, E.E.L.; Borges, R.C.G; Paula, R.C. Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento. *Revista Brasileira de sementes*, 1997.
- Pelegri, D. D.; Tsuzuki, J. K.; Amado, C. A. B.; Cortez, D. A. G.; Ferreira, I. C. P. Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.27, p.922-927, 2008.
- Piña-Rodrigues, F. C. M.; Figliolia, M. B; Peixoto, M. C. Tecnologia de sementes: Testes de qualidade. In: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. Germinação - do básico ao aplicado. Artmed, 2004.
- Resende, M. L.; Salgado, S. M. L.; Chaves, Z, M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Revista Brasileira de Fitopatologia*, 2003.
- Salomão, A.N. Respostas de sementes de espécies tropicais a exposição ao nitrogênio líquido. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Piracicaba, 2002.

- Santos, A.R.F.; Silva-Mann, R.; Ferreira, R.A. Restrição hídrica em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) Revista Árvore, 2012.
- Silva, E.O. Propagação e armazenamento de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2010. 105f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2010.
- Soares, A.M.S.; Machado, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. Revista Tropical, 2007.
- Stanwood, P.C. Cryopreservation of seed germplasm – a preliminary guide to the practical preservation of seed germplasm in liquid nitrogen (LN2 – 196oC). In: IBPGR Advisory Committee on Seed Storage. Report of the Second Meeting, 1984.
- Tedesco, S.B.; Stefanello, M.O.; Schifinowittmann, M.T.; Battistin, A.; Dall’agnol, M. Superação da dormência em sementes de espécies de *Adesmia* D.c. (Leguminosae). Revista Brasileira de Agrociência, 2001.
- Tsuzuki, K. J., Svidzinski, T. I. E., Shinobu, C. S., Silva, L. F. A., Cortez, D > A. G., Ferreira, I. C. P. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2007.
- Van Slageren, M. W. The millennium seed bank: building partnerships in arid regions for the conservation of wild species. *Journal of Arid Environments*, 2003.
- Vieira, C.V.; Alvarenga, A.A.; Castro, E.M.; Nery, F.C.; Santos, M.O. Germinação e armazenamento de sementes de camboatã (*Cupania vernalis* Cambess.) –Sapindaceae. *Ciência Agrotecnológica*, 2008.
- Zaidan, L.B.P.; Barbedo, C.J. Quebra de dormência em sementes. In: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. (Org.). Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, 2004.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar alterações anatômicas, histoquímicas e em enzimas antioxidantes de sementes de *Sapindus saponaria* L. durante a superação de dormência e armazenamento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Testar métodos para superação da dormência de sementes de *Sapindus saponaria* L.

Estudar as alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Sapindus saponaria* L. durante o armazenamento convencional e criogênico.

Fomentar a criação de bancos de sementes de espécies de *Sapindus saponaria* L.

CAPÍTULO I

SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Sapindus Saponaria L.*

Resumo: Objetivou-se neste estudo avaliar diferentes tratamentos pré-germinativos, características histoquímicas e o desempenho fisiológico de sementes de *Sapindus saponaria L.* em função da temperatura e de substrato para a germinação. As sementes de *Sapindus saponaria* foram coletas no município de Rio Verde-GO e analisadas através da execução de 2 ensaios (superação de dormência e teste de germinação). O ensaio 1 foi composto por 10 tratamentos de superação de dormência, enquanto o 2 foram avaliados 2 substratos (papel e areia) e 4 temperaturas 20, 25, 30 e alternadas de 20–30 °C ($\pm 0,5$ °C) por 35 dias. Os resultados do teste de superação de dormência e germinação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. A escarificação de sementes de *Sapindus saponaria L.* com ácido sulfúrico concentrado por 90 min, proporcionou maior velocidade e percentual de emergência, não acarretando danos anatômicos nas mesmas. Tratamentos pré-germinativos, com uso de estresse por alta ou baixa temperatura, podem provocar danos celulares na região do endosperma de sementes de *Sapindus saponaria L.* A condução do teste de germinação de sementes de *Sapindus saponaria L.* em substrato papel e a 30 °C proporcionou maior porcentagem de germinação.

Palavras-chave: sabãozinho de macaco, tratamentos pré-germinativos, viabilidade

Introdução

O avanço das fronteiras agrícolas e o extrativismo descontrolado da região do Cerrado têm contribuído para a redução gradativa das áreas de ocorrência de diversas espécies vegetais com potencial de uso (Moraes et al., 2017). Dentre essas, destaca-se, no

Estado de Goiás, *Sapindus saponaria* L., pertencente à família Sapindaceae. Essa espécie é conhecida vulgarmente como sabão de macaco, saboeiro, sabão de minas, sabonete e saboneteira, e sua ocorrência se dá em florestas pluviais e semidecíduas (Região Amazônica até Goiás e Mato Grosso) (Lorenzi, 2002).

A demanda por sementes e mudas de *S. saponaria* tem aumentado ao longo dos anos, particularmente para o seu plantio como árvore ornamental, pelo baixo porte (até 8m), copa densa e globosa e, também, como planta medicinal. Esse último caso se dá pelo fato de que as raízes, frutos e tegumento de *S. Saponaria* apresentam substâncias adstringentes, antiespasmódicas, calmantes, antitussígenas (Lorenzi, 2002), larvicida e fungicida (Tsuzuki et al., 2007).

Dentre os fatores limitantes para a produção de mudas, a temperatura é um dos fatores críticos, pois a grande maioria das sementes não germina abaixo ou acima de certa temperatura (Ferreira & Moraes, 2015). Assim, o conhecimento da temperatura ótima para a germinação das sementes de *S. saponaria* será determinante para a obtenção de uma máxima germinação e em menor espaço de tempo. Além da temperatura, o substrato exerce influência marcante no processo germinativo, pois o mesmo deve apresentar proporção adequada entre a disponibilidade de água e aeração (Perez et al., 1999), e deve ser também investigado para otimizar a produção de mudas de *S. saponaria*, dada a ausência dessa informação na literatura.

A produção de mudas de *S. saponaria* é limitada também pela ocorrência de dormência tegumentar, que dificulta o processo de germinação das sementes, ocorrendo naturalmente de forma lenta e em baixa porcentagem. Dessa forma, para favorecer a germinação das sementes dessa espécie, faz-se necessário a utilização de tratamentos pré-germinativos, em conjunto com o conhecimento do melhor substrato e temperatura.

Diante do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar diferentes tratamentos pré-germinativos, características histoquímicas e o desempenho fisiológico de sementes de *S. saponaria* em função da temperatura e substrato para a germinação.

Material e métodos

Os frutos de *Sapindus saponaria* L. foram coletados na zona rural, do município de Rio Verde, Goiás, Brasil, levados ao Laboratório de Sementes do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde e despolpados manualmente para a obtenção das sementes. Posteriormente, procedeu-se a limpeza e homogeneização do lote no homogeneizador do tipo boerner. Após a homogeneização, as sementes foram

armazenadas em temperatura ambiente de laboratório 25 °C (± 2 °C) em sacos de papel kraft multifoliado, durante 6 meses.

Após o armazenamento, realizou-se a instalação de dois ensaios experimentais, que são descritos a seguir:

Ensaio 1 – Superação de dormência:

O experimento foi composto por 10 tratamentos, com 100 sementes, submetidas aos seguintes procedimentos: semente *in natura* (sem tratamento pré-germinativo), imersão em ácido sulfúrico concentrado por 60, 75 e 90 min, escarificação manual com lixa d'água nº 80 na região oposta ao hilo, escarificação manual com lixa d'água nº 80 na região oposta ao hilo e imersão em água durante 24 h, imersão em água à temperatura de 70°C por 30 min, escarificação manual com lixa d'água nº 80 e imersão em ácido giberélico (1000 ppm) durante 24 h a 25°C, armazenamento a 41°C durante 72 h e embebição a 10°C por 72 h.

Depois de submetidas aos tratamentos pré-germinativos, 4 repetições de 25 sementes foram semeadas em leito de areia em casa de vegetação, com profundidade aproximada de 2 cm, em casa de vegetação com uso de 3 irrigações diárias. Para avaliação do efeito dos tratamentos determinou-se as seguintes variáveis: Emergência: contagens diárias de plântulas emergidas foram realizadas do 14º ao 45º dia após a semeadura, utilizando como critério o número de plântulas com o surgimento dos eófilos. Ao final das contagens, registrou-se o número total de plântulas emergidas, calculando-se o percentual de plântulas emergidas de acordo com Brasil (2009); Índice de velocidade de emergência (IVE): realizado concomitantemente com o teste de emergência pelo registro do número de plântulas emergidas do 14º ao 45º dia, calculado segundo proposto por Maguire (1962); Velocidade de emergência (VE): realizado juntamente com o teste de emergência pelo registro do número de plântulas emergidas do 14º ao 45º dia, calculado segundo proposto por Edmond & Drapal (1958); Comprimento de plântulas: no final do teste de emergência, dez (10) plântulas normais de cada repetição foram medidas com o auxílio de régua graduada em centímetros, sendo os resultados expressos em centímetros por plântula; Massa seca das plântulas: após a contagem final no teste de emergência, as plântulas foram secas em estufa regulada a 80 °C por 24 h e, decorrido esse período, pesadas em balança analítica com precisão de 0,001 g, conforme recomendações de Nakagawa (1999).

Os resultados do teste de superação de dormência foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

A análise anatômica e histoquímica, foi realizada imediatamente após os testes de superação de dormência, as sementes de *S. saponaria* foram removidas do pericarpo protetor externo e partidas ao meio, em seguida as amostras foram fixadas em Karnovsky (1965), por 24 horas. Após esse período, as amostras foram pré lavadas em tampão fosfato e desidratadas em série etílica crescente, pré-infiltradas e infiltradas em historesina (Leica, Alemanha), conforme recomendações do fabricante.

Na avaliação estrutural, as amostras foram seccionadas transversalmente a 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen scientific, China) e os cortes corados com azul de toluidina – coloração policromática (0,05% tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) (O'Brien, Feder & McCully, 1964). Para as análises histoquímicas, os cortes foram corados com xilidina de ponceau (XP) para proteínas totais (O'Brien & McCully, 1981), ácido periódico/Reagente de Schiff (PAS) para polissacarídeos neutros (McManus, 1948) e Sudan III para Lipídios totais (Pearse, 1972).

As observações foram realizadas e as imagens fotografadas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão), acoplado com câmera DP-72, utilizando a opção de campo claro.

Ensaio 2 – Teste de Germinação

Previamente ao teste de germinação, as sementes foram imersas em ácido sulfúrico concentrado por 90 minutos para superação da dormência. O ensaio foi instalado com 8 tratamentos, arranjados em esquema fatorial 4 x 2 (4 temperaturas x 2 substratos) e com 5 repetições de 20 sementes.

Para a avaliação do teste de germinação em substrato de papel, procedeu-se contagens diárias do número de sementes germinadas, considerando como sementes germinadas a protrusão da radícula (1 cm). Para o teste em substrato de areia, foram consideradas sementes germinadas, o surgimento dos eófilos. As contagens do número de sementes germinadas iniciaram aos 12 e se estenderam até os 35 dias após a semeadura. Ao final do teste, procedeu-se a avaliação do número de sementes germinadas, sementes intumescidas e sementes duras. Os resultados foram calculados de acordo com Brasil (2009) e expressos em porcentagem.

No teste de germinação em areia, procedeu-se a lavagem do substrato em ácido clorídrico concentrado durante 7 dias, seguido de esterilização em estufa a 100 °C. Para o umedecimento do substrato, primeiramente determinou-se a capacidade de campo da areia, segundo recomendado por Brasil (2009), e umedeceu-se o substrato com água destilada até atingir 60 % da capacidade máxima de retenção. Posteriormente, depositou-se 1 kg de areia em frasco plástico de volume 1,5 L e efetuou-se a semeadura, distribuindo as sementes de forma circular, a 2 cm de profundidade, e acondicionou-se em saco plástico transparente para manutenção da umidade.

No teste de germinação entre papel, a semeadura foi realizada distribuindo as sementes de maneira linear e alterna sobre 2 folhas de papel germitest umedecidas com água destilada equivalente a 2,5 vezes o seu peso seco, e, após, cobertas com mais uma folha, umedecida da mesma forma, e então, confeccionados os rolos e acondicionados em saco plástico transparente. Para ambos os substratos, manteve-se as sementes durante 35 dias em germinador do tipo Mangesdorf nas temperaturas constantes de 20, 25, 30 e alternadas de 20–30 °C ($\pm 0,5$ °C) por 35 dias.

Para o índice de velocidade de emergência utilizou-se os dados registrados nas contagens diárias do teste de germinação e os cálculos foram realizados segundo a fórmula proposta por Maguire (1962). Para a velocidade de emergência e germinação utilizou-se os dados registrados nas contagens diárias do teste de germinação e calculou-se segundo as prescrições de Edmond & Drapal (1958).

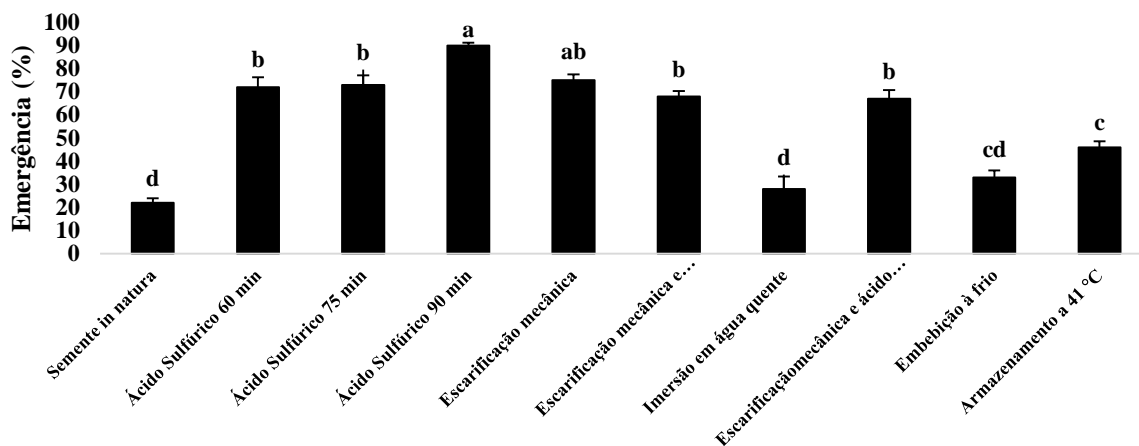
Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

Resultados e discussão

Ensaio 1 - Superação de dormência

A escarificação química em ácido sulfúrico concentrado por 90 minutos proporcionou maior emergência de plântulas de *S. saponaria* (Figura 1), bem como, maior índice de velocidade de emergência em relação aos demais tratamentos testados neste estudo (Figura 4). Esses resultados, em conjunto, demonstram a eficiência da escarificação química por 90 minutos com ácido sulfúrico concentrado para a superação da dormência imposta pelo tegumento. Esse tratamento contribuiu para maximizar a absorção de água e aumentar a velocidade do processo de emergência. Corroborando essas informações, Oliveira et al. (2012) reportaram que a escarificação com ácido

sulfúrico, por 60 minutos, propicia aumento na emergência de sementes de *S. saponaria*. Resultados semelhantes foram encontrados por Albuquerque et al. (2007) em sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth (sucupira-preta).

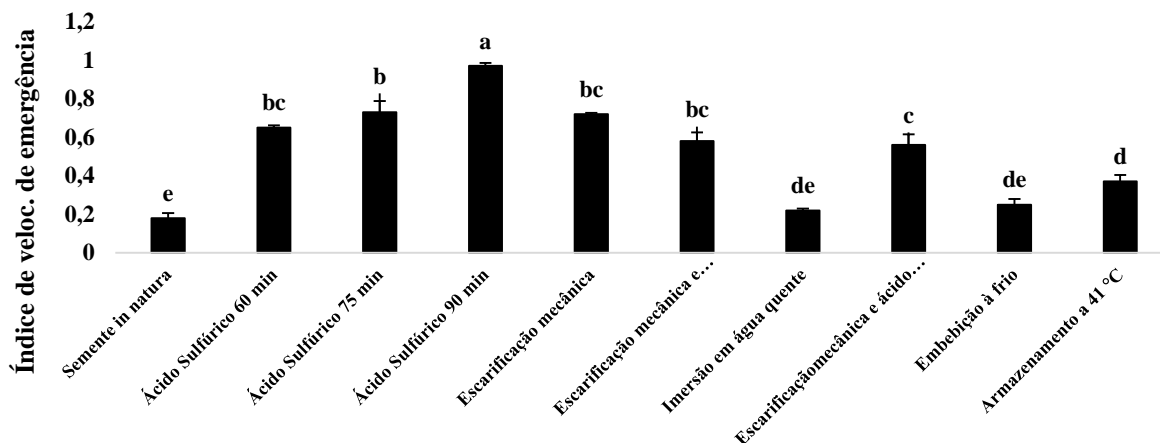


Métodos de superação de dormência

Figura 1. Emergência (%) de sementes de *Sapindus saponaria* L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos (Médias seguidas de mesma letra minúscula na barra não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).

Dentre as demais estratégias de tratamentos pré-germinativos investigadas neste estudo, percebe-se que a escarificação com ácido sulfúrico concentrado por 75 e 60 minutos e o uso da escarificação mecânica promoveram valores de emergência e IVE similares (Figura 2). De forma equivalente, o uso de escarificação mecânica, aliada à imersão em ácido giberélico 1000 ppm por 24 horas, não proporciona acréscimo de emergência e de velocidade de emergência em relação ao tratamento de escarificação mecânica seguida de embebição em água por 24 horas.

Isto pode ser um indicativo de que sementes de *S. saponaria* não têm dormência fisiológica. Araújo et al. (2000), em estudos com sementes de *Stylosanthes viscosa* (melosa ou meladinha), reportaram que a escarificação em ácido sulfúrico é eficiente para garantir grande porcentagem de emergência e IVE, pois esse tratamento foi determinante para driblar a impermeabilidade à água, imposta pela dormência tegumentar nas sementes dessa espécie. Já em avaliações com sementes de *Ricinnus communis* (mamona), Sousa et al. (2009), verificaram que a escarificação com ácido sulfúrico reduziu a emergência e IVE de *R. communis*.



Métodos de superação de dormência

Figura 2. Índice de velocidade de emergência de sementes de *Sapindus saponaria* L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos (Médias seguidas de mesma letra minúscula na barra não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).

O uso de ácido sulfúrico por 90 min incrementou em 0,82 g e 2,36 g, respectivamente, a massa seca de raiz (MSR) e massa seca da parte aérea (MSA) nas plântulas de *S. saponaria* em relação as sementes *in natura* (Figura 3). Semelhantemente, Silva et al. (2011), utilizando sementes de *Tamarindus indica* L. (tamarinu), obtiveram maior valor de matéria seca quando as sementes foram embebidas em ácido sulfúrico por 15 minutos.

A MSA das plantas provenientes das sementes em embebição a 10 °C e de imersão em água quente foram similares as sem superação de dormência. Esse resultado indica que esses tratamentos não promovem benefício ao desenvolvimento pós-seminal de *S. saponaria*.

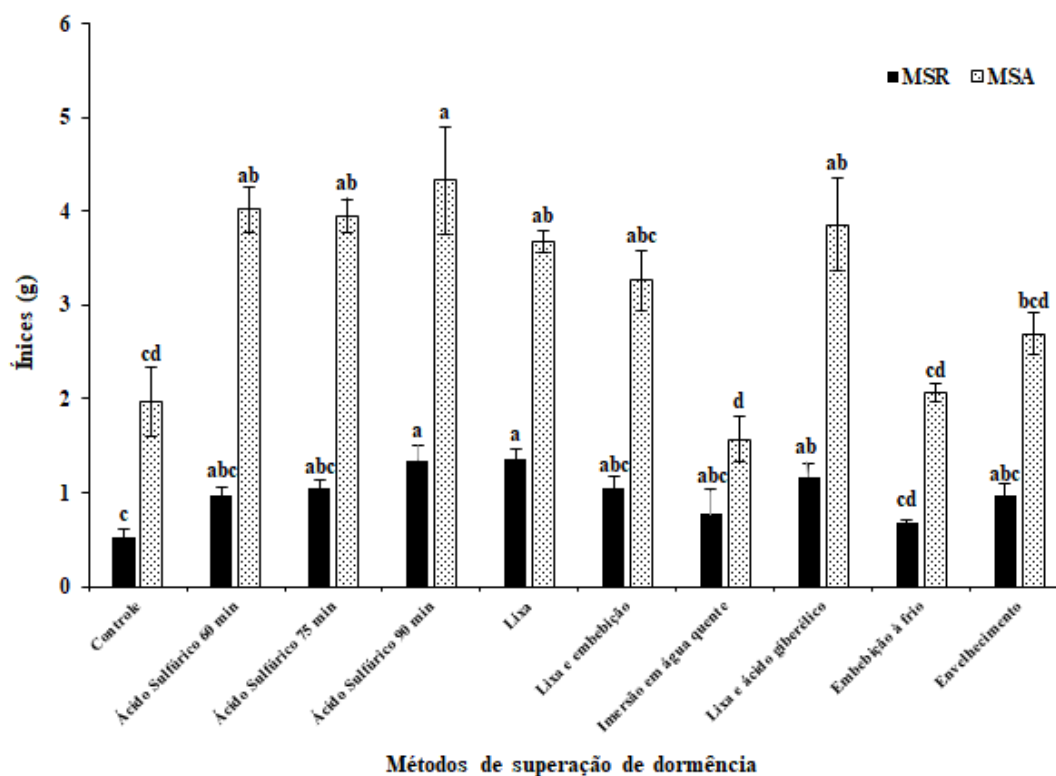
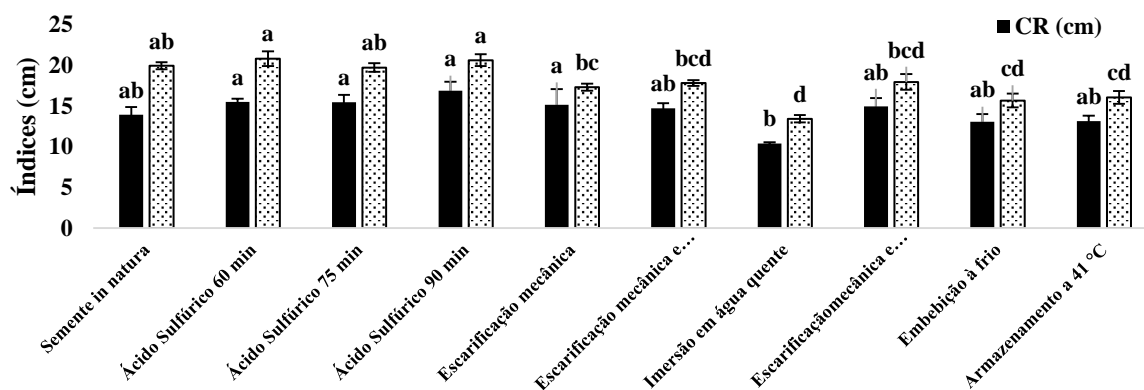


Figura 3. Massa seca de raiz (MSR) e massa de matéria seca de parte aérea (MSA) de plântulas de *Sapindus saponaria* L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos (Médias seguidas de mesma letra minúscula na barra não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).

A escarificação química e a escarificação mecânica propiciaram maiores comprimento de raiz (CR), assim como para os demais atributos de qualidade fisiológica (Figura 4). Em contraste, a imersão em água a 70 °C por 30 minutos resultou em menores índices de CR em relação aos demais tratamentos. Alexandre et al. (2009) constataram maior crescimento, tanto radicular como aéreo, em sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (pau sabão) imersas em ácido sulfúrico por 10 minuto sem relação a escarificação mecânica e trincagem das sementes.

O comprimento da parte aérea expressou os melhores resultados nas sementes escarificadas com ácido sulfúrico por 90 e 60 min (Figura 4). O uso de ácido sulfúrico por 75 minutos e o controle apresentaram comprimento da parte aérea semelhantes, sendo também observado entre os tratamentos de escarificação mecânica e embebição com água e com ácido giberélico 1000 ppm. Em adição, a imersão em água a 70 °C por 75 minutos apresentou o pior resultado, explicitando que esse tratamento não é eficiente para promover a superação da dormência das sementes de sabãozinho. Resultado semelhante foi constatado em sementes de *Hymenaea courbaril* L. (jatobá) (Sampaio et al., 2015).



Métodos de superação de dormência

Figura 4. Comprimento de raiz (CR), comprimento caulinar (CC), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSA) de plântulas de *Sapindus saponaria* L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos (Médias seguidas de mesma letra minúscula na barra não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).

O método de superação de dormência de sementes de sabãozinho que demonstrou os melhores resultados foi a escarificação em ácido sulfúrico por 90 minutos. Resultado similar ocorreu também para sementes de *Hymenaea courbaril* L. (jatobá) em que se observou que a escarificação em ácido sulfúrico por 24 minutos é o mais eficiente para a superação de sementes de jatobá (Souza e Segato, 2016).

As avaliações anatômicas e histoquímicas demonstram que as células do endosperma de *S. saponaria* são bem definidas, apresentando formato circular com parede celular espessa (Figura 1 A, B, C, D, E e G). Os tratamentos com escarificação manual com lixa d'água nº 80, imersão em ácido giberélico (1000 ppm) durante 24 h a 25 °C, armazenamento a 41°C durante 72 h e embebição a 10 °C por 72 h promoveram colapso nas células do endosperma e aumento no número de espaços intracelulares (Figura 5 F, H, I e J). O colapso celular é proveniente de danos físicos na semente, os quais acarretam desestruturação nas células do endosperma, alterando o processo de embebição e promovendo a perda de lixiviados (Silva et al., 2008).

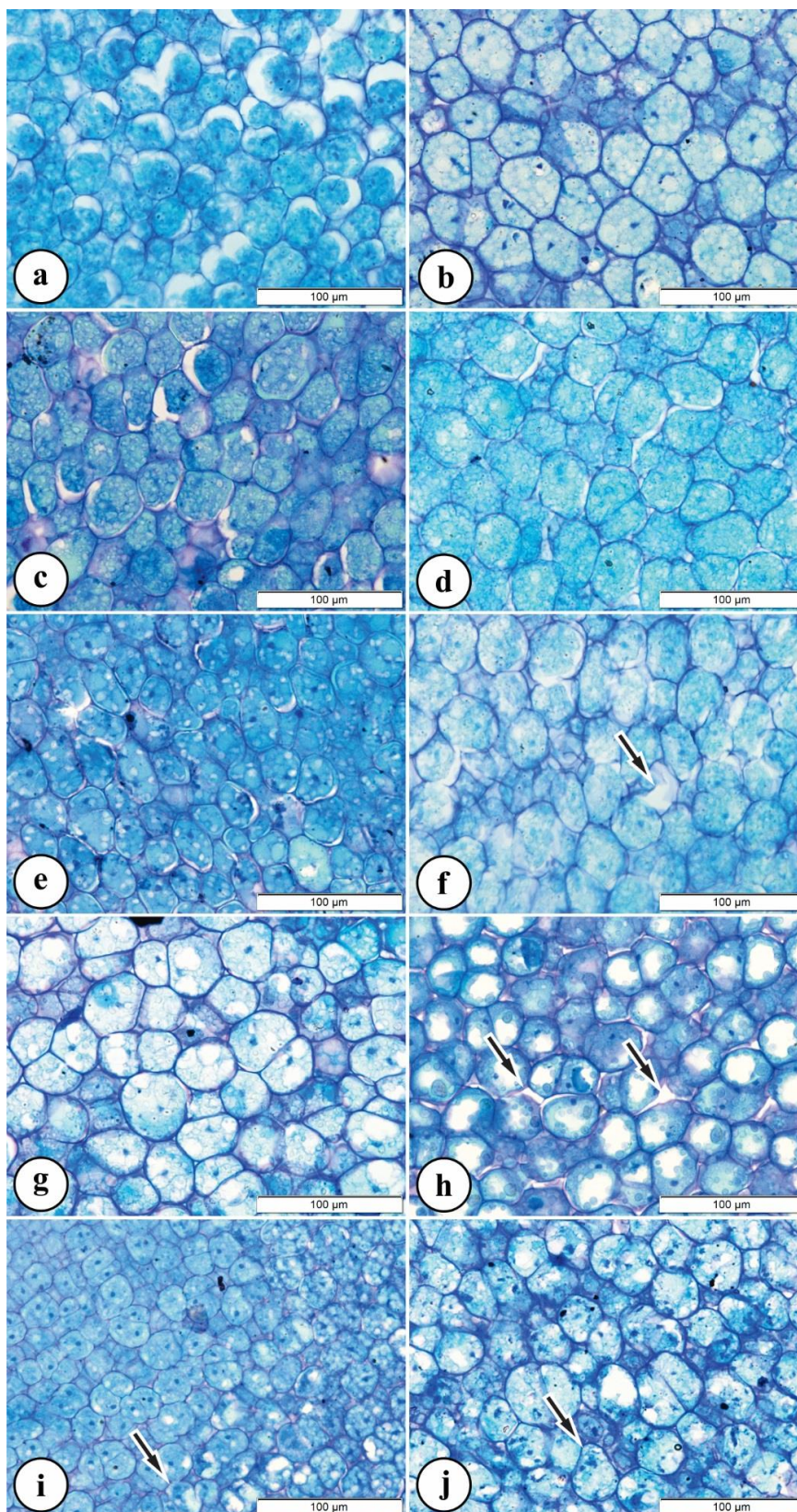


Figura 5. Anatomia de semente de *Sapindus saponaria* L. após testes de superação de dormência. (A) sem superação de dormência, (B) imersão em ácido sulfúrico concentrado por 60, (C) 75 e (D) 90 min, escarificação manual com lixa d'água nº 80 na região oposta ao hilo (E), escarificação manual com lixa d'água nº 80 na região oposta ao hilo e imersão em água durante 24 h (F),

imersão em água à temperatura de 70 °C por 30 min (G), esscarificação manual com lixa d'água nº 80 e imersão em ácido giberélico (1000 ppm) durante 24 h a 25 °C (H), armazenamento a 41°C durante 72 h (I), embebição a 10°C por 72 h (J). Setas indicam espaços intracelulares e colapso celular.

Houve a formação de corpúsculos globulares, caracterizados como gotas de lipídios no interior das células em toda extensão desse tecido (Tabela 1). A presença de lipídeos nas células pode estar relacionada ao odor característico do fruto de *S. saponaria* na maturidade (Albiero, 2001). Os lipídeos, de modo geral, são consumidos durante a germinação e possuem papéis importantes no processo de germinação das sementes (Han et al., 2017). Neste estudo, a alta intensidade de lipídios nas células do endosperma das sementes de *S. saponaria* indica que esse composto não está sendo mobilizado e consumido no processo de germinação.

A concentração de carboidratos totais nas sementes *S. saponaria* identificadas pelo teste de PAS foram de baixa e média intensidade (Tabela 1). Esse resultado evidencia que os carboidratos presentes no endosperma são consumidos no processo germinativo da semente e na construção de tecidos vegetais que irão constituir a plântula (Carvalho e Nakagawa, 2000).

Em sementes *S. saponaria*, as proteínas são os compostos mais abundantes nos tecidos de reserva (Tabela 1). Isso pôde ser evidenciado pela sua maior intensidade em toda a extensão das células do endosperma (Tabela 1). Para os testes com XP, os tratamentos sem superação de dormência e com ácido sulfúrico por 60, 70 e 90 min apresentaram maior intensidade de proteínas em relação aos demais tratamentos (Tabela 1). As proteínas são degradadas e utilizadas durante a germinação, logo o maior acúmulo dessas substâncias nos tecidos de *S. saponaria* pode estar diretamente ligado ao potencial de germinação de suas sementes (Pritchard et al., 2002).

Tabela 1. Histoquímica do endosperma de sementes de *Sapindus saponaria* L. após testes de superação de dormência.

Tratamentos	Teste Grupo de Metabólitos		
	Sudan IV Albúmen	PASAlbúmen	Xilidine Ponceau Albúmen
1 S/superação	+	++	+++
2 Ácido sulfúrico 60 min	++	+	+++
3 Ácido sulfúrico 75 min	+	+	+++
4 Ácido sulfúrico 90 min	+	+	+++
5 Lixa	++	++	+
6 Lixa e embebição	++	++	+++
7 Imersão em água quente	+	+	+
8 Lixa e ácido giberélico	+++	+	+
9 Embebição à frio	+++	++	+
10 Envelhecimento	+	+	+

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

Teste de Germinação

A porcentagem de germinação no substrato areia e papel, em associação às temperaturas de 25, 20-30 e 30 °C, apresentaram maiores resultados em relação aos demais tratamentos (Figura 6 - A), ao passo que a temperatura de 20 °C, independentemente do substrato, resultou em menores porcentagens de germinação de sementes *S. saponaria* (Figura 6 – A). Sementes de *Eugenia involucrata* (cerejeira-do-mato cerejeira-do-mato) e *Eugenia pyriformis* (uvaia) apresentam resposta similar, e Gomes et al. (2016) relataram que os testes de germinação dessas espécies devem ser conduzidos na temperatura de 25 °C e em substrato rolo de papel, condição que propicia alta germinação das sementes.

Oliveira et al. (2012) obtiveram melhor condição para a germinação de sementes de *Sapindus saponaria* a temperatura de 30 °C e substrato areia, proporcionando melhor condição corroborando com o encontrado neste estudo.

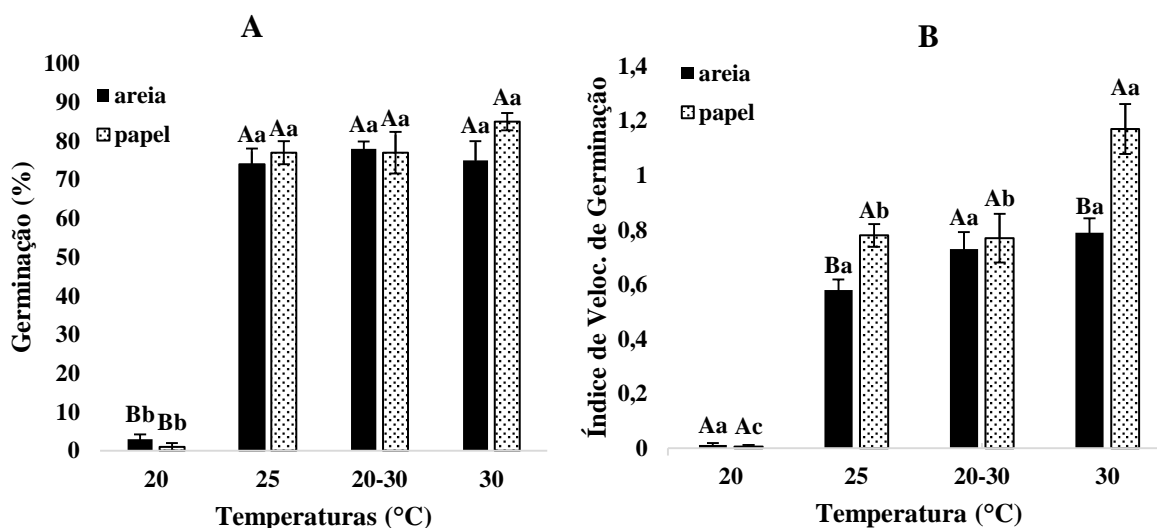


Figura 6. (A): Germinação (%G) e (B): Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes *Sapindus saponaria* L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos (Médias seguidas de mesma letra maiúscula para temperatura e minúscula para substrato não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).

Na areia, o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *S. saponaria* foi superior nas temperaturas de 30 e 20-30 °C em relação a demais temperaturas (Figura 6 - B). Em contrapartida, no substrato papel, o IVG foi superior na temperatura de 30 °C. Porém, o uso do papel como substrato interfere no desempenho germinativo das sementes dessa espécie.

As temperaturas de 25, 25-30 e 30 °C são as que proporcionaram maior IVG e IVE, sendo também verificado por Oliveira et al. (2005) em sementes de *Annona montana* (araticum). O mesmo não pode ser observado para a velocidade de germinação neste estudo, pois não houve diferenças entre as temperaturas e substratos.

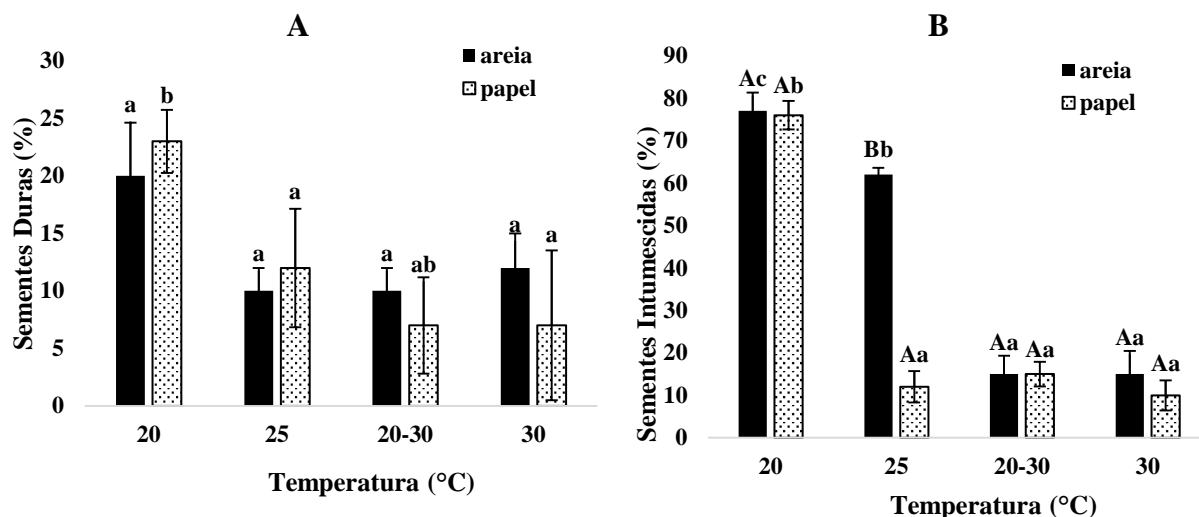


Figura 7. (A): Sementes Duras (%) e (B): Sementes Intumescidas (%) de sementes *Sapindus saponaria* L. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos (Médias seguidas de mesma letra maiúscula para temperatura e minúscula para substrato não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).

Houve menor percentual de sementes duras de *S. saponaria* nas temperaturas de 30 e 25 °C (Figura 7 - A) e no papel foi maior a 20 °C, o que não se constata na areia. Assim, as temperaturas que favorecem boa germinação apresentaram menores percentuais de sementes duras. Em contraste, a temperatura não interferiu na percentagem de sementes duras de *Chloroleucon foliolosum* (Benth.) G. P. Lewis (tatarena) (Silva et al., 2014).

O percentual de 13 % de sementes duras no teste de germinação de sementes de *S. saponaria* pode ser um indicativo de que, em nível populacional, as sementes dessa espécie necessitam de um período superior a 35 dias para completar a germinação. Em testes de germinação em diferentes temperaturas com sementes de *Bowdichia virgilioi*, (sucupira-do-cerrado), conduzido por 22 dias, constatou-se que para essa espécie o tempo foi mais decisivo do que a temperatura (Smiderle, 2011). Isso pode ser explicado através do processo de embebição, que é a primeira etapa do processo germinativo, sendo que quanto mais cedo se inicia, a tendência é de que as etapas seguintes da germinação sejam antecipadas (Marcos Filho, 2009).

A quantidade de sementes entumescidas de sabãozinho na temperatura de 20 °C foi superior ao das demais temperaturas (Figura 7 – B). Isso demonstra que mesmo as sementes estando embebidas, não há ativação de seu metabolismo, inibindo assim a germinação. Em estudos com sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (ipê

amarelo), Machado et al. (2002) constataram que temperaturas abaixo de 25 °C são prejudiciais para o processo de germinação das sementes dessa espécie.

Conclusão

A escarificação de sementes de *S. saponaria* com ácido sulfúrico concentrado por 90 min proporcionou maior IVE e percentual de emergência, não acarretando danos anatômicos internos. Tratamentos pré-germinativos, com uso de estresse por alta ou baixa temperatura, podem provocar danos celulares nas sementes de *S. saponaria*.

A condução do teste de germinação de sementes de *Sapindus saponaria* L. em substrato papel e a 30 °C apresentou maior porcentagem de germinação.

Referências

- Albiero, A. L. M., Bacchi, E. M., & Mourão, K. S. M. (2001). Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). *Acta Scientiarum Biological Science*, 23, 549-560.
- Albuquerque, K. S., Guimarães, R. M., Almeida, I. F., & Clemente, A. C. S. (2007). Métodos para a Superação da Dormência em Sementes de Sucupira-Preta (*Bowdichia virgilioides* KUNTH.). *CiênciaSAgrotécnica*, Lavras, 31(6), 1716-1721.
- Alexandre, R. S. Gonçalves, F. G., Rocha, A. P., Arruda, M. P., & Lemes, E. Q. (2009). Tratamentos físicos e químicos na superação de dormência em sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. *Revista Brasileira de Ciências. Agrárias*, Recife, 4(2), 156-159.
- Araújo, E. F., Araújo, R. F., Silva, R. F., & Gomes, J. M. (2000). Ação de diferentes métodos de escarificação das sementes e dos frutos de *Stylosanthes viscosa*. *Revista Brasileira de Sementes*, Pelotas, 22(1), 18-22.
- Brasil. (2009). Ministerio da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análises de sementes. Brasília: CLAV/DNDV/SNDA/MA, 365p.
- Carvalho, N. M., & Nakagawa, J. (2000). Sementes: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: Funep, 588p.
- Edmond, J. B., & Drapala, W. I. (1958). The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seeds. *Proceedings of American society Horticultural Science*, 71, 428-434.
- Ferreira, D. F. (2011). SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium* (Lavras), 6, 36-41.

- Ferreira, P. N. & Morais, G. A. (2015). Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Genipa americana* L. *Anais do ENIC* 1.4.
- Gomes, J. P., Oliveira, L. M., Ferreira, P. I., & Batista, F. (2016). Substratos e temperaturas para teste de germinação em sementes de myrtaceae. *Ciência Florestal*, 26(4) 285-293.
- Han, C., Zhen, S., Zhu, G., Bian, Y., & Yan, Y. (2017). Comparative metabolome analysis of wheat embryo and endosperm reveals the dynamic changes of metabolites during seed germination. *Plant Physiology and Biochemistry*. 115, 320-327.
- Lorenzi, H. (2002). Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. Nova Odessa: *Plantarum*, 368p.
- Machado, C. F., Oliveira, J. A., Vide, A. C., & Guimarães, R. M. (2002). Methodology for performing germination test of *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson seeds. *CERNE*, 8(2), 017-025.
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2(2) 176-177.
- Marcos Filho, J. (2009). Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ, 495p.
- McManus, J. F. A. (1948). Histologia and histochemical uses of periódico acid. *Stain Technol.* 23(1), 99-108.
- Moraes, M. C. P., Mello, K., & Toppa, R. H. (2017). Protected areas and agricultural expansion: Biodiversity conservation versus economic growth in the Southeast of Brazil. *Journal of Environmental Management*, 188, 73-84.
- Nakagawa, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: Krzyzanowski, F. C., Vieira, R. D., & França Neto, J. B. (Ed.). (1999). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES. 21p.
- O'Brien, T. P., & Mccully, M. E. (1981). The study of plant structure principles and selected methods. Termarcaphi Pty. Ltda, Melbourne.
- O'Brien, T. P., Feder, N., & Mccully, M. E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*. 59.368-373.
- Oliveira, I. V. M., Andrade, R. A., & Martins, A. B. G. (2005). Influência da temperatura na germinação de sementes de *Annona montana*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 27(2) 344-345.

- Oliveira, L. M., Bruno, R. L. A., Silva, K. R. G., Silva, V. D. M., Ferarri, C. S., & Silva, G. Z. (2012). Germinação e vigor de sementes de *Sapindus saponaria* L. submetidas a tratamentos prégerminativos, temperaturas e substratos. *Ciência Rural*, 42(4), 638-644.
- Pearse, A. G. E. (1972). 'Histochemistry: theoretical and applied. Vol.2' 3ª ed. (The Williams & Wilkins Company Baltimore).
- Perez, S. C. J. G. A., Fanti, S. C., & Casali, C. A. (1999). Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. *Bragantia*, Campinas, 58 (1), 57-68.
- Pritchard, S. L., Charlton, W. L., Baker, A., Graham, L. A. (2002). Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 31, 639-647.
- Sampaio, M. F., Couto, S. R., Silva, C. A., Silva, A. C. A., Silva, A. A. S., & Teixeira, A. L. (2015). Influência de diferentes substratos associados a métodos de superação de dormência na germinação e emergência de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). *Revista Farociência*, 2, (1).
- Silva, A. C., Santos, J. L., D'arêde, L. O., Morais, O. M., Costa, E. M., & Silva, E. A. A. (2014). Caracterização biométrica e superação de dormência em sementes de *Chloroleucon foliolosum* (Benth.) G. P. Lewis. *Revista Brasileira Ciências Agrárias*, 9(4), 577-582.
- Silva, G. B. P., Barros, G. L., Almeida, J. P. N., Procópio, I. J. S., & Medeiros, P. V. Q. (2011). Tempo de germinação e desenvolvimento inicial na produção de mudas *Tamarindus indica* L. *Revista Verde*, 6(2), 58 – 63.
- Silva, M. A. D., Vieira, R. D., & Santos, J. M. (2008). Influência do envelhecimento acelerado na anatomia da testa de sementes de soja, cv. monsoy 84001. *Revista Brasileira de Sementes*, 30(2), 91-99.
- Smiderle, O. J. (2011). Água Quente na Superação da Dormência em Sementes de Paricarana. Comunicado Técnico. Embrapa, Brasil.
- Sousa, C. M., Romão Júnior, P. C., & Ximenes, P. A. (2009). Efeito da escarificação com ácido sulfúrico e da retirada da carúncula na qualidade fisiológica de sementes de mamona. *Revista Brasileira Oleaginosas fibrosa*, 13(1), 37-43.
- Souza, V. M. S., & Segato, S. V. (2016). Superação de dormência em sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) *Nucleus*, 13(1), 71-80.

Tsuzuki, K. J., Svidzinski, T. I. E., Shinobu, C. S., Silva, L. F. A., Cortez, D. A. G., Ferreira, I. C. P. (2007). Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79(4), 577–583.

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES DE *Sapindus Saponaria* L. DURANTE O ARMAZENAMENTO

Resumo

A demanda por sementes e mudas de *Sapindus saponaria* L. apresenta potencial de uso tanto para o plantio como árvore ornamental, devido ao baixo porte (até 8m), copa densa e globosa, como também para fins medicinais. O armazenamento de sementes florestais é de suma importância, pois muitas espécies nativas produzem sementes de curta longevidade, dificultando ou impedindo a sua utilização. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de diferentes condições e do tempo de armazenamento sobre a germinação, o vigor de e a atividade enzimática de sementes de *S. saponaria*. As sementes foram coletadas na zona urbana do município de Santa Helena de Goiás, Goiás, Brasil. Após a coleta, os frutos foram despulpados e beneficiados manualmente para a obtenção das sementes. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em embalagens de saco plástico de alta densidade, as quais foram lacradas e mantidas nas seguintes condições ambientais: armazenadas em temperatura ambiente de laboratório 25 °C (± 2 °C); BOD 20 ± 2 °C e 50 a 60 % UR e BOD 10 ± 2 °C e 50 a 60 % UR. Inicialmente, depois de 3 meses, 6 meses, 9 meses e 12 meses, as sementes foram submetidas aos testes de germinação, emergência, envelhecimento acelerado e testes bioquímicos. Sementes de *S. saponaria* mantém suas qualidades fisiológicas e vigor ao longo do armazenamento por um período de 9 meses, indiferente das temperaturas avaliadas (10 °C, 20 °C e 25 °C).

Palavras-chave: SOD, CAT, POX, vigor, deterioração

Introdução

Sapindus saponaria L. (saboneteira) é uma espécie nativa arbórea (Sapindaceae), com distribuição regular nos estados do Norte, Nordeste e Centro-Oeste (Grisi et al., 2013). Geralmente, essa espécie cresce em locais úmidos e é muito utilizada em paisagismo e em recuperação de áreas degradadas (Albiero et al., 2001). Sua composição fitoquímica é bem conhecida e inclui grande diversidade de produtos químicos compostos, tais como saponinas (Pelegriani et al., 2008).

O armazenamento de sementes florestais é de suma importância, pois além de buscar a preservação das qualidades físicas, fisiológicas e sanitárias, tem também por função, manter a disponibilidade contínua de sementes viáveis, o que é fundamental para a conservação em bancos de germoplasma e para os programas de reflorestamento (Floriano, 2014).

Após a colheita e durante o armazenamento, alguns fatores como qualidade inicial, teor de água das sementes, umidade relativa, temperatura do ambiente, fungos, insetos, tipo de embalagem e duração do período de armazenamento, influenciam a viabilidade das sementes (Carvalho & Nakagawa, 2012). As sementes podem apresentar, durante o armazenamento, alterações fisiológicas e formação de compostos químicos e modificações nas proteínas armazenadas (Shibata et al., 2011). A alteração da estrutura dos compostos de reservas afetam diretamente o potencial do armazenamento, pois esses são responsáveis pelas funções vitais das sementes (Marcos Filho, 2015).

De acordo com Medeiros (2001), o processo de deterioração teria como alteração bioquímica inicial a desestruturação do sistema de membranas em nível celular, por meio da ação de radicais livres. Segundo Bewley et al. (2013), a peroxidação de um ácido graxo insaturado ocorre, inicialmente, com a remoção de um átomo de hidrogênio ligado ao carbono adjacente à dupla ligação, para produzir um radical livre, o qual reage com o oxigênio molecular, resultando num rearranjo na cadeia do ácido graxo e na formação de um radical peróxido. Os principais agentes oxidantes gerados são: hidroxilas (OH^\cdot), ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

As células apresentam um complexo sistema de defesa antioxidante para proteção dos danos causados pelas espécies de oxigênio ativo (McDonald Jr., 1999). O sistema de defesa antioxidativo enzimático das plantas inclui diversas enzimas antioxidantes nos diferentes compartimentos celulares. Dentre as principais enzimas são citadas as peroxidases (POD; EC 1.11.1.1), a superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) e a catalase

(CAT; EC 1.11.1.6) que juntamente com outras enzimas, protegem as células dos efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Resende et al., 2003; Cavalcanti et al., 2004; Soares; Machado, 2007).

Mudanças enzimáticas são importantes nos estudos da deterioração das sementes, pois a diminuição das enzimas antioxidativas está diretamente ligada ao processo de envelhecimento acelerado, com uma correlação positiva entre a capacidade antioxidante da enzima e o vigor das sementes (Bailly et al., 2002).

Diante do exposto e considerando a carência de estudos relacionados a espécie em questão, este trabalho teve como objetivo estudar a influência de diferentes condições e tempo de armazenamento sobre a germinação, o vigor e a atividade enzimática de sementes de *Sapindus saponaria* L.

Material e métodos

As sementes de *S. saponaria* L. foram coletadas na zona urbana do município de Santa Helena de Goiás, Goiás, Brasil (17°49'05''S e 50°36'29''W). Após a coleta, os frutos foram despolpados e beneficiados manualmente para a obtenção das sementes. Posteriormente procedeu-se a limpeza e homogeneização do lote, no homogeneizador do tipo boerner. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em embalagens de saco plástico de alta densidade, as quais foram lacradas e mantidas nas seguintes condições ambientais: temperatura ambiente de laboratório 25 °C (± 2 °C); BOD 20 ± 2 °C e 50 a 60 % UR e BOD 10 ± 2 °C e 50 a 60 % UR.

Inicialmente, depois de 3 meses, 6 meses, 9 meses e 12 meses, as sementes foram submetidas aos testes de germinação, emergência, envelhecimento acelerado e ensaios bioquímicos. O teor de água foi determinado antes e após cada período de armazenamento. Para isso, foi utilizado o método da estufa a 105 °C ± 3 °C durante 24 horas, utilizando duas amostras de aproximadamente 10 g para cada tratamento, conforme metodologia descrita pelas Regras para Análises de Sementes Brasileiras – RAS (BRASIL, 2009), sendo os resultados expressos em percentagem de água na semente em base úmida (b.u.).

Previamente aos testes de viabilidade e vigor, as sementes foram imersas em ácido sulfúrico concentrado por 90 minutos para superação da dormência. Para o teste de germinação, as sementes foram distribuídas de maneira linear e alterna sobre 2 folhas de papel germitest umedecidas com água destilada a 2,5 vezes o peso seco do substrato, e, após, cobertas com mais uma folha, umedecida da mesma forma, e então, confeccionados

os rolos e acondicionados em saco de plástico transparente. As sementes foram mantidas em germinador do tipo Mangesdorf na temperatura de 30 °C ($\pm 0,5$ °C) por 35 dias.

Para a avaliação do teste de germinação procederam-se contagens diárias do número de sementes germinadas (sementes com protrusão de radícula com 1 cm). As contagens do número de sementes germinadas iniciaram aos 12 dias e estenderam até aos 35 dias, após a sementeira. Ao final do teste, procedeu-se a avaliação do número de sementes germinadas, os resultados foram calculados de acordo com Brasil (2009) e expressos em percentagem.

Para o teste de emergência, 4 repetições de 25 sementes foram semeadas em leito de areia, com profundidade aproximada de 2 cm, em casa de vegetação com uso de 3 irrigações diárias. Contagens diárias de plântulas emergidas foram realizadas do 14º e ao 45º dia após a sementeira, utilizando como critério o número de plântulas com o surgimento dos eófilos. Ao final das contagens, registrou-se o número total de plântulas emergidas, calculando-se o percentual de plântulas emergidas de acordo com Brasil (2009).

Ao final do teste de emergência, dez (10) plântulas normais de cada repetição foram medidas com o auxílio de régua graduada em centímetros, sendo os resultados expressos em centímetros por plântula; a partir dessas plântulas foi determinada a massa seca, e foram levadas para a estufa regulada a 80 °C por 24 h e, decorrido esse período, pesadas em balança analítica com precisão de 0,001 g, conforme recomendações de Nakagawa (1999).

No teste de envelhecimento acelerado, uma camada única de sementes 25 sementes foi colocada sobre tela metálica acoplada em caixa plástica tipo gerbox contendo, ao fundo, 40 mL de água destilada. As caixas foram tampadas e mantidas em câmaras tipo BOD, no escuro, com temperatura de 42 °C durante 72 horas. Após o período de envelhecimento artificial, 4 subamostras de 25 sementes foram avaliadas pelo teste de germinação, utilizando a metodologia descrita acima, calculando a percentagem de plântulas normais obtidas ao final do teste, conforme metodologia descrita por Marcos Filho (2015).

Para a determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidativo, amostras de tecidos de reservas/embrionários das sementes de *S. saponaria* foram armazenadas individualmente em papel alumínio e mantidas em nitrogênio (N₂) líquido durante as coletas e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para posterior análise.

Para a obtenção do extrato de tecidos de reservas/embrionários para determinar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX), 0,250 g de fragmentos de sementes foram macerados com N₂ líquido em almofariz até a 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) 5 % (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 × g, por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante foi usado como extrato para as determinações enzimáticas.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 60 µL do extrato de tecidos de reservas/embrionários 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 15 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - EUA), a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). As amostras controles tiveram suas absorvâncias medidas a 560 nm utilizando mistura de reação mantida no escuro por 15 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 fotorredução do NBT (Beauchamp e 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 tecidos de reservas/embrionários 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 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) foi usado para determinar a atividade das CAT, a qual foi expressa em mmol min⁻¹ 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 H₂O₂ 20 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 15 µL do extrato de tecidos de reservas/embrionários e a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 420 nm, durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e

Maehley, 1955) foi usado para calcular a atividade da POX, que foi expressa em μmol de purpurogalina produzida $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Os danos celulares foram avaliados por meio da peroxidação de lipídeos através do teor de malondialdeído (MDA) conforme descrito por Cakmak e Horst (1991). Amostras de 150 mg de tecido foliar foram maceradas em N_2 líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de ácido tricloroacético (TCA) 1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a $12000 \times g$, durante 15 min, a 4 °C. Após centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m/v) (preparado em 20% (m/v) de TCA) e incubado em banho maria a 95 °C, por 30 min. Após esse período, a reação foi parada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a $9000 \times g$, por 10 min, e a absorbância específica do sobrenadante foi determinada a 532 nm. A absorbância inespecífica foi mensurada a 600 nm e subtraída do valor da absorbância específica. A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e foi expressa em $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de massa fresca (Heath e Packer, 1968).

A determinação da concentração de proteínas em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro repetições arranjados em 4 tempos e 3 temperaturas x adicional (tempo 0), o teste de médias foi realizado pelo teste Scott Knott com o auxílio do software estatístico Sisvar 5.6. (Ferreira, 2011)

Resultados e discussão

O maior percentual de germinação foi na temperatura de 25° C, que atingiu 78 % aos 3 meses, 85 % aos 9 meses, caindo aos 6 meses quanto aos 12 meses (Figura 1A). Ao longo do armazenamento a germinação aumentou até aos 9 meses, reduzindo aos 12 meses. Essa redução apenas no período inicial de armazenagem pode ser atribuída a algum mecanismo de adaptação a nova condição, enquanto o aumento durante o armazenamento pode ser atribuído a superação do estado de dormência das sementes (Catunda et al., 2003).

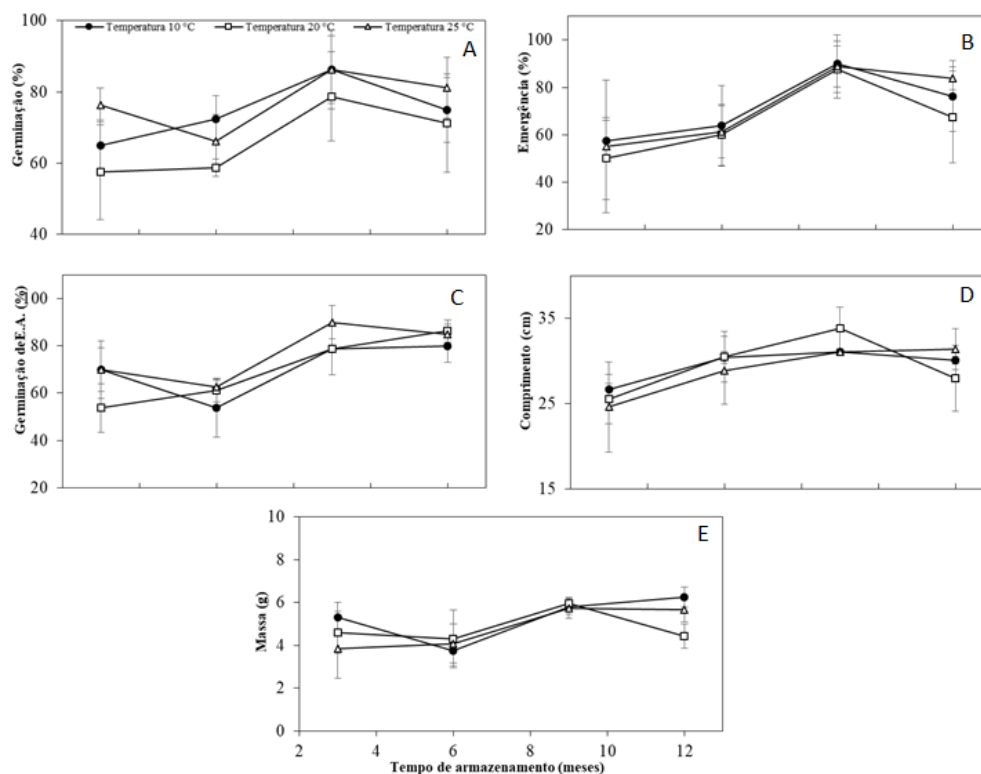


Figura 1: Germinação (%) (A), Emergência (%) (B); Germinação do Envelhecimento Acelerado (%) (C), Comprimento de Plântula (cm) (D), Massa Seca de Plântula (g) (E) de sementes de *Sapindus saponaria* L., durante 12 meses de armazenamento em temperaturas de 10, 20 e 25°C.

* Médias comparadas com o adicional (tempo 0)

Diferente ao observado neste estudo, sementes de *J. curcas* armazenadas em condições que variaram de 0 °C a 20 °C mantiveram sua qualidade fisiológica, demonstrando que as temperaturas não foram determinantes para a manutenção da qualidade fisiológica ao longo do período de armazenamento. E para o crambe houve redução nos valores da germinação ao longo dos nove meses de armazenamento, em diferentes embalagens (Cardoso et al., 2012).

Salomão (2004) ao estudar a longevidade das sementes *G. americana* em 3 temperaturas de armazenamento (5, 10 e 15 °C), durante 12 meses, descobriu que as sementes perderam quase completamente a viabilidade após seis meses de armazenamento

A temperatura não influenciou a emergência nem tampouco a emergência, no entanto, para o fator tempo de armazenamento, houve aumento nesse percentual até aos 9 meses, caindo aos 12 meses (Figura 1B).

Catão et al. (2016), avaliando sementes de alface, observaram que as sementes armazenadas em todos os períodos de armazenamento, a temperatura de 25 e 35 °C, apresentaram menor vigor do que as armazenadas a 15 °C, diferente ao encontrado nesse estudo.

Em sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina* (L.) Speng), as melhores condições de armazenamento foram as de temperaturas mais baixas, 10 °C, pois garantiram maior tempo de viabilidade das sementes no armazenamento (Borges, et al. 2009).

Embora as sementes de *S. saponaria* sejam ortodoxas, esses resultados não estão de acordo com o que se observa para esse tipo de sementes: quanto maior a temperatura e a umidade no armazenamento, maior será a atividade fisiológica da semente e mais rápida sua deterioração (Oliveira, 2007). Essa afirmativa é embasada pelo fato de que a germinação das sementes de *S. saponaria* após submetidas ao envelhecimento acelerado se mostrou análoga a germinação, e pode evidenciar que sementes de *S. saponaria* após o armazenamento ainda continuam vigorosas.

Em sementes de girassol, a diminuição da germinação após o envelhecimento acelerado é mais acentuada no meio ambiente sem controle de temperatura (Abreu et al., 2013), e difere deste estudo. Esse evento pode ter ocorrido pelo fato de que a taxa de deterioração das sementes é consideravelmente aumentada pela exposição a níveis de temperatura e umidade relativa altamente adversos (Abreu et al., 2013).

Semelhante ao observado na germinação e na emergência, houve incremento até o tempo 3 e redução no comprimento (cm) de plântula aos 12 meses. Já para a massa seca da plântula, houve redução dos 3 meses para os 6 meses, no entanto essa massa aumenta aos 9 meses e se mantém aos 12 meses (Figura 1D). Guedes et al., (2012) também observaram redução linear no comprimento e na massa seca das plântulas de *M. Urundeuva* durante os 240 dias de armazenamento.

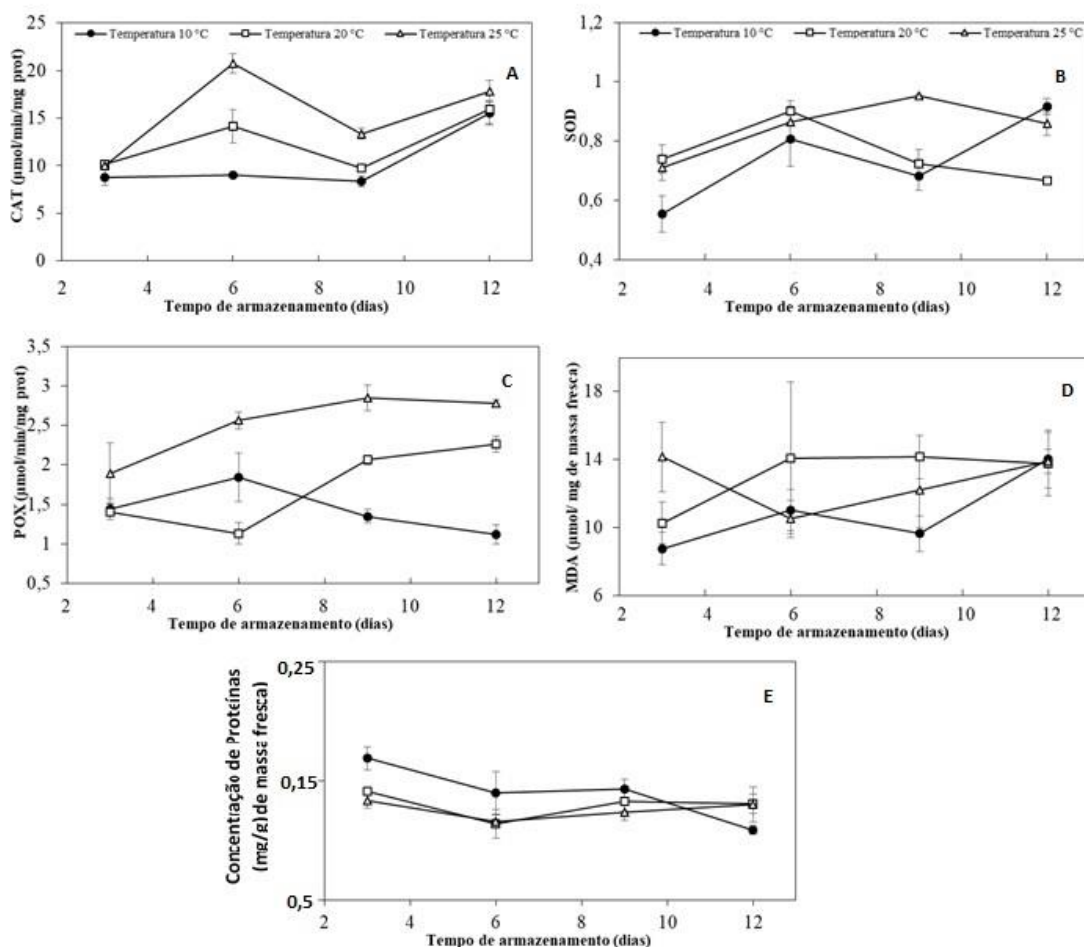


Figura 2: Atividade da CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) (A), Atividade da SOD (B), Atividade da POX ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) (C), MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg de massa fresca}$) (D), concentração de proteínas mg/g de massa fresca (E) de sementes de *Sapindus saponaria* L., durante 12 meses de armazenamento em temperaturas de 10, 20 e 25 °C.

* Médias comparadas com o adicional (tempo 0)

As enzimas têm um papel fundamental em várias reações metabólicas tanto para a síntese quanto para a biodegradação de moléculas durante o desenvolvimento e deterioração da semente, por isso, algumas enzimas podem ser usadas como marcadores bioquímicos importantes (Catão et al., 2016). Assim, neste estudo, as enzimas CAT, SOD e POX foram utilizadas para a determinação da viabilidade das sementes, uma vez que são eficientes para conhecer eventos relacionados a vida, mudanças de deterioração e morte de sementes (Basu, 1995).

Durante o período de armazenamento, a maior concentração de CAT foi aos 6 meses, havendo diminuição aos 9 meses. A maior atividade da CAT (Figura 2A) foi

observada nas sementes armazenadas à temperatura de 25 °C (temperatura mais alta), enquanto as menores atividades foram encontradas na temperatura de 10 °C (temperatura mais baixa). Isso evidencia que temperaturas mais altas acarretam estresse as sementes de *S. saponaria*. Já em sementes de *Araucaria angustifolia*, Araldi et al. (2016), comparando ambiente sem controle e câmara fria, observaram aumento da CAT em resposta ao armazenamento de sementes, especialmente nas amostras armazenadas em câmara fria.

Para SOD (Figura 2B), houve comportamento semelhante entre as temperaturas ao longo do armazenamento, com exceção para as temperaturas de 10 e 25 °C, em que houve aumento aos 9 meses. Semelhantemente, aumento significativo na atividade da isoenzima de SOD, durante todo período de armazenamento, tanto para câmara fria como para ambiente não controlado, foi observado para *A. angustifolia* (Araldi et al., 2016).

Em sementes de soja (Carvalho et al., 2014) houve diferenças significativas na expressão de SOD ao longo do armazenamento, verificando-se incremento da atividade dessa enzima aos 2 e 4 meses de armazenamento, independente da condição de armazenamento. Porém, após 6 e 8 meses de armazenamento sob condições não controladas, a expressão da SOD diminuiu, ao passo que para sementes armazenadas em câmara fria, a atividade dessa enzima se manteve.

Para POX (Figura 2C), também foi observada maior atividade na temperatura de 25 °C, havendo discreta elevação ao longo do armazenamento, indicando que temperaturas menores reduz o processo de deterioração via peróxido de hidrogênio, substrato da POX. A manutenção na atividade das enzimas do sistema antioxidantes, como a SOD, a CAT e a POX é crucial para evitar danos as membranas celulares, pois danos nessa estrutura pode afetar a qualidade das sementes (Deuner et al. 2011).

No tempo 1, a maior concentração de MDA (Figura 2D) foi observada na temperatura de 25°C, reduzindo até aos 9 meses, porém ao final dos 12 meses de armazenamento, as concentrações de MDA se igualaram para as 3 temperaturas. O malonaldeído (MDA) é um produto gerado pela peroxidação lipídica, sendo um composto que pode atacar resíduos de aminoácidos (induzindo perda de função por parte de proteínas) ou bases nitrogenadas (tendo assim propriedades mutagênicas). Altas taxas de MDA podem indicar deterioração das sementes. Assim, temperaturas menores são necessárias para a manutenção da integridade das membranas das sementes de *S. saponaria*.

A concentração de proteínas totais, indiferente da temperatura de armazenamento, reduziu ao longo do tempo de armazenamento (Figura 2E). Isso evidencia que houve oxidação proteica via estresse oxidativo. Nesse processo ocorre a modificação covalente de proteínas, que é essencialmente irreversível e frequentemente usada como marcador de estresse oxidativo (Møller et al., 2007). Isso pode resultar em perda de função e maior susceptibilidade à proteólise, afetando a germinação, o vigor e o desempenho das mudas no campo (Oracz et al., 2009).

Conclusão

Sementes de *Sapindus saponaria* L. mantêm sua qualidade fisiológica e vigor ao longo do armazenamento por um período de até 9 meses, independentemente das temperaturas avaliadas (10 °C, 20 °C e 25 °C).

Referências Bibliográficas

- Abreu, L. A. de S.; Carvalho, M. L. M. de; Pinto, C. A. G.; Kataoka, V. Y.; Silva, T. T. de A. S. Deterioration of sunflower seeds during storage. *Journal of Seed Science*, v. 35, n. 2, p.240-247, 2013.
- Albiero, A. L. M., Bachi, E. M., Mourão, K. S. M. Caracterização das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). *Revista Acta Scientiarum*, v. 23, n. 2, p. 549-560, 2001.
- Anderson, D.; Prasad, K.; Stewart, R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.*1247-1257. 1995.
- Araldi, C. G.; Coelho, C. M. C.; Gaziola, S. A.; Azevedo, R. A. Storage elicits a fast antioxidant enzyme activity in *Araucaria angustifolia* embryos. *Acta Physiol Plant.* 38:201, 2016.
- Bailly, C.; Bogatek-Leszczynska, R.; Côme, D.; Corbineau, F. Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Seed Science Research*, v.12, n.1, p.47-55, 2002.
- Bailly, C; Bogatek-Leszczynska, R.; Côme, D.; Corbineau, F. Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Search Science Research*, 2002.Zannon, A.; Ramos, A. Armazenamento de sementes de espécies florestais. Simpósio Brasileiro sobre

- Tecnologia de Sementes Florestais, Belo Horizonte. Informativo ABRATES, v.1, p.285-316. 1986.
- Barreto, C. F. E., Cavasin, G. M. Silva, H. L. G., & Silva, I. G. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* LIN (Sapindaceae). *Revista de Patologia Tropical*,35(1), 37-57. 2006.
- Basu, R. N. Seed Viability. In: Basra, A. S. Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications. New York: Haworth, p. 1-42, 1995.
- Beauchamp, C.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analyt. Biochem.*276-287, 1971
- Bewley, D.; Bradford, K. J.; Hilhorst, H. W. H.; Nonogaki, H. Mobilization of Stored Reserves. *Seeds*. Springer, 2013.
- Borges, S.; Borges, E. E. De L.; Correa, P. C.; Arno Brune, A. Equilíbrio higroscópico e viabilidade de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina* (L.) Speng) em diferentes condições ambientais de armazenamento. *Scientia Forestalis*. v. 37, n. 84, p. 475-481, 2009.
- Bradford, M. N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*72:248-254, 1976.
- Brasil. Ministerio da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análises de sementes. Brasília: CLAV/DNDV/SNDA/MA, 365p. 2009.
- Cakmak, I., Marschner. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.*98:1222-1227. 1992.
- Cakmak, L., Horst, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activity in root tip of soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.*83:463-468. 1991.
- Cardoso, R. B.; Binotti, F. F. da S.; Cardoso, E. D. Potencial fisiológico de sementes de crambe em função de embalagens e armazenamento. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.42, p.272-278, 2012.
- Carvalho NM, Nakagawa J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: FUNEP. 590 p. 2012.

- Carvalho, E.; Mavaieie, D. P. da R.; Oliveira, J. A.; Carvalho, M. V.; Vieira, A. R. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. *Pesquisa agropecuária brasileira*. v.49, n.12, p.967-976, 2014.
- Catão, H. C. R. M.; Gomes, L. A. A.; Guimarães, R. M.; Fonseca, P. H. F.; Caixeta, F.; Marodin, J. C. Physiological and isozyme alterations in lettuce seeds under different conditions and storage periods. *Journal of Seed Science*, v.38, n.4, p.305-313, 2016.
- Catunda, P. H. A.; Vieira, H. D.; Silva, R. F.; Posse, S. C. P. Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo. *Revista Brasileira de Sementes, Pelotas*, v. 25, n. 1, p.65-71, 2003.
- Cavalcanti, F. R.; Oliveira, J. T. A.; Martins-Miranda, A. S.; Viégas, R. A.; Silveira, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist*, 2004.
- Chance, B.; Maehley, A. C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.*2:764-775. 1995.
- Cunha, J. P. A. R. da; Oliveira, P. de; Santos, C. M. dos; Mion, R. L. Qualidade das sementes de soja após a colheita com dois tipos de colhedora e dois períodos de armazenamento. *Ciência Rural*, v.39, p.1420-1425, 2009.
- 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 Physiol.*34:1023-1028, 1993.
- Demito, A.; Afonso, A.D.L. Qualidade das sementes de soja resfriadas artificialmente. *Engenharia na Agricultura*, v.17, p.7-14, 2009.
- Deuner, C.; Maia, M. De S.; Deuner, S.; Almeida, A. da S.; Meneghello, G.E. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão miúdo submetidos ao estresse salino. *Revista Brasileira de Sementes*, v.33, p.711-720, 2011.
- Ferreira, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium (Lavras)*, 6, 36-41. 2011.
- Floriano EP. Armazenamento de sementes florestais. Santa Rosa: ANORGS. 10 p. Caderno Didático. 2014.
- Giannopolitis, C. N.; Ries, S.K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*59:309-314. 1977.
- Grisi, P.U.; Gualtieri, S.C.J.; Ranal, M.A.; Santana, D.G. Influência alelopática do extrato aquoso de raiz de *Sapindus saponaria* L. sobre capim arroz e corda-de-viola. *Bioscience Journal, Uberlândia*, v. 29, n. 3, p. 760-766, 2013.

- Guedes, R.S.; Alves, E.U.; Bruno, R.L.A.; Gonçalves, E.P.; Costa, E.G.; Medeiros, M.S. Armazenamento de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. em diferentes embalagens e ambientes. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.14, n.1, p.68-75, 2012.
- Guzman, L. E. P.; Aquino, A. L. Seed characteristics and storage behavior of physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Philippine Journal of Crop Science*, Laguna, v. 34, n. 1, p. 13-21, 2009.
- Heath, R. L.; Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:189-198. 1968.
- Kar, M.; Mishra, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57:315-319. 1976.
- Lorenzi, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 368p. 2002.
- Machado, C. F.; Cícero, S. M. Metodologia para a condução do teste de germinação e utilização de raios-x para a avaliação da qualidade de sementes de aroeirabranca (*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.) Informativo ABRATES, Brasília, 2002.
- Marcos Filho, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ, 2ed., 660p, 2015.
- Mcdonald, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, Züriche, 1999.
- Medeiros, A. C. S. Armazenamento de Sementes de Espécies Florestais nativas. Embrapa Floresta, Colombo, 2001.
- Møller, I.M.; Jensen, P.E.; Hansson, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 58:459–481, 2007.
- Nakagawa, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: Krzyzanowski, F. C., Vieira, R. D., & França Neto, J. B. (Ed.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES. 21p. 1999.
- Oracz, K.; El-Maarouf Bouteau, H.; Farrant, J.M., Cooper, K.; Belghazi, M.; Job, C.; Job D.; Corbineau, F.; Bailly, C. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *The Plant Journal*. 50:452–465, 2009.
- Pelegrini, D. D.; Tsuzuki, J. K.; Amado, C. A. B.; Cortez, D. A. G.; Ferreira, I. C. P. Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, n. 6, p. 922-927, 2008.

Resende, M. L.; Salgado, S. M. L.; Chaves, Z, M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Revista Brasileira de Fitopatologia*, 2003.

Salinas, A. R.; Yoldjian, A. M.; Craviotto, R. M.; Bisaro, V. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, p.371379, 2001.

Salomão, A. N. Desiccation, storage and germination of *Genipa americana* seeds. *Comparative storage: biology of tropical tree seeds*. IPGRI. p.263- 269, 2004.

Shibata, M.; Coelho, C.M.M.; Oliveira, L.M.; Guidolin, A.F. Padronização metodológica para determinação de proteínas de reserva de sementes de *Handroanthus albus* (Chamiso). *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v.10, n.2, 2011.

Tsuzuki J. K.; Svidzinski T. I.E.; Shinobu, C. S.; Silva, L. F. A.; Rodrigues-Filho, E.; Cortez, D. A.G.; Ferreira, I. C. P. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol.79, n.4, p. 577–583, 2007.

CAPÍTULO III

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Sapindus saponaria* L.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento fisiológico e o vigor de sementes de *Sapindus saponaria* L. com diferentes teores de água durante a criopreservação, métodos de descongelamento e crioprotetores. O estudo foi dividido em dois ensaios. **Ensaio 1:** As sementes foram submetidas ao processo de secagem em estufa de circulação forçada, com uma temperatura de 40 °C, até que obtivessem os teores estabelecidos (8, 7, 6, e 5 % b.u.), depois foram acondicionadas em nitrogênio líquido a -196 °C por 10 dias; então, as sementes foram submetidas a descongelamento lento, rápido e micro-ondas. **Ensaio 2:** Após a determinação do melhor teor de água para a criopreservação de sementes de *S. saponaria*, as sementes foram submetidas aos diferentes tratamentos de crioproteção: nitrogênio líquido sem o crioprotetor, nitrogênio líquido com o crioprotetor glicerol (10 %) e com o crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) (10 %); em todos os tratamentos as sementes foram acondicionadas em nitrogênio líquido a -196 °C e armazenadas de 30 a 180 dias. Após o descongelamento e o armazenamento, com e sem crioprotetores, as sementes foram submetidas à avaliação fisiológica, testes de vigor e atividade de enzimas antioxidativas. No ensaio de teor de água x método de descongelamento, os melhores resultados foram encontrados nas sementes com teor de 6 % (b.u.) e descongeladas em micro-ondas. O uso de soluções de crioprotetores na criopreservação de sementes de *S. saponaria* não é necessário.

Palavras-chave: teor de água; descongelamento; crioprotetores

Introdução

Sapindus saponaria L., da família sapindaceae, conhecida popularmente como sabão de soldado, saboneteira e sabão de macaco, é uma espécie arbórea distribuída nos estados das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil (Grisi et al. 2013). Segundo Oliveira et al. (2012), essa espécie é de grande importância para o reflorestamento de áreas degradadas, confecção de brinquedos, uso de suas sementes para o artesanato e exploração de sua madeira para o emprego na construção civil. As raízes, frutos e casca dessa espécie apresentam substâncias adstringentes, antiespasmódicas, calmantes, antitussígenas (Lorenzi, 2002), larvicidas e fungicida (Tsuzuki et al., 2007).

A criopreservação é um processo de armazenamento de células vivas, tecidos e órgãos a temperaturas ultrabaixas (nitrogênio líquido, -196 °C), sendo considerado o melhor procedimento para a preservação do germoplasma a longo prazo sem alterações genéticas e fisiológicas (Ashmore & Engelmann 1997; Engelmann & Takagi, 2000). Mais de 100 espécies já foram criopreservadas com sucesso ao longo dos últimos 25 anos (Flachsland et al., 2006). Esse processo tem sido vantajoso por requerer pequeno espaço para a instalação do banco de germoplasma, baixo custo e proteção contra contaminação (Engelmann, 2011).

A técnica de criopreservação é eficaz para armazenar recursos genéticos a longo prazo, no entanto, o teor de água é um dos fatores mais críticos nesse processo, tendo que ser reduzido até um ponto que evite a formação de cristais de gelo, no intuito de preservar a integridade dos tecidos da semente (Lambardi et. al., 2004).

Na técnica de criopreservação, não só o teor de água deve ser levado em consideração, mas também o método de descongelamento. De acordo com Molina et al., 2006, descongelamento a temperatura ambiente se torna questionável, uma vez que existe a possibilidade do recongelamento durante esse período. Assim, é necessário estudos em relação aos métodos mais rápidos como o descongelamento em banho-maria e a utilização do micro-ondas, pois quanto mais rápido ocorrer o descongelamento das sementes, melhor a preservação de suas características fisiológicas.

Uma alternativa interessante para a utilização da técnica de criopreservação é a utilização de agentes crioprotetores à base de dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etileno glicol, metanol e propileno glicol, entre outros (Salomão, 2002). Os agentes crioprotetores penetrantes são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que o congelamento causa sobre a célula (Gonzalez, 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento fisiológico e o vigor de sementes de *S. saponaria* durante a criopreservação com diferentes teores de água, avaliando métodos de descongelamento e crioprotetores durante o armazenamento por 180 dias.

Material e Métodos

Ensaio 1: teor de água x método de descongelamento

Os frutos de *Sapindus saponaria* L. foram coletados no município de Santa Helena de Goiás-GO Brasil (17°49'05"S e 50°36'29"W) e transportados até o Laboratório de Sementes do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. As sementes foram extraídas manualmente, beneficiadas e escarificadas com ácido sulfúrico P.A. durante 90 minutos para superação de dormência. Após determinado o teor de água inicial, as sementes foram submetidas ao processo de secagem em estufa de circulação forçada, com temperatura de 40°C, até que obtivessem os teores estabelecidos (8, 7, 6, e 5 % b.u).

Para a criopreservação, as sementes de *S. saponaria* apresentando 8, 7, 6 ou 5 % b.u. de teor de água, foram embalados em papel alumínio e acondicionados em tubos cilíndricos de alumínio (canister). Posteriormente, os tubos foram colocados em botijões criogênicos, isolados com vácuo parcial, a -196 °C por 10 dias. Após esse período, as sementes, foram submetidas a tratamento de descongelamento lento e gradual, seguindo a sequência de etapas: freezer -80 °C, freezer -26±2 °C, BOD 10 °C e temperatura ambiente de 25 °C, durante 1 hora em cada uma das etapas. As sementes também foram submetidas aos tratamentos de descongelamento rápido em banho-maria, a temperatura de 60 °C durante oito minutos e em micro-ondas, a potência de 15000 w durante três minutos. Após o descongelamento, as sementes foram lavadas em água destilada e submetidas a testes para a avaliação da qualidade fisiológica.

A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada por meio das características de emergência e germinação (percentual), vigor (índice de velocidade de emergência - IVE, índice de velocidade de germinação – IVG, envelhecimento acelerado, comprimento total e massa total).

Para a avaliação do teste de germinação procederam-se contagens diárias do número de sementes germinadas, utilizando como critério a protusão da radícula (1 cm). As contagens do número de sementes germinadas iniciaram aos 12 dias e se estenderam até aos 35 dias após a semeadura. Ao final do teste, procedeu-se a avaliação do número

de sementes germinadas, os resultados foram calculados de acordo com Brasil (2009) e expressos em porcentagem.

Para o teste de emergência, 4 repetições de 25 sementes foram semeadas em leito de areia, com profundidade aproximada de 2 cm, em casa de vegetação com uso de 3 irrigações diárias. Contagens diárias de plântulas emergidas foram realizadas do 14º e ao 45º dia após a semeadura, utilizando como critério o número de plântulas com o surgimento dos eófilos. Ao final das contagens, registrou-se o número total de plântulas emergidas, calculando-se o percentual de plântulas emergidas de acordo com Brasil (2009).

Ao final do teste de emergência, dez (10) plântulas normais de cada repetição foram medidas com o auxílio de régua graduada em centímetros, sendo os resultados expressos em centímetros por plântula; a partir dessas plântulas foi determinada a massa seca, e foram levadas para a estufa regulada a 80 °C por 24 h e, decorrido esse período, pesadas em balança analítica com precisão de 0,001 g, conforme recomendações de Nakagawa (1999).

No teste de envelhecimento acelerado, uma camada única de 25 sementes foi colocada sobre tela metálica acoplada em caixa plástica tipo gerbox contendo, ao fundo, 40 mL de água. As caixas foram tampadas e mantidas em câmaras tipo BOD, com temperatura de 42 °C durante 72 horas. Após o período de envelhecimento artificial, 4 subamostras de 25 sementes foram avaliadas pelo teste de germinação, utilizando a metodologia descrita acima, calculando a porcentagem de plântulas normais obtidas ao final do teste, conforme metodologia descrita por Marcos Filho (2005).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 4x3 (teores de água x métodos de descongelamento), com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5 % de significância, utilizando o programa Sisvar (Ferreira, 2011).

Ensaio 2: crioprotetor x tempo de armazenamento

O efeito do crioprotetor e do tempo de armazenamento sobre a qualidade fisiológica das sementes de *Sapindus saponaria* L. foram testados após a determinação do teor de água limite para a criopreservação. As sementes foram submetidas aos diferentes tratamentos de crioproteção: nitrogênio líquido sem o crioprotetor, nitrogênio líquido com o crioprotetor glicerol (10 %) e com o crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) (10 %). Em todos os tratamentos as sementes foram embaladas em papel alumínio e

acondicionados em tubos cilíndricos de alumínio (canister). Posteriormente, os tubos foram colocados em botijões criogênicos, isolados com vácuo parcial, a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. As sementes submetidas aos diferentes tratamentos de crioproteção foram acondicionados por um período de 30 a 180 dias.

O descongelamento das sementes submetidas ao armazenamento em nitrogênio líquido foi realizado de acordo com o melhor método determinado no experimento de criopreservação, ensaio 1 – teor de água x método de descongelamento. Após submeter as sementes aos diferentes armazenamentos, estas foram avaliadas por meio dos seguintes parâmetros: teor de água, germinação, emergência e vigor (índice de velocidade de emergência - IVE, índice de velocidade de germinação – IVG, envelhecimento acelerado, comprimento e massa) conforme métodos anteriormente descritos.

O vigor das sementes também foi avaliado pela atividade das enzimas do sistema antioxidativo, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX), para isso, amostras de tecidos de reservas/embrionários das sementes de *S. saponaria* foram armazenadas individualmente em papel alumínio e mantidas em nitrogênio (N_2) líquido durante as coletas e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise.

Para a obtenção do extrato de tecidos de reservas/embrionários para determinar a atividade das enzimas SOD, CAT e POX, 0,250 g de fragmentos de sementes foram macerados com N_2 líquido em almofariz até a 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) 5% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a $12000 \times g$, por 15 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante foi usado como extrato para as determinações enzimáticas.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 60 μL do extrato de tecidos de reservas/embrionários 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 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 15 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - EUA), a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). As amostras controles tiveram suas absorvâncias medidas a 560 nm utilizando mistura de reação mantida no escuro por 15 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 fotorredução do NBT (Beauchamp e 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 tecidos de reservas/embrionários 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 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) foi usado para determinar a atividade das CAT, que foi expressa em mmol min⁻¹ 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 H₂O₂ 20 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 15 µL do extrato de tecidos de reservas/embrionários e a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 420 nm, durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) foi usado para calcular a atividade da POX, que foi expressa em µmol de purpurogalina produzida min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A determinação da concentração de proteínas em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 3x3 (crioproteção x períodos de armazenamento) com 4 repetições, realizou-se a análise de variância. Foi empregado o teste de Scott Knott e aplicação de regressão polinomial, adotando-se as equações cujos coeficientes de determinação (R²) foram superiores. Todas as análises foram feitas com o auxílio do software estatístico Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

Resultados e discussão

Ensaio 1: teor de água x método de descongelamento

Verificou-se que o método de descongelamento rápido (micro-ondas) foi melhor no teor de 6 % (b.u.), enquanto para o descongelamento em banho-maria foi o método gradual. Esse teor de água apresentou menor emergência comparado aos outros teores de água.

Em estudos com ipê (*Tabebuia heptaphylla* Vell.), Higa et al. (2011), sementes com 7,5 % a 8,4 % de teor de água tiveram uma emergência entre 54-67 %, sendo que a

forma de descongelamento (lento ou rápido) não influenciou nesse processo. Já para sementes de quina (*Strychnos pseudoquina* A. St. Hil) (Silva et al., 2012), sementes criopreservadas com teor de água de 7 %, a porcentagem de emergência de sementes descongeladas pelos métodos rápidos versus lento, diferiu apenas no armazenamento de 2 meses; as sementes sujeitas a descongelamento rápido apresentaram menores porcentagens de germinação do que as submetidas a descongelamento lento. As sementes de quatro espécies do gênero *Citrus* (*Citrus aurantifolia*, *Citrus grandis*, *Citrus madurensis* e *Citrus reticulata*), de acordo com Hor et al. (2005), após a exposição ao nitrogênio líquido não exibiram sobrevivência em altos teor de água e aumento dramático na porcentagem de emergência foi encontrado diminuindo o teor de água até 75 a 80 %.

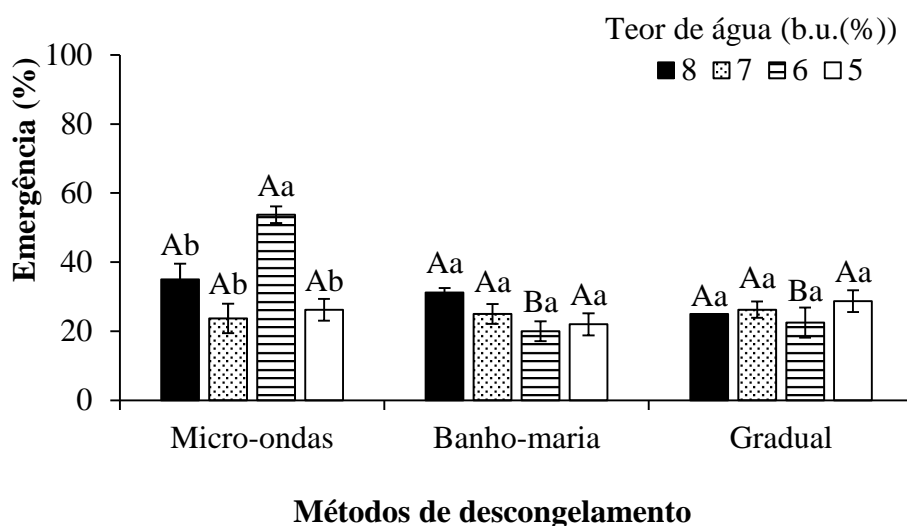


Figura 1 – Percentual de emergência de sementes de *Sapindus saponaria* L. sob armazenamento criogênico com uso de diferentes teores de água (b.u. %) e métodos de descongelamento.

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula (método de descongelamento) e minúscula (teores de água) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. ^{ns} – não significativo.

Na germinação, o teor de água de 6 % (b.u.) (Figura 2) também apresentou melhores resultados no descongelamento em micro-ondas, enquanto o descongelamento gradual apresentou os piores resultados nesse teor. Em sementes de cebola, o método de descongelamento em micro-ondas também foi o que se observou maior percentual de germinação (Molina et al., 2006). No entanto, em aquênios de caju-de-árvore-do-Cerrado

(*Anacardium othonianum* Rizz) o descongelamento em micro-ondas com 8% de teor de água, exibiu os valores mais baixos de germinação (Silva et al., 2013). Já para a pseudoquina (*Strychnos pseudoquina* A. St. Hil), as sementes criopreservadas com um teor de água de 6 % não demonstraram diferença entre os métodos de descongelamento lento e rápido (Silva et al., 2012).

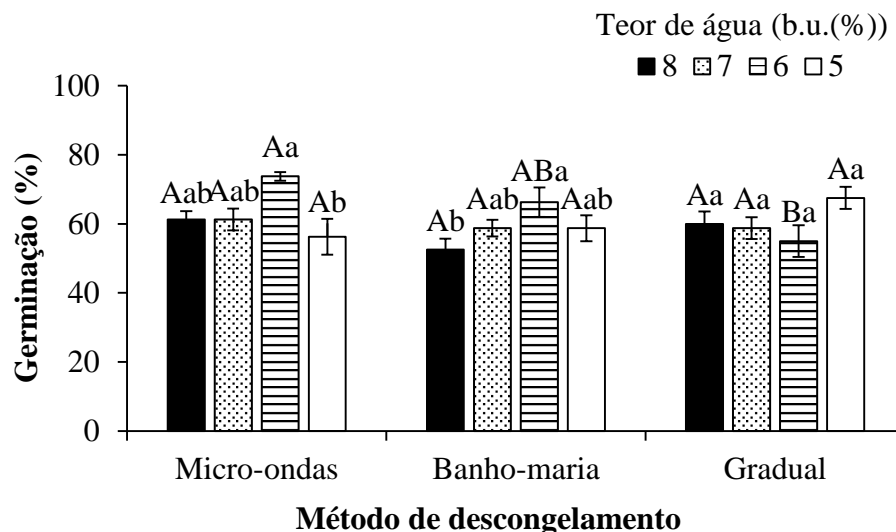


Figura 2 – Germinação (%) de sementes de *Sapindus saponaria* L., sob armazenamento criogênico com uso de diferentes teores de água (b.u. %) e métodos de descongelamento. *Médias seguidas de mesma letra maiúscula (método de descongelamento) e minúscula (teores de água) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. ^{ns} – não significativo.

Neste estudo, sementes com teor de água 6 % (b.u.) descongeladas em micro-ondas apresentou maior IVE (Figura 3), as descongeladas em banho-maria apresentaram menor índice. Segundo Stanwood & Roos (1979), sementes ortodoxas podem ser desidratadas ao teor de água muito baixo sem a ocorrência de danos por congelamento ou por formação de cristais de gelo, e sem prejuízo à viabilidade. Isso pode explicar o fato das sementes de *S. saponaria* não perderem qualidade fisiológica quando em contato com o nitrogênio líquido (-196°C) com teor de 6% de água, desde que descongeladas de forma rápida (micro-ondas).

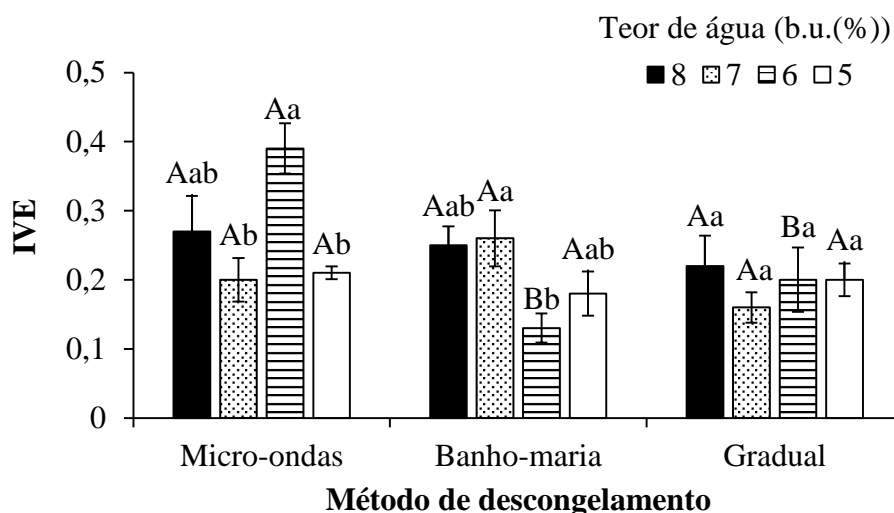


Figura 3 – Índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de *Sapindus saponaria* L., sob armazenamento criogênico com uso de diferentes teores de água (b.u. %) e métodos de descongelamento.

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula (método de descongelamento) e minúscula (teores de água) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. ^{ns} – não significativo.

Sementes que passaram pelo teste de envelhecimento acelerado diminuíram drasticamente a germinação das sementes de *S. saponaria*, apresentando menor germinação no teor de 6 % (b.u.) no descongelamento gradual, enquanto o melhor resultado foi obtido nesse mesmo teor no descongelamento em micro-ondas (Figura 4). Esses resultados confirmam o efeito negativo do descongelamento lento nesse teor de água, com redução do vigor e na força das sementes demonstrados pelo teste de germinação.

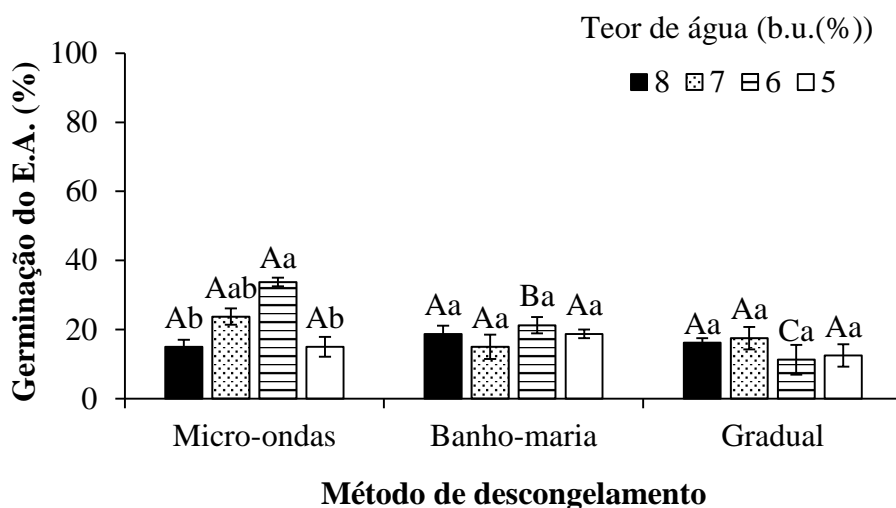


Figura 4 – Germinação do envelhecimento acelerado (%) de sementes de *Sapindus saponaria* L. sob armazenamento criogênico com uso de diferentes teores de água (b.u. %) e métodos de descongelamento.

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula (método de descongelamento) e minúscula (teores de água) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. ^{ns} – não significativo.

Embora sementes com o teor de de água de 6% (b.u.) descongeladas de forma gradual tenham apresentado piores características fisiológicas, foram as que atingiram maior comprimento total de plântulas (Figura 5), levando a concluir que esse crescimento não se tratou de vigor e sim de um provável estiolamento em consequência de danos fisiológicos causados durante o tratamento de secagem e descongelamento.

Para a espécie barbatimão (*Stryphnodendron adstringes* (Mart.) Coville), estudos realizados por Porto et al. (2014), verificaram que o teor de 12% de água nas sementes criopreservadas tem efeito negativo no crescimento dessa espécie, concluindo que um alto teor de água, pode causar danos durante o resfriamento e a formação de cristais de gelo a partir de água livre nas células, sendo que para o barbatimão os melhores resultados encontrados foram entre 6% e 9% de teor de água nas sementes.

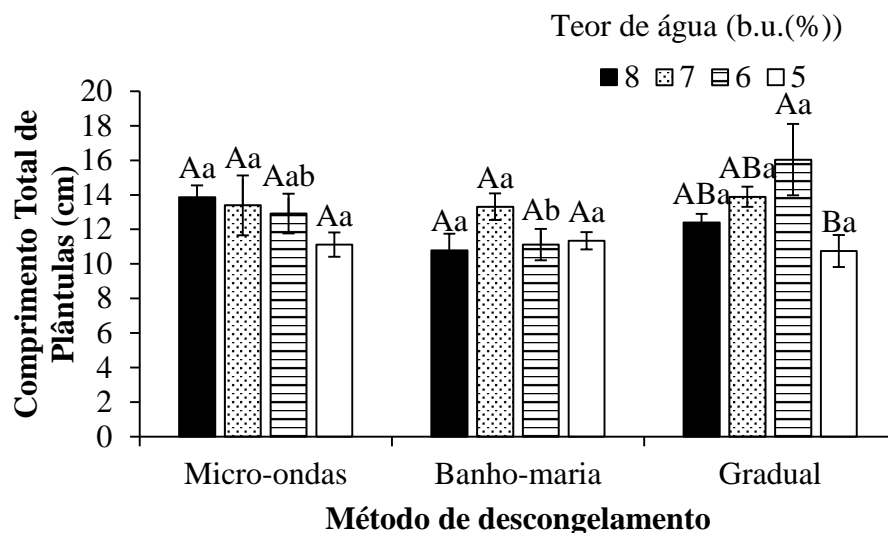


Figura 5 – Comprimento total de plantas (cm) de sementes de *Sapindus saponaria* L., sob armazenamento criogênico com uso de diferentes teores de água (b.u.%) e métodos de descongelamento.

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula (método de descongelamento) e minúscula (teores de água) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. ^{ns} – não significativo.

De acordo com Engelmann (2011), um dos principais fatores que limitam a criopreservação é o teor de água, pois podem causar lesões irreversíveis. Porto et al. (2014), recomenda o conteúdo de água inferior a 10% para sementes ortodoxas, que o teor de água favorável para a criopreservação difere entre as espécies. Nesse sentido, as sementes de *S. saponaria* criopreservados com teor de água de 6 % (b.u.) e descongelamento em micro-ondas produziram plântulas mais vigorosas, confirmando o efeito negativo da criopreservação de sementes com alto teor de água no desenvolvimento e vigor de plântulas. Essa afirmativa é corroborada pelo fato de que o descongelamento lento (gradual), proporciona danos fisiológicos e perda de vigor das plântulas de *S. saponaria*.

Ensaio 2: crioprotetor x tempo de armazenamento

A germinação das sementes reduziu ao longo do armazenamento para as armazenadas com crioprotetor DMSO (10 %), com percentuais de germinação de 87 reduzindo para 62 (figura 6A). O modelo linear se adequou perfeitamente aos dados com r^2 maior que 97 %, demonstrando o comportamento do armazenamento, uma vez que ao

longo do armazenamento ocorre a redução do vigor das sementes pela deterioração das mesmas.

O efeito observado nas sementes com uso de DMSO (10%) não foi verificado com o uso de glicerol (10 %) e sem uso de crioprotetor (Figura 6A), em que curvas polinomiais representaram os dados de melhor maneira, pois bons índices de germinação foram observados no início e aumento aos 120 dias e posteriormente redução aos 180 dias.

Em sementes de rainha do abismo (*Sinningia leucotricha*), referente à porcentagem de germinação, pode-se observar que o melhor tratamento foi o congelamento da semente diretamente no nitrogênio líquido (57 %), sem a necessidade de tratamento com as soluções crioprotetoras (Stegani et al., 2017)

Em estudos com três espécies de orquídeas (*Dendrobium crystallinum* Rchb.f., *Dendrobium virgineum* Rchb.f., e Vanda Miss Joaquim), o crioprotetor mais efetivo foi 5 % de meso-inositol, seguido por 7,5 % de manitol e 7,5 % (p / v) de glicose (Huehne & Bhinija). Já em sementes de cebola (*Allium cepa* L.), o tratamento criogênico, com uso de glicerol 50 % como crioprotetor, é prejudicial a qualidade fisiológica e altera sua composição química (Molina et al., 2006).

Em sementes de *P. mucronata*, *P. suberosa* e *P. edulis* foram obtidas respostas favoráveis à criopreservação sem o uso de crioprotetores, e em *P. micropetala* houve perda considerável do potencial germinativo após armazenamento em nitrogênio líquido (Araújo, et. al., 2016).

Inicialmente, as sementes de sabãozinho apresentaram percentual de emergência (Figura 6B) de plântulas de 35 %, com redução linear com o avanço do período de armazenamento para as sementes sem uso de crioprotetor. No entanto, para os resultados com o uso de crioprotetor nenhum modelo se adequou aos dados.

Em estudos com *P. mucronata*, observaram-se efeitos significativos da criopreservação em relação a maioria das variáveis, uma vez que, para as variáveis IVG, germinação e comprimento da raiz não foram observadas diferenças significativas entre o controle e a criopreservação sem o uso de crioprotetores (Araújo, et. al., 2016).

No início do armazenamento, foi notória a baixa massa seca (Figura 6D) e comprimento de plantas (Figura 6C), ocorrendo aumento ao longo do armazenamento e posteriormente redução. Isto mostra que as sementes de sabãozinho armazenadas em nitrogênio líquido conseguem superar sua dormência primária ao longo do armazenamento. O modelo quadrático descreve adequadamente a massa seca e

comprimento de plantas de sabãozinho sem o uso de crioprotetor e também o de glicerol (10 %) para o comprimento, exceto para o crioprotetor DMSO 10 %, em que não se ajustou nenhum modelo.

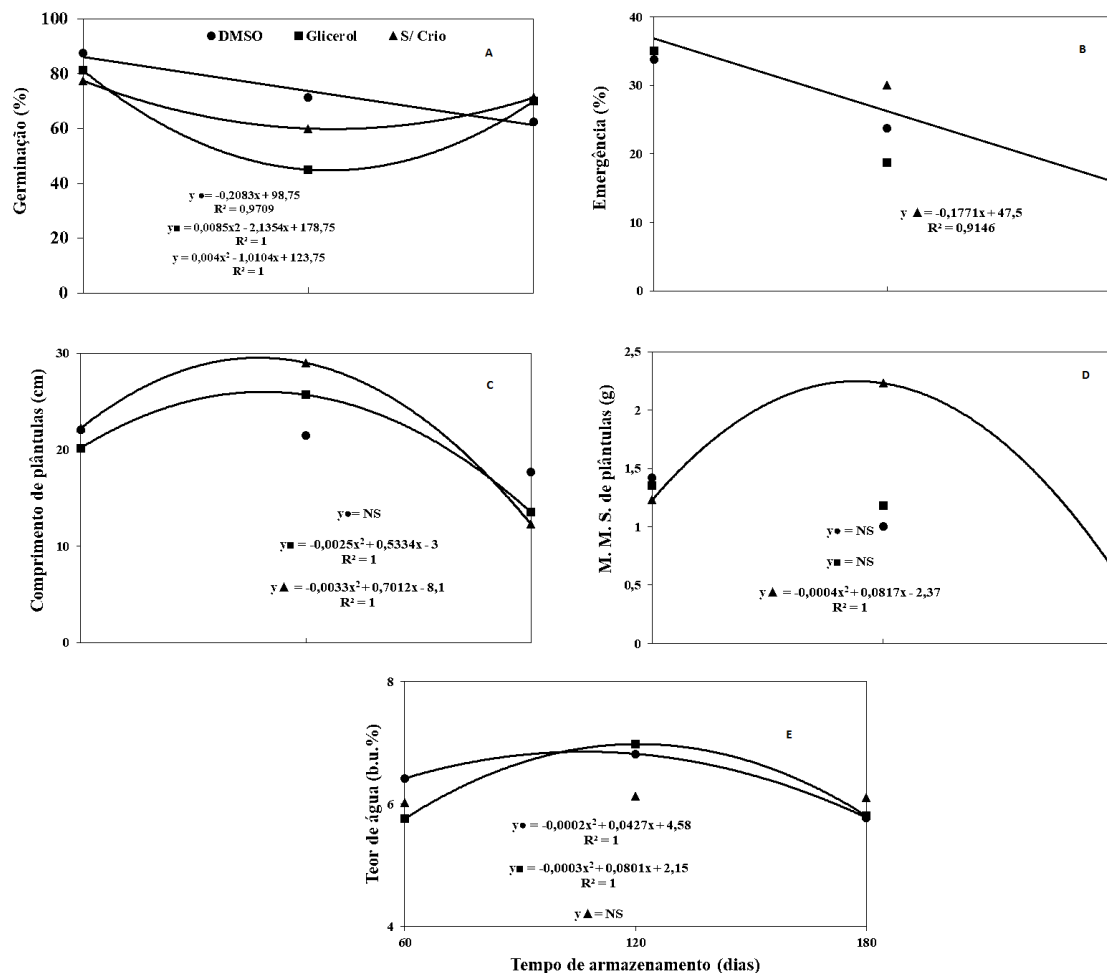


Figura 6 – Germinação (%) (A), emergência (%) (B), comprimento de plantas (cm) (C), massa de matéria seca (g) (D) e teor de água (b.u.) (E) de sementes de *Sapindus saponaria* L., sob armazenamento criogênico com uso de diferentes crioprotetores em diferentes períodos de armazenamento.

Martínez-Montero et al. (2002) relataram possíveis danos que podem ter sido causados pela perda de integridade celular pela formação de cristais de gelo e ao uso dos crioprotetores. Aguiar et al. (2012) afirmam que os efeitos deletérios para os materiais biológicos causados pelo processo de criopreservação estão relacionados a formação de cristais de gelo intracelular, ao fluxo de água fora da célula (desidratação) e ao aumento da concentração intracelular de solutos.

O modelo quadrático representa adequadamente o teor de água das sementes de sabãozinho (Figura 6E), exceto as sementes sem crioprotetor, em que não se ajustou nenhum modelo.

Galdiano Jr et al. (2012), trabalhando com criopreservação de sementes de híbrido *Dendrobium Swartz*. Dong Yai, observaram que o congelamento direto das sementes causou morte das mesmas, e que o tratamento que obteve maior sobrevivência após a exposição ao nitrogênio líquido foi a solução de PVS2 + floroglucinol,

DMSO e glicerol foram testados em sementes de orquídeas, e se observou que as sementes com 6 % de teor de água, apresentaram condições para serem crioconservadas (Hosomi, et al., 2012). Semelhante ao observado neste estudo, Ferrari et al. (2016) concluíram que para a criopreservação de sementes de *Encholirium spectabile* (bromélias) não é necessário usar soluções crioprotetoras.

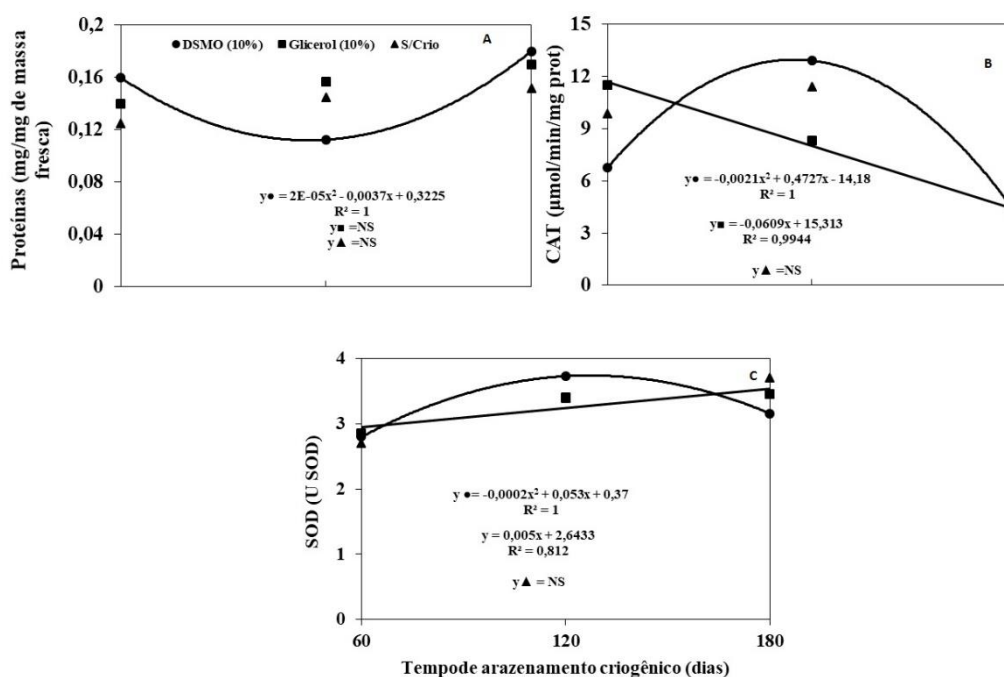


Figura 7 – Proteínas totais (mg/mg de massa fresca) (A), Catalase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) (B) e Superóxido dismutase (U SOD) (C) de sementes de *Sapindus saponaria* L., sob armazenamento criogênico com uso de diferentes crioprotetores em diferentes períodos de armazenamento.

Neste estudo, a concentração de proteína total (Figura 7A), em sementes com DMSO (10 %), ajustou-se ao modelo polinomial, tendo sua concentração diminuída aos

120 dias de armazenamento, porém volta a aumentar quando o armazenamento chega aos 180 dias. Para glicerol (10 %) e sem uso de crioprotetor, nenhum modelo se ajustou.

As proteínas são determinantes principais da germinação das sementes, uma vez que as sementes contêm todas as espécies de RNA necessárias para a germinação (Bewley, 1997), sendo que uma consequência importante do estresse oxidativo é a oxidação proteica, definida como modificação covalente de uma proteína, que é essencialmente irreversível e frequentemente usada como marcador de estresse oxidativo (Møller et al., 2007). Isso pode resultar em perda de função e maior susceptibilidade à proteólise (Scandalios 2005; Møller et al., 2007), afetando a germinação, o vigor e o desempenho de campo das mudas (Oracz et al., 2009).

Em estudos com *Araucaria angustifolia*, Araldi et al. (2016) observaram redução nos níveis de proteínas solúveis durante o armazenamento, essa diminuição seguiu o mesmo padrão que a redução observada na viabilidade das sementes, sendo que o teor de proteína de embrião de sementes recém-colhidas diminuiu após 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente e aos 90 dias de armazenamento em câmara fria (10 ± 3 °C)

As enzimas têm um papel fundamental em várias reações metabólicas tanto para a síntese quanto para a biodegradação de moléculas durante o desenvolvimento e deterioração da semente, por isso, algumas enzimas podem ser usadas como marcadores bioquímicos importantes (Catão et al., 2016). Um dos mecanismos de defesa modulados pelas plantas contra o estresse oxidativo é o sistema antioxidante que atua e constitui uma importante defesa primária contra os radicais livres gerados em sementes sob condições de estresse, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) (Mittler, 2002).

A atividade da CAT (Figura 7B) em sementes criopreservadas com glicerol (10%) apresentaram diminuição linear ao longo do armazenamento, já para as criopreservadas com DMSO (10 %) se adequaram ao modelo quadrático, tendo sua maior expressão aos 120 dias de armazenamento. Sementes que não foram criopreservadas não se ajustaram a nenhum modelo.

Armazenando várias cultivares de soja, Catão et al. (2016) observaram que na cultivar Elisa houve redução na atividade da CAT, e resultou em redução da prevenção de danos oxidativos, e pode ter causado menor qualidade fisiológica. Já em sementes de *Araucaria angustifolia* mostrou aumento da CAT em resposta ao armazenamento de sementes, especialmente nas amostras armazenadas em câmara fria (Araldi et al., 2016).

A regulação das enzimas antioxidantes pode ser influenciada pela gravidade do estresse. Se a atividade se perder, pode aumentar consideravelmente a produção de radicais livres que podem desencadear vários eventos, começando com a peroxidação de lipídios, com a degradação das membranas e a morte celular (Greggainset al., 2000). Por isso, o aumento da atividade CAT é importante para eliminar o acúmulo de H_2O_2 resultante da peroxidação lipídica (Eyidogan e Oz, 2007).

A atividade da SOD, para sementes criopreservadas com glicerol (10%), apresentou aumento linear ao longo do armazenamento, enquanto criopreservadas com DMSO (10 %) se ajustou ao modelo quadrático, e sua maior concentração foi observada aos 120 dias de armazenamento (Figura 7C).

A atividade de isoenzimas dos sistemas antioxidantes, como a SOD é importante, pois atua na defesa contra espécies reativas de oxigênio (EROSs) que podem causar danos celulares e afetar a qualidade das sementes (Deuner et al., 2011) Em sementes de *Araucaria angustifolia*, houve aumento significativo da atividade de todas as isoenzimas de SOD ao longo do armazenamento, indiferente das condições de temperatura (Araldi et al., 2016).

Alguns danos bioquímicos resultantes do armazenamento foram observados, mas a redução da viabilidade, aparentemente, não se deveu a falha nos mecanismos enzimáticos de proteção, que responderam prontamente, comprovado pelo incremento na atividade das enzimas SOD e CAT, especialmente quando se utilizou o crioprotetor DMSO.

Conclusão

O micro-ondas apresentou o melhor método de descongelamento, possivelmente por ter causado menos danos a membrana celular.

Sementes de *Sapindus saponaria* L. podem ser criopreservadas com teor de água 6 % (b.u.).

O uso de crioprotetores não é necessário na criopreservação de sementes de *S. saponaria*.

Referências Bibliográficas

- Aguiar, T.D.F.; Teixeira, M.F.S.; Teles, C.H.A.; Martins, G.R.; Júnior, R.Q.B.; Costa, E.C. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. *Acta Veterinaria Brasilica*, 2012.
- Araldi, C. G.; Coelho, C. M. C.; Gaziola, S. A.; Azevedo, R. A. Storage elicits a fast antioxidant enzyme activity in *Araucaria angustifolia* embryos. *Acta Physiol Plant*, 2016.
- Araújo, D. S.; Luz, P. B.; Neves, L. G.; Sobrinho, S. de P. Seed cryopreservation of *Passiflora* species. *Journal of Seed Science*, 2016.
- Ashmore S. E., Engelmann, F. Status Report on the Development and Application of In Vitro Techniques for the Conservation and Use of Plant Genetic Resources, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1997.
- Beauchamp, C.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytic Biochemic*, 1971.
- Bewley, J.D. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 1997.
- Bradford, M.N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem*, 1976.
- Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análises de sementes. Brasília: CLAV/DNDV/SNDA/MA, 2009.
- 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*, 1992
- Catão, H. C. R. M.; Gomes, L. A. A.; Guimarães, R. M.; Fonseca, P. H. F.; Caixeta, F.; Marodin, J. C. Physiological and isozyme alterations in lettuce seeds under different conditions and storage periods. *Journal of Seed Science*, 2016.
- Deuner, C.; Maia, M. de S.; Deuner, S.; Almeida, A. da S.; Meneghello, G.E. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. *Revista Brasileira de Sementes*, 2011.
- Engelmann, F & Takagi, H. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm, Japan International Research Center for Agricultural Sciences/ International Plant Genetic Resources Institute, 2000.
- Engelmann, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*, 2011
- Eyidogan, F.; Oz, M.T. Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. *Acta Physiology Plant*, 2007.

- Ferrari, E. A. P.; Colombo, R. C.; Faria, R. T. de; Takane, R. J. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. *Revista Ciência Agronômica*, 2016.
- Ferreira, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, 2011.
- Flachslan, E.; Terada, G.; Scocchi, A.; Rey, H.; Mroginski1, L.; Engelmann, F. Cryopreservation of Seeds and in Vitro-Cultured Protocorms of *Oncidium Bifolium* Sims. (Orchidaceae) by Encapsulation-Dehydration, Royal Veterinary College, 2006.
- Galdiano Jr.; R.F.; Lemos, E.G.M.; Fariab, R.T.; Vendrame, W.A. Cryopreservation of Dendrobium hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. *Scientia Horticulturae*, 2012.
- Galdiano Junior, R.F.; Lemos, E.G.M.; Faria, R.T.; Vendrame, W.A. Cryopreservation of Dendrobium hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. *Scientia Horticulturae*, 2012.
- Giannopolitis, C.N.; Ries, S.K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*, 1977.
- Gonzalez, R.A.F. Efeito da criopreservação usando técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino. Pirassununga: RAF, 2004.
- Greggains, V.; Finch-Savage, W.E.; Quick, W.P.; Atherton, N.M. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. *New Phytologist*, 2000.
- Grisi, P.U.; Gualtieri, S.C.J.; Ranal, M.A.; Santana, D.G. Influência alelopática do extrato aquoso de raiz de *Sapindus saponaria* L. sobre capim arroz e corda-de-viola. *Bioscience Journal*, Uberlândia, 2013.
- Higa, T.C.; Paulilo, M.T.S; Benson, E.E; Pedrotti, E.; Viana, A.M. Developing seed cryobank strategies for *Tabebuia heptaphylla* (Bignoniaceae), a hardwood tree of the Brazilian South Atlantic Forest. *Cryo Lett*, 2011.
- Hosomi, S.T.; Custodio, C.C.; Seaton, P.T.; Marks, T.R.; Machado-Neto, N.B. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 2012.
- Huehneab, P. S.; Bhinijaa, K. Application of cryoprotectants to improve low temperature storage survival of orchid seeds. *Scientia Horticulturae*, 2012.

- Kar, M.; Mishra, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol*, 1976.
- Lambardi, M.; De Carlo, A.; Biricolti, S.; Puglia, A.M.; Lombardo, G.; Siragusa, M.; De Pasquale, F. Zygotic and nucellar embryo survival following dehydration/cryopreservation of Citrus intact seeds. *CryoLetters*, 2004.
- Lorenzi, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. Nova Odessa: *Plantarum*, 2002.
- Marcos Filho, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ, 2015.
- Martínez-Montero, M.E.; Mora, N.; Quiñones, J.; González-Arno, M.T.; Engelmann, F.; Lorenzo, J.C. Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane (*Saccharum sp.*) embryogenic calluses. *CryoLetters*, 2002.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002.
- Molina, T.F.; Tillmann, M.A.A.; Dode, L.B.; Viegas, J. Crioconservação em sementes de cebola. *Revista Brasileira de Sementes*, 2006.
- Møller, I.M.; Jensen, P.E.; Hansson, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2007.
- Mullen, S.F.; Crister, J.K. The Science of Cryobiology. In: Woodruff, T.K. & Snyder, K.A. (Eds). *Oncofertility: Fertility preservation for cancer survivors*. New York: Springer, 2007.
- Nakagawa, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: Krzyzanowski, F. C., Vieira, R. D., & Franca Neto, J. B. (Ed.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, 1999.
- Oliveira, L. M.; Bruno, R.L.A.; Silva, K.R.G.; Silva, V.D.M.; Ferarri, C.S.; Silva, G.Z. Germinação e vigor de sementes de *Sapindus saponaria* L. submetidas a tratamentos pré-germinativos, temperaturas e substratos. *Ciência Rural*, Santa Maria, 2012.
- Oracz, K.; El-Maarouf Bouteau, H.; Farrant, J.M., Cooper, K.; Belghazi, M.; Job, C.; Job D.; Corbineau, F.; Bailly, C. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *The Plant Journal*, 2009.
- Porto, J. M. P.; Paiva, R.; Campos, N. A.; Reis, M. V.; Souza, A. C.; Santos, P. A.; Braga, F. T., Cryopreservation of seeds of barbatimão with different water contentes. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2014
- Salomão, A.N. Respostas de sementes de espécies tropicais a exposição ao nitrogênio líquido. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Piracicaba, 2002.

- Silva, L. A.; Sales, J. de F.; Silva, F. G.; Ferreira, P. H. C. M., Cryopreservation of achenes of caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz). African Journal of Biotechnology, 2013.
- Silva, V.F.; Sales, J.F.; Silva, F.G.; Campos, R.C.; Branquinho, A.C.; Silva, V.A. Cryopreservation of quina seeds (*Strychnos pseudoquina* A. St. Hil). Int. Res. J. Biotechnol, 2012.
- Silva, V.F.; Sales, J.F.; Silva, F.G.; Campos, R.C.; Branquinho, A.C.; Silva, V.A. Cryopreservation of quina seeds (*Strychnos pseudoquina* A. St. Hil). Int. Res. J. Biotechnol, 2012.
- Stanwood, P.C.; Ross, E.E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). Horticultural Science, 1979.
- Stegani, V.; Alves, G. A. C.; Bertoncelli, D. J.; Faria, R. T. Criopreservação de sementes de rainha do abismo (*Sinningia leucotricha*). Ornamental Horticulture, 2017.
- Suzuki, T.; Kami, D.; Oosawa, K.; McGann, L.E. Cryoprotection in plant tissues related to reduced volume expansion of cryoprotectant solution. CryoLetters, 2005.
- Tatiana Fuentes Molina, Maria Ângela André Tillmann, Luciana Bicca Dode, Judith Viégas, Criopreservação em Sementes de Cebola, Revista Brasileira de Sementes, 2006.
- Tsuzuki, K. J., Svidzinski, T. I. E., Shinobu, C. S., Silva, L. F. A., Cortez, D. A. G., Ferreira, I. C. P. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*,

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escarificação de sementes de *S.saponaria* com ácido sulfúrico concentrado por 90 min proporcionou maior velocidade e percentual de emergência em relação aos demais tratamentos, não acarretando danos anatômicos. Tratamentos pré-germinativos, com uso de estresse por alta ou baixa temperatura, podem provocar danos celulares na região do endosperma de sementes de *Sapindus saponaria* L.

A condução do teste de germinação de sementes de *Sapindus saponaria* L. em substrato papel a 30°C apresentou maior porcentagem de germinação.

Sementes de *Sapindus saponaria* L. mantêm suas qualidades fisiológicas e vigor ao longo do armazenamento por um período de 9 meses, indiferente das temperaturas avaliadas (10°C, 20°C e 25°C).

Sementes de *Sapindus saponaria* L. podem ser criopreservadas, sendo que nesse estudo o teor de água 6% (b.u.) demonstrou ser o melhor teor para sua criopreservação.

O micro-ondas apresentou o melhor método de descongelamento, possivelmente por ter causado menos danos a membrana celular.

Para criopreservação de sementes de *Sapindus saponaria* L. parece não ser necessário o uso de soluções de crioprotetores, porém, pela complexidade da avaliação dessas variáveis, faz-se necessário mais estudos para essa espécie.