

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

LISANDRO TOMAS DA SILVA BONOME

2006

LISANDRO TOMAS DA SILVA BONOME

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

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração
em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de
“Doutor”.

Orientador

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Bonome, Lisandro Tomas da Silva

Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss.) Müell.-Arg.] durante o armazenamento / Lisandro Tomas da Silva Bonome. -- Lavras : UFLA, 2006.

124 p. : il.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Seringueira. 2. Semente. 3. Armazenamento. 4. Alterações fisiológicas. 5. Alterações bioquímicas. 6. Alterações moleculares. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.8952

LISANDRO TOMAS DA SILVA BONOME

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

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração
em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de
“Doutor”.

APROVADA em 17 de novembro de 2006

Dr. Paulo de Souza Gonçalves	IAC
Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva	UFLA
Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho	UFLA
Prof. Dr. Nelson Delú Filho	UNINCOR

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Rolando Bonome e Sônia de Oliveira,

pela confiança, amor e carinho;

A minha irmã Dulcinéia Bonome,

pela amizade e carinho;

OFEREÇO

À minha querida esposa Ceyça e minha filha Nicolle;

Pelo amor, carinho, incentivo e amizade;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Biologia/Setor de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira, orientador, e ao Dr. Renato Mendes Guimarães, co-orientador, pela disponibilização dos seus conhecimentos na condução deste trabalho.

Às professoras Édila Vilela de Resende Von Pinho e Maria Laene Moreira de Carvalho pela disponibilização dos laboratórios de Análise de Sementes e de Técnicas Moleculares para a condução da pesquisa e pelas sugestões.

Aos estagiários, Marcelo Patto, Jorge Olavo e Flavia Fernandez, pela laboriosa tarefa que contribuiu para a realização deste trabalho.

A todos os funcionários, estagiários, bolsistas e alunos do Setor de Fisiologia Vegetal, pelo agradável ambiente de trabalho.

A todos os amigos e colegas do curso de Pós-Graduação, pelas sugestões e apoio moral.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Tolerância à dessecação em sementes	3
2.2 Longevidade e armazenamento de sementes	5
2.3 Deterioração de sementes – Aspectos fisiológicos e bioquímicos.....	9
2.3.1 Integridade de membranas	10
2.3.2 Carboidratos.....	12
2.3.3 Lipídios	15
2.3.4 Proteínas	17
2.3.5 Alterações enzimáticas associadas à deterioração de sementes.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Aquisição e tratamento das sementes	25
3.2 Determinação do grau de umidade das sementes	26
3.3 Avaliações fisiológicas	26
3.3.1 Teste de emergência de plântulas, primeira contagem e índice de velocidade de emergência	26
3.3.2 Condutividade elétrica	27
3.3.3 Delineamento experimental e procedimento estatístico.....	28
3.4 Avaliações bioquímicas e ultra-estruturais	28
3.4.1 Preparo do material para as análises bioquímicas.....	28
3.4.1.1 Extração e quantificação de amido	29
3.4.1.2 Extração e quantificação de lipídios	30
3.4.1.3 Quantificação de açúcares solúveis, açúcares redutores e aminoácidos	30
3.4.1.4 Fracionamento de proteínas	30
3.4.1.5 Peroxidação de lipídios.....	31
3.4.1.6 Delineamento experimental e procedimento estatístico.....	31
3.4.2 Análise histoquímica.....	32

3.4.3	Preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	32
3.5	Avaliações moleculares	33
3.5.1	Preparo do material para análise eletroforética.....	33
3.5.1.1	Extração de isoenzimas e análise eletroforética.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Grau de umidade das sementes	35
4.2	Avaliações fisiológicas	36
4.2.1	Emergência de plântulas	36
4.2.2	Índice de velocidade de emergência de plântulas	40
4.2.3	Primeira contagem	42
4.2.4	Condutividade elétrica	44
4.3	Avaliações bioquímicas e ultra-estruturais	48
4.3.1	Amido	48
4.3.2	Açúcares solúveis totais (AST).....	51
4.3.3	Açúcares redutores (AR)	57
4.3.4	Lipídios	64
4.3.5	Peroxidação de lipídios	74
4.3.6	Proteínas	76
4.3.7	Aminoácidos	86
4.4	Avaliações moleculares	89
5	CONCLUSÕES	101
5.1	Avaliações fisiológicas	101
5.2	Avaliações bioquímicas e ultra-estruturais	101
5.3	Avaliações moleculares	102
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
	ANEXOS.....	121

RESUMO

BONOME, Lisandro Tomas da Silva. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.DC.) Müell.-Arg.] durante o armazenamento.** 2006. 124p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A dificuldade de armazenamento das sementes de seringueira é um dos principais entraves para a produção de mudas em escala comercial nas regiões “escape”, regiões essas com condições de baixa temperatura e umidade relativa, não favoráveis ao desenvolvimento do fungo *Microcyclus ulei* causador do Mal das folhas da seringueira. Estudos sobre as alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira durante o armazenamento podem elucidar as causas da rápida perda da viabilidade dessas sementes, mesmo quando colocadas em condições ideais para a sua conservação. A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas do Departamento de Biologia em conjunto com os Laboratórios de Análise de Sementes e de Técnicas Moleculares do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, com o objetivo de avaliar e relacionar as modificações fisiológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem em sementes de seringueira acondicionadas em embalagem impermeável, tratadas ou não com os fungicidas Tecto 600 (65g/100Kg semente) e Captan (135g/100kg sementes) em dois ambientes (câmara fria a 10°C e condição ambiente \pm 20°C), por um período de 210 dias de armazenamento. Em diferentes períodos do armazenamento, as sementes foram submetidas a determinações de características fisiológicas, celulares por microscopia ótica e eletrônica de varredura, bioquímicas e moleculares. As melhores condições para a conservação das sementes de seringueira foram à temperatura ambiente sem tratamento fungicida. O tratamento fungicida teve efeito fitotóxico sobre as sementes. A temperatura de 10°C também foi prejudicial ao armazenamento das sementes de seringueira, causando danos mais severos à sua qualidade fisiológica do que o tratamento fungicida. A associação entre o tratamento fungicida e a baixa temperatura de armazenamento foi potencialmente mais danosa à preservação das sementes do que os fatores utilizados isoladamente. Alterações significativas ocorreram no conteúdo de amido, de açúcares solúveis

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira - UFLA (Orientador), Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA (Co-orientador).

e redutores, de proteínas e de aminoácidos tanto no embrião quanto no endosperma das sementes de seringueira no decorrer do período de armazenamento, independentemente se tratadas ou não com fungicidas e das condições de ambiente. No embrião ocorreu biossíntese de lipídios durante o armazenamento, provavelmente, para a finalização de sua maturação. Já no endosperma, foi observado degradação de lipídios no decorrer do armazenamento. Foi notada ainda, a ocorrência de peroxidação de lipídios nos primeiros meses do armazenamento, principalmente, quando as sementes foram acondicionadas à baixa temperatura. Variações no perfil eletroforético de isoenzimas estão associadas ao processo deteriorativo de sementes de seringueira. As enzimas álcool desidrogenase, esterase, glutamato-oxalacetato trasaminase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase revelaram-se como indicadores promissores para a avaliação da deterioração de sementes de seringueira. (Projeto parcialmente financiado pelo CNPq).

ABSTRACT

BONOME, Lisandro Tomas da Silva. **Physiological, biochemical and molecular alterations in rubber seeds [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Müell.-Arg.] during storage.** 2006. 124p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*

The difficulty of storing rubber seeds is one of the main hindrances to seedling production in a commercial scale in the "escape" regions, which are regions of low temperature and relative humidity not favorable to the development of the *Microcyclus ulei* causer of the South American leaf blight. Studies about the physiological, biochemical and molecular alterations in rubber seedlings during storage can elucidate the causes of the fast loss of viability of those seeds, even when placed in conditions ideal to their conservation. The present research was developed in the Plant Nutrition and Metabolism Laboratory in the Biology Department jointly with the Laboratories of Seed Analysis and Molecular Techniques of the Agriculture Department of the Federal University of Lavras, with the objective of evaluate and relating the modifications occurring in rubber seeds packed in waterproof package, treated or not with fungicides Tecto 600 (65g/100Kg seed) and Captan (135g/100kg seeds) in two settings (cold chamber at 10°C and room condition \pm 20°C), for a 210-day period of storage. In different periods of storage, the seeds were submitted to determinations of physiological characteristics, cell characteristics by light and scanning electron microscopy, biochemical and molecular characteristics. The best conditions for rubber seed keeping were at room temperature without any fungicide treatment. The fungicide treatment had a phytotoxic effect upon the seeds. The temperature of 10°C was also harmful to the storage of the rubber seeds causing more severe damages to their physiological quality. The association between the fungicide treatment and low temperature of storage was potentially more harmful to the preservation of seeds than the factors utilized singly. Significant alterations took place in the content of starch, soluble and reducing sugars, proteins and aminoacids both in the embryo and in the endosperm of the rubber seeds over storage, independent if treated or not with fungicides of the environmental conditions. In the embryo biosynthesis of lipids occurred over the storage, likely from the finishing of its maturation. But in the endosperm, degradation of lipids was observed over the storage. The

* Guidance Committee: Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira – UFLA (Adviser), Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA (Co-Adviser).

occurrence of lipid peroxidation was still noticed in the first months of storage, chiefly when the seeds were packed at low temperature. Variations in the electrophoresis profile of isoenzymes are associated with the deteriorative process of rubber seeds. The enzymes alcohol dehydrogenase, esterase, glutamate-oxaloacetate transaminase, superoxide dismutase, catalase and peroxidase revealed themselves as promising indicators for the evaluation of rubber seed deterioration. (Project partially supported by CNPq).

1 INTRODUÇÃO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Müell.-Arg.] é uma planta pertencente à família Euphorbiaceae, nativa da região amazônica, amplamente conhecida por sua capacidade de produção de látex, do qual se extrai a borracha natural.

Atualmente, a borracha natural é um artigo onipresente na vida dos seres humanos, com mais de 50 mil itens produzidos com base em sua exploração. Devido à importância da borracha, a grande maioria das pesquisas envolvendo seringueira destina-se à produção de látex, sendo dada pouca atenção às outras partes da planta, inclusive as sementes.

Entretanto, a implantação da heveicultura é altamente dependente de sementes, visto que, atualmente, essa cultura é propagada quase exclusivamente por enxertia, sendo suas sementes indispensáveis para a produção dos porta-enxertos. Dessa maneira, a disponibilidade de sementes em qualidade e quantidade adequada é de fundamental importância para exploração econômica dessa cultura.

A característica recalcitrante dessas sementes faz com que elas percam, rapidamente, o poder germinativo, principalmente quando o seu teor de água é reduzido a valores inferiores a 30% (Cícero, 1986). Esse fato dificulta severamente seu armazenamento, inviabilizando a instalação de viveiros, nas regiões “escape” (regiões com condições ambientais – baixa temperatura e umidade relativa – não favoráveis ao desenvolvimento do fungo *Microcyclus ulei* causador do mal das folhas da seringueira), em época adequada ao desenvolvimento das plântulas, gerando restrição de oferta de mudas em determinadas épocas do ano, ou tornando-as disponíveis em épocas inadequadas ao plantio.

A curta longevidade das sementes pode ser ainda, um enorme entrave aos avanços tecnológicos da cultura, devido à dificuldade para realização de programas de melhoramento genético, bem como, o desenvolvimento de pesquisas que envolvam esse tipo de sementes. Com isso, tem crescido a demanda de estudos pelos quais se pretende identificar as melhores condições de armazenamento das sementes dessa espécie, tendo em vista a conservação da sua qualidade fisiológica por um maior período de tempo. Entretanto, esses estudos, embora importantes, têm por finalidade apenas a busca de alternativas para minimizar os efeitos da recalitrância e não a de elucidar as causas da rápida perda de viabilidade de sementes com essas características. Para isso, torna-se necessária também, a investigação dos eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem nas sementes durante o seu envelhecimento.

A deterioração das sementes durante o armazenamento é um processo inevitável e irreversível, com sua exata causa ainda desconhecida. Portanto, estudos acerca dos eventos fisiológicos, bioquímicos e moleculares que ocorrem nas sementes de seringueira durante o armazenamento podem fornecer importantes informações sobre as causas da rápida perda de sua viabilidade.

Com esse trabalho, teve-se por objetivo estabelecer as melhores condições para a conservação das sementes de seringueira, bem como, avaliar e relacionar as alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem durante o seu armazenamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tolerância à dessecação em sementes

Na maioria das espécies vegetais de importância econômica, a viabilidade e o vigor das sementes podem ser conservados pela redução do seu teor de água e da temperatura do ambiente de armazenamento. Essas sementes são denominadas ortodoxas, tolerando a dessecação pós-colheita a graus de umidade próximos de 2% a 5%. Em contraste, existem espécies vegetais cujas sementes além de não tolerarem baixas temperaturas, não podem sofrer secagem durante e após o seu desenvolvimento e maturação. O conteúdo de água deve permanecer alto durante todo o seu desenvolvimento até a germinação, o que dificulta a sua conservação por períodos prolongados. Esse grupo de sementes é chamado de recalcitrantes, não tolerando dessecação a graus de umidade entre 15% e 20% (Hong & Ellis, 1996; Roberts, 1973). Fazem parte desse grupo sementes de muitas espécies de gramíneas aquáticas, árvores tropicais como canela amarela, maçaranduba e seringueira, bem como algumas espécies de clima temperado, como o carvalho.

Embora essa separação entre sementes ortodoxas e recalcitrantes seja uma classificação clássica, nos últimos anos ela vem sofrendo uma série de questionamentos. Para alguns pesquisadores, tanto as espécies de sementes classificadas como ortodoxas quanto as recalcitrantes podem apresentar diferentes níveis de tolerância à dessecação. Assim, surgiu na década de 90 uma terceira categoria denominada de intermediária, que compreende sementes que podem resistir à desidratação até certo nível, mas tem sua armazenabilidade reduzida. De acordo com Hong & Ellis (1995), sementes dessa categoria toleram dessecação a graus de umidade em torno de 10% a 13%, reduzindo sua viabilidade a valores inferiores. Além dessa classificação, uma outra tem sido

sugerida para sementes recalcitrantes que, em função da variabilidade na sensibilidade à dessecação, associada a outras características das sementes, podem ser divididas em “altamente”, “moderadamente” e “minimamente” recalcitrantes (Farrant et al., 1988).

Sementes recalcitrantes, quando são colhidas e a seguir desidratadas, têm sua viabilidade reduzida à medida que a umidade é perdida, no princípio vagarosamente, mas aumenta consideravelmente a partir de um determinado conteúdo de umidade, denominado "teor de água crítico". A continuação da desidratação a partir desse ponto conduz à perda total da viabilidade das sementes. De acordo com Berjak & Pammenter (2003), a perda de viabilidade de sementes recalcitrantes na desidratação é atribuída a duas causas principais: (1) como consequência do metabolismo desequilibrado durante a desidratação das sementes e; (2) dano por desidratação quando a água é essencial para a integridade de estruturas intracelulares.

O teor de água crítico, abaixo do qual as sementes perdem rapidamente seu poder germinativo e o grau de umidade mais adequado à conservação das sementes de seringueira ainda não foram devidamente definidos, em virtude da carência de estudos com sementes dessa espécie, bem como, devido às divergências entre os resultados obtidos nas pesquisas já existentes. Segundo Chin et al. (1981), as sementes de seringueira perdem rapidamente o poder germinativo, principalmente, quando seu teor de água é reduzido a valores inferiores a 20%. Já para Cícero et al. (1986), grau de umidade em torno de 30% é tido como mínimo para manter a viabilidade das sementes dessa espécie por período prolongado.

2.2 Longevidade e armazenamento de sementes

A longevidade corresponde ao período em que a semente se mantém viva sendo capaz de germinar quando colocada em condições favoráveis, se não for dormente (Toledo & Marcos Filho, 1977). Em uma das primeiras classificações quanto à longevidade, Ewart (1908), citado por Hong & Ellis (2003), dividiu as sementes em três categorias: microbióticas (longevidade inferior a 3 anos), a qual inclui todas as recalcitrantes, mesobióticas (longevidade entre 3 e 15 anos), como a maioria das espécies cultivadas e macrobióticas (longevidade superior a 15 anos), como sorgo, aveia, trigo, milho e fumo. Entretanto, a classificação de Ewart só é aplicável a condições naturais, porque em condições artificiais, a maioria das sementes, quando retiradas do ambiente natural, tem sua fisiologia alterada e pode ter seu período de vida ampliado ou reduzido dependendo da espécie e das condições de armazenamento (Kramer & Kozlowski, 1972).

A curta longevidade das sementes recalcitrantes restringe o período de sua utilização, sendo necessária a semeadura imediatamente após o seu desprendimento da planta-mãe (Stubsgaard, 1990). Esta característica acarreta grandes prejuízos a algumas espécies de interesse econômico, pois além de impossibilitar a instalação de viveiros em épocas apropriadas para a germinação das sementes e o desenvolvimento das mudas, essa limitação pode restringir a oferta de mudas em determinadas épocas do ano.

O armazenamento de sementes constitui-se em um conjunto de procedimentos voltados à preservação de sua qualidade, no intuito de proporcionar-lhes um ambiente nos quais as mudanças fisiológicas e bioquímicas sejam mantidas em um nível aceitável, evitando perdas desnecessárias tanto no aspecto qualitativo como no quantitativo. No entanto, vale ressaltar que o processo de deterioração das sementes é inevitável, mesmo

quando colocadas em ambientes adequados a sua preservação. A qualidade das sementes não melhora durante o armazenamento, portanto, sua qualidade inicial é de fundamental importância para a manutenção da germinação e do vigor. De acordo com Popinigis (1985), a longevidade das sementes é fundamentalmente uma característica genética. Dessa maneira, somente a qualidade inicial das sementes e as condições do ambiente de armazenamento podem ser manipuladas.

As alterações observadas nas sementes durante o armazenamento variam em função dos fatores que afetam sua conservação, tais como: a temperatura, a umidade relativa do ar, o grau de umidade das sementes e o tipo de embalagem utilizada (Carneiro & Aguiar, 1991). O grau de importância desses fatores no armazenamento e suas interações são prioritários para o entendimento das exigências da espécie quanto à manutenção de sua viabilidade.

Em relação à temperatura, Probert & Smith (1996) verificaram que sementes recalcitrantes de espécies de clima temperado, como o carvalho (*Quercus robur*), podem ser mantidas em temperaturas próximas de zero grau Celsius. De acordo com os autores, com esse procedimento, permite-se a manutenção de sua viabilidade por 2 a 3 anos. Por outro lado, o mesmo procedimento não é verdadeiro para a maioria das sementes recalcitrantes tropicais, uma vez que são danificadas pelo frio e não podem ser armazenadas em temperaturas abaixo de 15-20°C.

O que se observa na literatura é que os resultados de pesquisas obtidos a respeito da conservação de sementes recalcitrantes são muito contraditórios. Segundo Ferraz & Sampaio (1996), sementes de andiroba, espécie de comportamento recalcitrante, não toleram condições de baixas temperaturas (6°C ± 4°C). Semelhantemente a esse resultado, temperaturas iguais ou inferiores a 15°C não foram favoráveis ao armazenamento de sementes de pupunha (Villalobos et al., 1992), de mangueira (Fu et al., 1990) e de cacau (Hor

et al., 1984). Por outro lado, sementes de abacate e de pitanga toleram temperaturas de 3°C a 4°C e as de *Inga edulis*, temperaturas de 0°C (Bacchi, 1961).

Especificamente em relação a sementes de seringueira, resultados igualmente conflitantes são encontrados na literatura. Segundo Cícero et al. (1986), essas sementes não toleram temperaturas inferiores a 15°C. Similarmente, Pereira (1980) observou efeito negativo da baixa temperatura (10°C) sobre a viabilidade das sementes dessa espécie. No entanto, Paula et al. (1997), avaliando as modificações fisiológicas em sementes de seringueira durante o armazenamento, verificaram que a condição de baixa temperatura, 5°C, foi mais eficiente em prolongar a viabilidade dessas sementes, quando comparado à temperatura de 20°C. De acordo com os autores, as sementes armazenadas a 20°C apresentaram queda acentuada na germinação, aos 15 dias, e apenas 10% mostraram-se germináveis aos 30 dias. Por outro lado, as sementes armazenadas a 5°C mantiveram-se com 47 % de germinação até 90 dias de armazenamento.

Além da temperatura, outro aspecto que deve ser levado em consideração durante o armazenamento é o grau de umidade das sementes, que está diretamente associado à umidade relativa do ar e ao tipo de embalagem utilizada. No caso de espécies recalcitrantes, sabe-se que elas não toleram a dessecação e, portanto, devem ser armazenadas com altos teores de água. Dessa maneira, a embalagem utilizada no armazenamento exerce importante papel na manutenção da viabilidade das sementes, sendo sua escolha relacionada diretamente com a umidade relativa do ar sob a qual as sementes ficarão armazenadas.

Embalagem permeável e semipermeável ao vapor de água é utilizada quando o ambiente de armazenamento das sementes é saturado de umidade. Segundo Pereira (1980), tais embalagens, quando utilizadas em ambiente sem o

controle da umidade, são prejudiciais ao armazenamento de sementes de seringueira. De acordo com o autor, a sua permeabilidade permite a perda de água das sementes, comprometendo o seu poder germinativo em poucos dias. Assim, nesse caso, há a necessidade de utilização de embalagem impermeável, visando a eliminar a influência da umidade relativa do ar externo no ambiente interno e, por conseguinte, as alterações no teor de água das sementes. No entanto, quando as sementes são armazenadas com alta umidade e acondicionadas nesse tipo de embalagem, é recomendável a abertura de pequenos orifícios, 1mm de diâmetro, para permitir o fluxo de oxigênio dentro da embalagem (Pereira, 1980). De acordo com Ibrahim & Roberts (1983), embora a deterioração progrida com a elevação do grau de umidade das sementes, os mecanismos celulares funcionais de reparo são mantidos pelo metabolismo aeróbico.

Em virtude da sensibilidade à dessecação, as sementes recalcitrantes vêm sendo armazenadas com altos teores de água, o que favorece a incidência de microrganismos. De acordo com Goldbach (1979), a ocorrência de fungos constitui um dos principais fatores prejudiciais à conservação de sementes recalcitrantes. Esses patógenos são capazes de penetrar nas sementes durante o seu desenvolvimento, maturação, colheita e pós-colheita, principalmente quando armazenadas em condições desfavoráveis. Após invadirem as sementes, a maioria dos patógenos vive em associação ou dentro dos protoplastos celulares, onde se encontram os conteúdos celulares, como citoplasma e núcleo. Esses patógenos nutrem-se desses conteúdos, que são ricos em pequenas moléculas como açúcares e aminoácidos. Outros constituintes celulares, como proteínas e ácidos graxos só podem ser utilizados quando clivados em moléculas menores pelo aumento da atividade de proteases e lípases durante a deterioração, aumentando o processo metabólico das sementes (Abdul-Baki & Anderson,

1972), ou após sua degradação por enzimas secretadas pelo próprio patógeno (Carvalho & Von Pinho, 1997).

Uma alternativa para diminuir a incidência de microrganismos é a utilização de baixas temperaturas durante o armazenamento. No entanto, esse procedimento pode afetar negativamente a viabilidade da maioria das sementes recalcitrantes de espécies tropicais (Probert & Smith, 1996). Outra opção tem sido a aplicação de fungicidas, a qual tem proporcionado resultados satisfatórios em sementes recalcitrantes de algumas espécies como: tangerina-cleópatra e limão-cravo (Bonome & Von Pinho, 1999) e cacau (Figueiredo, 1986). Por outro lado, sementes de outras espécies podem apresentar maior sensibilidade à fitotoxicidade de fungicidas, como observado em sementes de *Citromelo swingle* por Bonome & Von Pinho (1999) e sementes de seringueira tratadas com Benlate e Thiran (Garcia & Vieira, 1994), Benlate e Captan (Cícero et al., 1986) e Benlate (Cícero et al., 1987).

2.3 Deterioração de sementes – Aspectos fisiológicos e bioquímicos

A deterioração ou envelhecimento de sementes envolve uma seqüência de eventos bioquímicos e fisiológicos, que levam a um progressivo declínio na sua qualidade e, finalmente, à perda da viabilidade. De acordo com Delouche & Baskin (1973), a deterioração é caracterizada como um processo inevitável e irreversível, mas que pode ser retardada por meio de práticas que conduzem a um ótimo armazenamento. Os mesmos autores consideram que a seqüência provável de eventos, durante a deterioração, envolve a degeneração das membranas celulares, a redução das atividades respiratórias e biossintéticas, o retardamento da germinação, a redução do potencial de armazenamento, o retardamento do crescimento e do desenvolvimento de plântulas, a desuniformidade na germinação e na velocidade de germinação, o aumento na sensibilidade a adversidades ambientais, a redução da emergência de plântulas

no campo, o aumento da ocorrência de plântulas anormais, culminando com a perda do poder germinativo e a morte.

Segundo Krzyzanowski et al. (1999), qualquer evento que precede a perda do poder germinativo pode ser considerado uma avaliação do vigor e, portanto, um indicativo da deterioração. Sendo assim, os testes de vigor são de fundamental importância para avaliação da qualidade fisiológica das sementes, uma vez que fornecem índices mais sensíveis que o teste de germinação.

2.3.1 Integridade de membranas

A deterioração das sementes é um processo degenerativo contínuo, que se inicia logo após a maturidade fisiológica e continua até sua morte ou incapacidade de germinar. Segundo Delouche & Baskin (1973), a primeira alteração bioquímica do processo de deterioração é a desestruturação das membranas, portanto testes que avaliam a integridade das membranas são bons indicadores do processo de deterioração e, conseqüentemente, do vigor das sementes (Krzyzanowski et al., 1999).

Entre os testes que avaliam a integridade das membranas celulares o de condutividade elétrica tem se destacado por ser eficiente, rápido e prático. Esse teste baseia-se no valor da condutividade elétrica, medido em função da quantidade de lixiviado na solução de embebição das sementes, em consequência do aumento da permeabilidade das membranas celulares à medida que a semente deteriora (AOSA, 1983).

O processo de embebição pode alterar as membranas celulares das sementes. Quando a semente é colocada para embeber a sua capacidade de reorganização das membranas, bem como de reparo de certos danos, físicos e/ou biológicos, que podem ter ocorrido durante o processo de produção, irá influenciar significativamente na quantidade de lixiviados que serão liberados da semente (Hampton & Tekrony, 1995). Assim, quanto maior a velocidade com

que a semente é capaz de restabelecer a integridade das membranas celulares, menor será a quantidade de lixiviados liberados para o meio externo. Dessa maneira, quanto menor o valor da condutividade elétrica da solução de embebição das sementes, menor será sua deterioração (AOSA, 1983; Hampton & Tekrony, 1995).

De acordo com a AOSA (1983), diversos compostos orgânicos (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e proteínas) e inorgânicos (íons fosfatos, Ca^{++} , H^+ , Mg^{++} e Na^+) são lixiviados quando as sementes são colocadas em solução de embebição, sendo a quantidade e o tipo de lixiviados na solução os determinantes no valor da condutividade elétrica. Com relação à lixiviação de aminoácidos associada à deterioração de sementes, Keys (1982) verificou correlação direta entre baixos níveis de aminoácidos na solução de embebição e sementes viáveis. A esse respeito, Taylor et al. (1995) consideram que nessas sementes os aminoácidos estão compartimentalizados e disponíveis para o metabolismo. Por outro lado, em sementes não viáveis, a hidrólise de proteínas, em consequência do aumento da atividade enzimática, resultaria numa maior quantidade de aminoácidos livres, que durante a embebição seriam lixiviados devido à degradação das membranas celulares.

Em pesquisas realizadas com sementes de diversas espécies como: algodão (Santos, 1993), milho (Bruggink et al., 1991) e soja (Loeffler et al., 1988), têm sido observado que o decréscimo na germinação e no vigor é diretamente proporcional ao aumento da liberação de solutos na solução de embebição das sementes, indicando que a avaliação da condutividade elétrica é eficiente para a determinação da deterioração. Ming et al. (1995), trabalhando com sementes de repolho (*Brassica oleracea*) verificaram correlação significativa entre o teste de condutividade elétrica e o teste de emergência em campo. Entretanto, o mesmo teste não foi eficiente para diferenciar lotes de sementes de mamona com diferente qualidade fisiológica (Fonseca et al., 2004).

De acordo com os autores, tal fato é justificado pela resistência à entrada de água imposta pelo tegumento das sementes dessa espécie, não permitindo assim, a lixiviação de solutos e interferindo nos resultados do teste. Por outro lado, Paula (1997) recomenda a utilização do teste de condutividade elétrica como indicador da qualidade fisiológica de sementes de seringueira. Espécie essa que pertence à mesma família da mamona, ambas *euphorbiaceae*, cujas sementes apresentam características muito semelhantes, inclusive o tegumento duro. No entanto, a autora utilizou sementes sem tegumento para conduzir o teste.

2.3.2 Carboidratos

As sementes são constituídas de substâncias estruturais, como os oligossacarídeos e os polissacarídeos das paredes celulares, e de substâncias de reserva, como proteínas, lipídios e carboidratos (Begnami, 1998). Os carboidratos são uns dos principais constituintes da maioria das sementes, sendo o amido, o carboidrato presente em maior quantidade. Entretanto, em sementes de seringueira, Paula (1997) verificou que o amido é pouco expressivo, contribuindo com menos de 0,1% do peso seco das sementes. Alencar (2003) também verificou baixo teor de amido em sementes de seringueira, porém, esse valor foi aproximadamente 50 vezes superior ao observado por Paula (1997). De acordo com Bewley & Black (1994), em oleaginosas há acúmulo de amido no cotilédone durante o desenvolvimento das sementes. Entretanto, pouco amido permanece na semente porque esse carboidrato é mobilizado para fornecer esqueletos de carbono para a síntese de proteínas e de lipídios.

Além do amido, outros carboidratos estão presentes nas sementes em quantidades consideráveis, como os açúcares não redutores e os açúcares redutores. Os primeiros são de fundamental importância durante o desenvolvimento das sementes sendo considerados por diversos autores como os principais responsáveis pela aquisição da tolerância à dessecação (Leprince et

al., 1990a; Vertucci & Farrant, 1997). De acordo com Hottiyer et al. (1994), esses açúcares são eficientes em estabilizar macromoléculas e estrutura de membranas (Leprince et al., 1993), durante a dessecação. Por outro lado, alta concentração de açúcares redutores, como glicose, frutose, galactose e maltose nas sementes está associada à sua deterioração (Koster & Leopold, 1988).

Alterações no conteúdo de carboidrato são freqüentemente observadas durante o envelhecimento das sementes. Ovcharov & Koshelev, citados por Koster & Leopold (1988), estudando o armazenamento de sementes de *Zea mays*, verificaram o desaparecimento de açúcares como sacarose e rafinose e o aumento de outros, como glicose e frutose, quando essas sementes perderam a viabilidade. Similarmente, Zeleny (1954) observou redução no conteúdo de açúcares não redutores e aumento de açúcares redutores durante a deterioração de sementes. Segundo Murthy & Sun (2000), o aumento na concentração de açúcar redutor durante o armazenamento de sementes de *Vigna radiata* ocorre em decorrência da hidrólise de sacarose e oligossacarídeos. Para Edje & Burris (1970), esse declínio na quantidade de açúcares solúveis pode resultar numa limitada disponibilidade de substratos para a germinação. Outra possibilidade é que a diminuição de dissacarídeos pode resultar em um menor efeito protetor de açúcares sobre a integridade das membranas (Crowe et al., 1984), ou pode limitar a capacidade das sementes em manter o estado vítreo do citoplasma, um estado líquido com propriedades de viscosidade de um sólido, que não forma cristais mesmo em temperaturas muito baixas (Bruni & Leopold, 1991). Essa condição parece ser essencial para a tolerância à dessecação em sementes.

Por outro lado, a presença em grande quantidade de açúcares redutores pode causar alterações químicas em proteínas (Murthy & Sun 2000) e DNA (Lee & Cerami, 1989) por meio das reações de Amadori e Maillard. Essas reações consistem numa série de ligações entre açúcares redutores e proteínas ou ácidos nucléicos, sem a necessidade de ser mediada por uma enzima. Esse processo não

enzimático, ao contrário do enzimático, adiciona açúcares redutores desordenadamente a qualquer dos muitos sítios ao longo de qualquer cadeia peptídica disponível. Segundo Cerami (1987), a glicosilação não enzimática de certas proteínas desencadeia uma série de reações químicas que culminam na formação e eventual acúmulo de ligações irreversíveis entre moléculas de proteínas adjacentes. A reação se inicia quando um grupo aldeído do açúcar redutor se liga a um grupo amino da proteína ou do ácido nucléico. As moléculas se combinam formando o que é chamado de base de Schiff. Esta combinação é instável e rapidamente se rearranja, porém é reversível e produz uma substância conhecida como produto de Amadori. Com o envelhecimento, alguns desses produtos de Amadori se desidratam e se rearranjam, dando novas estruturas derivadas dos açúcares redutores, que podem combinar-se com vários tipos de moléculas para formarem produtos finais de estrutura irreversível que são nomeados produtos finais de glicosilação avançada. De acordo com Wettlaufer & Leopold (1991), essas reações contribuem com a deterioração das sementes, estimulam a respiração (Leprince e Vertucci, 1995) e aumentam a formação de radicais livres (Leprince et al., 1990b).

Murthy & Sun (2000) observaram uma forte correlação entre o acúmulo de produtos de Maillard e o incremento de glicose no eixo embrionário de sementes de *Vigna radiata* armazenadas. Porém, o acúmulo de produtos de Amadori foi mais fortemente correlacionado com a peroxidação de lipídios. Os autores associaram à perda da viabilidade das sementes dessa espécie as reações de Amadori e Maillard.

Por outro lado, Bernal-Lugo & Leopold (1992), estudando mudanças nas concentrações de carboidratos solúveis em embriões de sementes de milho durante o armazenamento, observaram que tanto a quantidade de rafinose quanto as dos monossacarídeos, glicose, frutose e galactose reduziram com o envelhecimento das sementes. Os autores associaram à queda na viabilidade das

sementes a participação desses açúcares nas reações de Amadori e Maillard. Em sementes de seringueira, Paula (1997) também observou uma diminuição na quantidade de açúcares redutores com o aumento do período de armazenamento. As sementes de seringueira por apresentarem caráter recalcitrante devem ser armazenadas com alto teor de água (Pereira, 1980). Segundo Wettlaufer & Leopold (1991), níveis mais altos de umidade favorecem as reações de Amadori e Maillard.

2.3.3 Lipídios

As sementes de seringueira possuem alto teor lipídico, 45-50% (Gonçalves et al., 1983; Ugwanyi e Njoku 1996), cujas características são de cor amarela, viscosa, com cheiro forte e semi-secante. Diversos autores relacionam expressivas modificações nas principais reservas das sementes quando estão em processo de deterioração. De acordo com Abdul-Baki & Anderson (1972), em sementes oleaginosas, uma das principais alterações associadas à deterioração é sua acidificação. Segundo os autores, a acidificação é responsável pelo aumento de ácidos graxos, de fosfatos ácidos e de aminoácidos, produzidos pela ação das lipases, das fitases e das proteases, respectivamente. Entre os três grupos, o maior e o mais rápido aumento ocorrem nos ácidos graxos (Smith & Berjak, 1995). De acordo com Abdul-Baki & Anderson (1972), quanto maior o grau de insaturação dos ácidos graxos maior será sua susceptibilidade a peroxidação.

Segundo Bewley & Black (1994), a peroxidação de lipídios inicia-se com a remoção de um hidrogênio de um grupo metil adjacente à dupla ligação de um ácido graxo insaturado, para produção de um radical livre. Este reage com o oxigênio molecular, resultando em um rearranjo na cadeia do ácido graxo, culminando com a formação de um radical peróxido, que, por sua vez, reage com outro ácido graxo insaturado, formando um hidroperóxido, o qual é instável e se degrada favorecendo a formação de novos radicais livres, perpetuando o

processo. Alternativamente a esse processo, a lipoxigenase, uma enzima presente em sementes, também é capaz de produzir oxigênio reativo, que por sua vez, catalisa a reação de peroxidação de lipídios utilizando como substrato os fosfolipídios da membrana (Wang et al., 1990).

Para Pukacka (1991), as alterações químicas nos ácidos graxos insaturados resultantes da peroxidação de lipídios afeta as propriedades estruturais e funcionais das membranas, aumentando sua permeabilidade. Essa parece ser uma das principais conseqüências dessa reação. Entretanto, Araújo (1995) relatou que a perda da viabilidade pode ocorrer ainda, como conseqüência da reação de Maillard, promovida pela interação dos compostos carbonílicos, formados na peroxidação, com aminoácidos e proteínas. Sung & Chiu (1995) verificaram um significativo aumento na concentração de malonaldeído em sementes de soja armazenadas, sugerindo um aumento na peroxidação de lipídios. Segundo Dahle et al. (1962), a produção de malonaldeído tem sido extremamente útil como indicador da oxidação de ácidos graxos insaturados. Sendo assim um bom indicador da deterioração de muitos alimentos (Schultz, 1962) e de sementes (Sung & Chiu, 1995).

Corbineau et al. (2002), estudando as causas da baixa viabilidade de sementes de girassol quando submetidas à alta temperatura (45°C), relataram que a perda da viabilidade está diretamente associada ao aumento na lixiviação de potássio e eletrólitos totais, bem como, com o aumento da produção de malonaldeído, sugerindo a baixa integridade das membranas devido à peroxidação de lipídios. Em outras pesquisas, tem-se evidenciado a participação da peroxidação de lipídios na deterioração de sementes de diversas espécies, como: algodão (Goel et al., 2003), soja (Stewart & Bewley, 1980) amendoeira (Zacheo et al., 2000) e *Shorea robusta* (Chaitanya & Naithani, 1994). De acordo com Hendry (1993), a peroxidação de lipídios é um dos principais responsáveis pela deterioração de sementes.

Embora a peroxidação de lipídios seja indicada como uma das principais causas da deterioração de sementes em muitas pesquisas evidenciou-se uma não-associação entre essa reação e a deterioração. Kalpana & Rao (1994) observaram queda na peroxidação de lipídios durante o envelhecimento acelerado de sementes de *Cajanus cajan*. De acordo com os autores, a queda na viabilidade das sementes foi devida ao elevado acúmulo de peróxido de hidrogênio, que é tóxico à semente e pode ter contribuído para a deterioração. A ausência de peroxidação de lipídios durante a deterioração também foi observada em sementes de soja (Priestley & Leopold 1983), de milho (Linn & Pearce 1990) e de trigo (Girard & Le Meste 1992). De acordo com Sung & Chiu (1995), a causa exata da perda da viabilidade das sementes não é conhecida. Assim, além da peroxidação de lipídios, outras alterações bioquímicas e fisiológicas podem estar envolvidas na redução de sua germinabilidade.

2.3.4 Proteínas

A deterioração das sementes durante o armazenamento é um fenômeno complexo que envolve alterações em muitos de seus componentes (Priestley 1986). Em estudos, tem-se evidenciado que a membrana é o sítio preferencial de injúria durante o envelhecimento, devido à oxidação e danos em componentes como lipídios e proteínas (Sun & Leopold, 1995).

A queda na quantidade de proteínas durante a deterioração de sementes é um evento comum, podendo ser o principal responsável pelo seu declínio metabólico. A redução no conteúdo de proteínas durante o envelhecimento pode ser devido a um extensivo dano no sistema de síntese de proteínas (Espindola et al., 1994) ou devido à síntese ou ativação de grande quantidade de enzimas proteolíticas (Bewley & Black 1982). De acordo com Misra & Kar (1990), o aumento na atividade de proteases resulta em um concomitante declínio no conteúdo de proteínas de armazenamento e enzimáticas (Perl et al., 1978).

Chaitanya et al. (2000) observaram uma gradual queda no conteúdo de proteínas totais no eixo embrionário e cotilédones de sementes de *Shorea robusta* no decorrer do armazenamento e associaram esse declínio ao aumento na atividade de proteases. De acordo com os autores, a redução no conteúdo de proteínas totais contribuiu para a perda de viabilidade das sementes. Basavarajappa et al. (1991) verificaram que a atividade de proteases durante o envelhecimento de sementes de milho contribui para elevar o conteúdo de aminoácidos. O aumento no conteúdo de aminoácidos foi concomitante com a redução da qualidade fisiológica de sementes de cinco espécies de olerícolas (Taylor et al. 1995). Contrariamente, Paula (1997) verificou queda no conteúdo de aminoácidos com o avanço da deterioração de sementes de seringueira. Segundo Araújo (1994), a destruição de aminoácidos, especialmente, metionina, lisina, histidina, cisteína e triptofano é uma das conseqüências da oxidação de lipídios.

Além disso, os aminoácidos podem ser destruídos pela ocorrência das reações de Amadori e Maillard (Wettlaufer & Leopold, 1991), que formando glicosilaminas com açúcares redutores são perdidos. A destruição de aminoácidos pode provocar sérias perturbações no funcionamento das células, devido a sua importância como precursores de substâncias essenciais, participação em reações metabólicas vitais e constituírem unidades básicas para a síntese de proteínas.

2.3.5 Alterações enzimáticas associadas à deterioração de sementes

Além da importância das proteínas como reserva e como componente estrutural, outro aspecto que deve ser considerado é sua função catalisadora. Muitas mudanças bioquímicas ocorrem na deterioração das sementes. Entre os quais merecem destaque as alterações em atividades enzimáticas.

Sementes de espécies recalcitrantes são caracterizadas por não apresentarem a fase de dessecação durante seu desenvolvimento. Por isso, quando se desligam da planta-mãe e atingem a maturidade fisiológica, apresentam alto teor de água. Como essas sementes perdem a viabilidade rapidamente quando dessecadas, elas devem ser armazenadas com alto grau de umidade. Essa condição favorece uma elevada atividade metabólica das sementes e, conseqüentemente, um aumento de estresse oxidativo. Segundo Bailly (2004), o estresse oxidativo é um dos principais fatores que conduzem à baixa viabilidade de sementes recalcitrantes durante o armazenamento.

O oxigênio é um composto essencial para a produção eficiente de energia tanto nos animais como para os vegetais, sendo assim indispensável para a vida. No entanto, pode resultar em danos reversíveis e até mesmo irreversíveis aos seres vivos devido à oxidação nos componentes celulares. Essa reação gera radicais livres que estão envolvidos numa série de processos degenerativos. A formação desses compostos é determinada pela perda ou ganho de um elétron, ficando com um elétron desemparelhado, o que o torna altamente reativo. A formação dessas espécies reativas de oxigênio (ERO) ocorre naturalmente nos organismos, como por exemplo, a formação do superóxido durante a respiração celular. No entanto, em um primeiro momento, logo após atingida a maturidade fisiológica das sementes, a produção de ERO é ainda controlada. Porém, numa situação de estresse como: desidratação, altas temperaturas e até mesmo durante o envelhecimento, ocorrem distúrbios no balanço metabólico das sementes culminando com a geração descontrolada de ERO (Okuda et al., 1991). Esse distúrbio metabólico vem acompanhado ainda, da redução da eficiência dos sistemas antioxidantes, resultando na peroxidação de lipídios das membranas, seguido de sua desestruturação e morte celular (Leprince et al., 1999).

Os sistemas antioxidativos estão presentes nos diferentes tecidos das plantas, com a função de impedir o acúmulo de substâncias tóxicas gerado pela

oxidação. Esses sistemas protetores são compostos de constituintes enzimáticos e não enzimáticos, sendo os enzimáticos de fundamental importância, pois são os primeiros a agir, evitando o acúmulo do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. No sistema enzimático, merecem destaque as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase (POX), que são enzimas removedoras de radicais livres e de peróxidos, denominadas scavenging. De acordo com Bailly et al. (1996) e Jeng & Sung (1994), essas enzimas podem reduzir ou prevenir os danos celulares causados pela peroxidação de lipídios.

As superóxido dismutase são um grupo de metaloenzimas que catalisam a desproporcionalização de duas moléculas de superóxidos livres (O_2^-), produzidos em diferentes locais na célula, em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Scandalios, 1993). Existem três tipos de SOD, que são caracterizadas dependendo do metal associado a elas (Cu e Zn no citoplasma de eucariontes, Mn na matriz mitocondrial e Fe em bactérias). De acordo com Halliwell & Gutteridge (1989), a SOD exerce um importante papel em proteger a célula contra os efeitos deletérios de radicais superóxidos livres, sendo considerada chave na regulação de concentrações intracelulares de radicais superóxidos e peróxidos, os quais podem reagir nas reações de Haber-Weiss para formar radicais hidroxil (Bowler et al., 1992).

Goel et al. (2003) verificaram que a perda da viabilidade de sementes de algodão está associada ao decréscimo na atividade da superóxido dismutase. Resultados semelhantes foram encontrados por Sung & Jeng (1994) em sementes de amendoim e por Bailly et al. (1996) em sementes de girassol.

O papel primário da SOD é transformar o superóxido em peróxido de hidrogênio cujo composto é muito menos reativo. Entretanto, o acúmulo de peróxido na célula também é tóxico a ela, podendo levá-la a morte, principalmente na presença de ferro cuja toxicidade pode aumentar de 10 a 1000 vezes (Eaton, 1991). Além disso, o peróxido de hidrogênio pode atravessar

facilmente as membranas celulares e, ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro ou do cobre, origina o radical hidroxila. Esse último é, entre as espécies radicalares conhecidas, uma das mais reativas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar. Essas espécies reativas de oxigênio, para se estabilizarem, devem doar ou receber elétrons de uma ou outra molécula, tornando essa última uma espécie também radicalar, cuja consequência é a oxidação dos fosfolípidios de membranas celulares e subcelulares, do DNA, e das proteínas (Duran & Cadenas, 1987 citado por Rover Junior et al., 2001).

Visando a minimizar o efeito tóxico do peróxido de hidrogênio na célula, existem nos vegetais dois tipos de enzimas capazes de removê-lo. São elas, a catalase e a peroxidase (Hallinwell & Guteridge, 1989). A catalase é uma enzima presente nos peroxissomas das células com a função de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água sem a produção de radicais livres, desempenhando, dessa maneira, uma fundamental importância na desintoxicação celular. Em diversos estudos, tem sido demonstrada uma correlação entre perda da viabilidade das sementes e queda na atividade dessa enzima. Sung & Chiu (1995) observaram redução na atividade de enzimas scavenging, entre elas a catalase com o aumento do período de armazenamento de sementes de soja. Resultados semelhantes foram observados por Goel et al. (2003) em sementes de algodão, por Bailly (1996) em sementes de girassol e por Sung (1996) em sementes de amendoim.

As peroxidases, assim como as catalases atuam desintoxicando a célula do acúmulo de peróxido de hidrogênio, entretanto, diferentemente das catalases estão localizadas no citosol e na matriz mitocondrial. A atividade dessa enzima, assim como a de outras scavenging tende a cair com o aumento do envelhecimento das sementes, conduzindo a uma ineficiência do sistema de proteção das sementes (Sung, 1996; Sung & Chin, 1995 e Sung & Jeng 1994).

Por outro lado, Puntarulo & Boveris (1990), contrariando esses resultados observaram um aumento da atividade das catalases e das peroxidases em embriões de soja durante o envelhecimento.

Além dessas enzimas protetoras contra danos oxidativos, outras têm sido mencionadas como eficientes indicadoras da deterioração de sementes. Entre as quais merecem destaque a álcool desidrogenase, a esterase, e a glutamato oxalacetato transaminase.

Segundo Zhang et al. (1994), a respiração aeróbica não é o único fator que pode acelerar a deterioração das sementes. Em estudo realizado por esses autores, foi observada em função do metabolismo anaeróbico, a ocorrência da produção de compostos voláteis pelas sementes, cuja presença pode acelerar o seu processo de deterioração. De acordo com os autores, entre os compostos voláteis, o acetaldeído foi o que proporcionou maiores efeitos danosos, independentemente do ambiente de armazenamento, enquanto o etanol causou deterioração somente em altas umidades relativas.

A enzima álcool desidrogenase (ADH) possui reconhecida atuação no metabolismo anaeróbico de plantas, promovendo a redução do acetaldeído a etanol (Taiz & Zeiger, 2004). Dessa maneira, a diminuição da atividade de ADH torna as sementes mais susceptíveis à ação deletéria do acetaldeído, reduzindo assim, sua viabilidade (Zhang et al., 1994). Brandão Junior et al. (1999) observaram uma correlação positiva entre viabilidade de sementes de milho e atividade da enzima álcool desidrogenase. Resultados semelhantes foram obtidos por Throneberry & Smith (1955) também com sementes de milho. O que não foi verificado por Vieira (1996) a qual observou inalteração nos padrões isoenzimáticos de álcool desidrogenase com o avanço do processo deteriorativo de sementes de algodão.

A esterase é uma enzima que participa de reações de hidrólise de ésteres podendo atuar sobre fosfolipídios de membrana, provocando a peroxidação de

lipídios. Segundo McDonald (1999), a peroxidação de lipídios é uma das principais causas da deterioração em sementes. Santos et al. (2005) observaram aumento na atividade de esterase durante o armazenamento de sementes de feijão. De acordo com os autores esse aumento foi mais expressivo na cultivar de menor qualidade fisiológica quando comparado ao observado nas outras cultivares estudadas. Assim, os autores destacam as alterações no padrão dessa enzima como um indicador da ocorrência de deterioração. Em pesquisas com sementes de soja e cevada (Chauhan et al., 1985) e com algodão (Ribeiro, 2000) também evidenciou-se uma correlação positiva entre a atividade de esterase e o processo deteriorativo. Por outro lado, Brandão Junior et al. (1998), trabalhando com sementes de cafeeiro e Brandão Junior et al. (1999), trabalhando com sementes de milho verificaram decréscimo na atividade dessa enzima com o avanço da deterioração das sementes.

Outra enzima que tem sido utilizada para detectar a deterioração em sementes é a glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), que participa da reação específica de transferência do grupo amino de um aminoácido ao ácido α cetoglutarato para formar o ácido glutâmico e produzir o cetoácido. Além disso, essa enzima está envolvida na produção de ácido aspártico composto que exerce importante papel no transporte de nitrogênio em plantas (Mifflin & Lea, 1977). A GOT reage em diferentes velocidades com praticamente todos os outros aminoácidos, em uma reação reversível. Essas reações ocorrem, sobretudo, no citoplasma e o ácido glutâmico, ao qual a membrana mitocondrial é permeável, entra na matriz, onde pode ser novamente transaminado ou ser desaminado pela glutamato desidrogenase. Portanto, essa é uma enzima atuante no processo de degradação e síntese de proteínas (Conn & Stumpf, 1980), apresentando um importante papel na germinação de sementes. Utilizando técnicas eletroforéticas, Chauhan et al. (1985) observaram em soja e cevada um aumento no número de bandas da GOT com o envelhecimento das sementes. Segundo os autores, essas

mudanças no número de bandas são devidas a um aumento na atividade metabólica que ocorre com a evolução do processo de deterioração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas do Departamento de Biologia em conjunto com o Laboratório de Análise de Sementes e de Técnicas Moleculares do Departamento de Agricultura, ambos situados na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – Minas Gerais.

3.1 Aquisição e tratamento das sementes

As sementes de seringueira utilizadas no presente trabalho foram provenientes de plantios multiclonais pertencentes à fazenda Água Milagrosa, localizada no município de Tabapuã, estado de São Paulo.

As sementes foram colhidas na primeira quinzena de março de 2004 e imediatamente transportadas para a Universidade Federal de Lavras. Parte delas foi tratada com os fungicidas Tecto 600 (65g/100Kg sementes) e Captan 50 (135g/100kg sementes) e outra parte permaneceu sem tratamento. Durante a execução do tratamento foram adicionados às sementes, conjuntamente com os fungicidas, água e uma pequena porção de detergente (10ml de água/1gota de detergente/2Kg de sementes). O detergente foi adicionado com objetivo de quebrar a tensão superficial das sementes e, em conjunto com a água, facilitar a distribuição homogênea dos fungicidas às mesmas. Em seguida, as sementes foram repartidas em porções de 650g (constituindo cada repetição) e acondicionadas em sacos de papel de 3Kg; os quais, posteriormente, foram embalados em sacos de polietileno, lacrados e perfurados com auxílio de uma agulha (6 orifícios) como recomendado por Pereira (1980). Concluído o processo de embalagem, parte das sementes foi armazenada à temperatura de

10°C (câmara fria) e outra a temperatura ambiente $\pm 20^\circ\text{C}$, por um período de 210 dias.

A cada período de armazenamento, parte das sementes foi destinada à determinação do grau de umidade e o restante utilizada para as demais avaliações que foram divididas em fisiológicas, bioquímicas e ultra-estruturais e moleculares.

3.2 Determinação do grau de umidade das sementes

A determinação do grau de umidade das sementes foi realizada ao zero, 30, 60, 90, 105, 135, 165 e 210 dias de armazenamento pelo método de estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas (Brasil, 1992), utilizando duas repetições de cinco sementes destegumentadas. Os resultados foram expressos em porcentagem, com base no peso úmido das sementes.

3.3 Avaliações fisiológicas

A cada período de armazenamento (zero, 30, 60, 90, 105, 135, 165 e 210 dias) as sementes foram submetidas as seguintes avaliações fisiológicas: emergência de plântulas, primeira contagem, índice de velocidade de emergência de plântulas e condutividade elétrica. Exceção feita para o teste de condutividade elétrica no qual não foi realizada avaliação aos 210 dias.

3.3.1 Teste de emergência de plântulas, primeira contagem e índice de velocidade de emergência de plântulas

Para a realização desses testes foram semeadas 50 sementes em 4 repetições para cada tratamento, em bandejas contendo 4 litros de areia. A profundidade de semeadura foi de aproximadamente 1 cm e as bandejas

mantidas em câmara de crescimento vegetal, previamente regulada à temperatura de 30°C em regime alternado de luz e escuro (12 horas). As bandejas foram irrigadas quando necessário. A partir da emergência, foram realizadas avaliações diárias, computando-se o número de plântulas emergidas, até a estabilização. A primeira contagem foi realizada no vigésimo dia, computando-se plântulas completamente emergidas. O índice de velocidade de emergência foi calculado segundo fórmula proposta por Maguirre (1962).

$$\text{IVE: } G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$$

em que:

IVE: índice de velocidade de emergência;

G1, G2, ..., Gn = número de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda, ..., última contagem;

N1, N2, ..., Nn = número de dias de semeadura à primeira, segunda, ..., última contagem.

A porcentagem de emergência das plântulas foi computada após a estabilização da emergência nas parcelas, avaliando-se o número de plântulas normais emergidas.

3.3.2 Condutividade elétrica

Esse teste foi efetuado com 4 repetições de 10 sementes para cada tratamento. Sementes de cada repetição foram pesadas com precisão de 0,01 g e, a seguir, colocadas em copos de plástico contendo 150 ml de água deionizada, permanecendo por um período de 24 horas à temperatura constante de 25°C. Com um condutivímetro de massa, marca DIGIMED, modelo CD21A, foi

efetuada a leitura em $\mu\text{S}/\text{cm}$ e os resultados expressos com base no peso da amostra. Os resultados foram obtidos por meio da fórmula de transformação:

$$\text{Condutividade}(\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}) = \frac{\text{Condutividade lida} - \text{condutividade da água}}{\text{Peso das 10 sementes}(\text{g})}$$

3.3.3 Delineamento experimental e procedimento estatístico

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial ($2 \times 2 \times 8$) com 4 repetições, sendo 2 tratamentos (presença e ausência de tratamento fungicida); 2 temperaturas de armazenamento (câmara fria a 10°C e ambiente $\pm 20^\circ\text{C}$) e 8 épocas de avaliação (zero, 30, 60, 90, 105, 135, 165 e 210 dias). Exceção feita para o teste de condutividade elétrica no qual teve apenas 7 épocas de avaliação (zero, 30, 60, 90, 105, 135 e 165 dias).

Dados quantitativos, quando possível, foram avaliados por meio de análise de regressão e os dados qualitativos foram avaliados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise dos dados foi realizada pelo sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados, SISVAR, para microcomputadores, desenvolvido por Ferreira (2006).

3.4 Avaliações bioquímicas e ultra-estruturais

3.4.1 Preparo do material para as análises bioquímicas

Em intervalos de zero, 60, 105 e 165 dias de armazenamento uma amostra de 20 sementes de cada tratamento foi retirada de suas embalagens, destegumentadas e, posteriormente, com o auxílio de um bisturi submetido à separação do embrião em relação ao endosperma. Descartaram-se as sementes

visivelmente podres presentes em grande quantidade nos últimos períodos de armazenamento. Imediatamente após esse procedimento, ambos os tecidos foram colocados em cadinho sobre banho de gelo e posteriormente congelados em nitrogênio líquido. Realizados esses procedimentos, os distintos tecidos foram armazenados em depp freezer a -86°C até a realização da liofilização.

Concluída a liofilização do material, realizou-se a moagem em moinho resfriado a 4°C . O material moído foi utilizado para as análises dos teores de proteínas solúveis, de aminoácidos, de açúcares solúveis, de açúcares redutores, de lipídios e de malonaldeído em embrião e endosperma separadamente, com exceção do teor de malonaldeído que foi quantificado em semente inteira destegumentada.

3.4.1.1 Extração e quantificação de amido

Para a extração do amido, 0,5 g de material (embrião ou endosperma) foi colocado em tubo de centrífuga, homogeneizado em 10 mL de etanol 80% e incubado a 40°C por 10 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 5000 g por 20 min e o sobrenadante separado do precipitado. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e os sobrenadantes unidos e guardados para a quantificação das micromoléculas (açúcares solúveis totais, redutores e aminoácidos). Ao precipitado foram adicionados 10 mL de ácido perclórico a 30% para a sua ressuspensão e, posteriormente, colocado em banho de gelo por 40 min. Após tal procedimento, a amostra foi centrifugada a 5000 g por 20 min., a solução filtrada, e seu volume completado para 50 mL de água destilada.

A quantificação do conteúdo de amido, em equivalente de glicose, foi realizada pelo método de antrona como descrito por Yemm & Willis, (1954).

3.4.1.2 Extração e quantificação de lipídios

A extração e a quantificação de lipídios foram realizadas no Laboratório de Produtos Vegetais do Departamento de Ciências dos Alimentos da UFLA pelo método gravimétrico. Um grama de material (embrião ou endosperma) foi colocado em cartucho de papel-filtro e transferido para o conjunto Soxhlet, por um período de quatro horas. Foi realizada a extração contínua com refluxo, em presença de éter etílico. Após a completa evaporação e recuperação do solvente, as amostras foram pesadas e o teor de lipídios determinado.

3.4.1.3 Quantificação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e aminoácidos

As quantificações de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e aminoácidos foram realizadas pelos métodos colorimétricos de antrona (Yemm & Willis, 1954), ácido dinitro salicílico – DNS (Miller, 1959) e ninhidrina (Yemm & Coccking, 1955), respectivamente, nos sobrenadantes resultantes das duas centrifugações descritas no item 3.4.1.1. O padrão para aminoácidos foi a glicina, e o utilizado para os métodos de antrona e de DNS foi a glicose.

3.4.1.4 Fracionamento de proteínas

As proteínas foram extraídas de acordo com a solubilidade. 0,5 g de material (embrião ou endosperma) foi submetido à extração consecutiva duplicada com 5 mL de água destilada cada (albuminas), 5 ml de cloreto de sódio 1% (p/v) (globulinas), 5 mL de etanol 80% (prolaminas) e 5 mL de hidróxido de sódio 0,1M (glutelinas). Os extratos foram incubados a 30°C por 40 minutos, centrifugados a 5000 g por 20 minutos, filtrados em papel filtro, sendo recolhidos os sobrenadantes de cada extrator separadamente.

As proteínas de cada extrato foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), sendo a albumina bovina sérica (BSA) utilizada como padrão. A proteína total foi o resultado da soma das frações protéicas.

3.4.1.5 Peroxidação de lipídios

O nível de peroxidação de lipídios foi mensurado em relação à quantidade de malonaldeído (MDA) presente nas sementes, o qual foi determinado pela reação do ácido tiobarbitúrico, de acordo com a metodologia descrita por Heath & Packer (1968). Para essa quantificação, 10 sementes destegumentadas foram liofilizadas e, posteriormente, moídas em moinho refrigerado a 4°C. Pesaram-se 0,5 g do material moído e adicionaram-se 5 mL de TCA 0,1%, o material foi homogeneizado em vortex e imediatamente centrifugado a 10000 g por 5 minutos. Após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi coletado e misturado a 4 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (p/v) + TCA 20% (p/v). Concluído esse procedimento, os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 90°C por 35 minutos e, em seguida, colocados em gelo para a paralisação da reação. Após o esfriamento, as amostras foram filtradas e lidas em espectrofotômetro a 532 nm e 600 nm, cujos valores foram posteriormente subtraídos. O conteúdo de MDA foi estimado utilizando um coeficiente de extinção de 155 ($\text{mmol} / \text{L}^{-1}\text{cm}^{-1}$) conforme descrito por Meriga et al. (2004).

3.4.1.6 Delineamento experimental e procedimento estatístico

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial ($2 \times 2 \times 4$) com 4 repetições, sendo 2 tratamentos (presença e ausência de tratamento fungicida); 2 temperaturas de armazenamento (câmara fria a 10°C e ambiente $\pm 20^\circ\text{C}$) e 4 épocas de avaliação (zero, 60, 105 e 165).

Dados quantitativos, quando possível, foram avaliados por meio de análise de regressão e os dados qualitativos foram avaliados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise dos dados foi realizada pelo sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados, SISVAR, para microcomputadores, desenvolvido por Ferreira (2006).

3.4.2 Análise histoquímica

A preparação e observação de cotilédones de sementes de seringueira em microscópio de luz foram realizadas no Laboratório de Anatomia de Plantas do Departamento de Biologia da UFLA. As sementes foram destegumentadas e suas “amêndoas” seccionadas longitudinalmente, com o auxílio de uma lâmina, para a separação do cotilédone em relação ao endosperma. Concluído esse procedimento, cotilédones foram seccionados, transversal e longitudinalmente, por meio de um micrótomo de mão, posteriormente, os cortes foram tratados durante três minutos com o reagente Sudan IV em solução etanólica a 80% para a visualização de lipídios, segundo o protocolo proposto por Jensen (1962).

3.4.3 Preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A preparação e a observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Cinco embriões (eixo embrionário e cotilédone) de sementes coletadas a cada período de armazenamento (zero, 60, 105, 120 dias) foram imersos em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2 por 24 horas. Em seguida, foram transferidos para um líquido crio-protetor (glicerol 30%) por 30 minutos e cortados transversalmente e longitudinalmente em

nitrogênio líquido. As secções obtidas foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora e subseqüentemente desidratadas em uma série de acetona (30, 50, 70 e 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, *stubs*, com a ajuda de uma fita de carbono colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 90 XVP. Foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, diversas imagens para cada amostra, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 9, onde foram selecionadas e apresentadas neste trabalho.

3.5 Avaliações moleculares

3.5.1 Preparo do material para análise eletroforética

O preparo do material para a extração das isoenzimas e análise eletroforética foi realizado conforme descrito no item 3.4.1 Entretanto, essa análise foi realizada somente no embrião.

A análise das isoenzimas foi realizada ao zero, 60, 105, 165 e 210 dias para sementes armazenadas a temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$ e ao zero, 60, 105 e 165 dias para sementes armazenadas em câmara fria 10°C .

3.5.1.1 Extração de isoenzimas e análise eletroforética

Para a extração das isoenzimas foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de β Mercaptoetanol, 0,4% PVP, 0,4% PEG e 1mM EDTA), na proporção de 400 μL por 100 mg de embriões. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 12 horas a 4°C , seguido de centrifugação a 16.000 g por 60 minutos a 4°C .

A corrida eletroforética foi desenvolvida em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 40 μ L do sobrenadante da amostra para os géis revelados para os sistemas enzimáticos catalase e esterase e 60 μ L para os géis revelados para os sistemas enzimáticos álcool desidrogenase, superóxido dismutase, glutamato oxalacetato transaminase e peroxidase e as corridas foram efetuadas a 150 V por 4 horas.

Terminada a corrida, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos citados acima, conforme Alfenas et al. (1991).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Grau de umidade das sementes

Os dados obtidos na determinação do grau de umidade das sementes durante o armazenamento (Figura 1) não foram submetidos à análise estatística.

No geral, pode-se verificar um incremento nos valores de grau de umidade das sementes durante o armazenamento em todos os tratamentos, embora sejam notadas algumas oscilações. Esses dados corroboram com os observados por Garcia & Vieira (1994) e Vieira et al. (1995), os quais verificaram aumento no grau de umidade das sementes de seringueira com o decorrer do armazenamento. Por outro lado, difere dos observados por Pereira (1980), que embora tenha também observado oscilação nos valores de grau de umidade das sementes de seringueira durante o armazenamento, estes, ao fim de 180 dias, não foram superiores ao inicial.

O aumento do grau de umidade das sementes de seringueira durante o armazenamento, provavelmente, ocorreu em função do tipo de embalagem utilizada no experimento, impermeável, associado ao alto teor de água em que as sementes foram armazenadas. Esse último fator contribui para elevação da atividade metabólica das sementes e, conseqüentemente, para o aumento de sua taxa respiratória, resultando numa maior liberação de CO₂ e vapor de água no interior da embalagem. Como a embalagem impermeável não permite a troca de umidade entre o ambiente interno e o externo, pode ser que o vapor de água liberado durante a respiração das sementes tenha-se condensado nas paredes da embalagem formando gotículas de água que acabaram sendo absorvidas pelas próprias sementes aumentando seu grau de umidade.

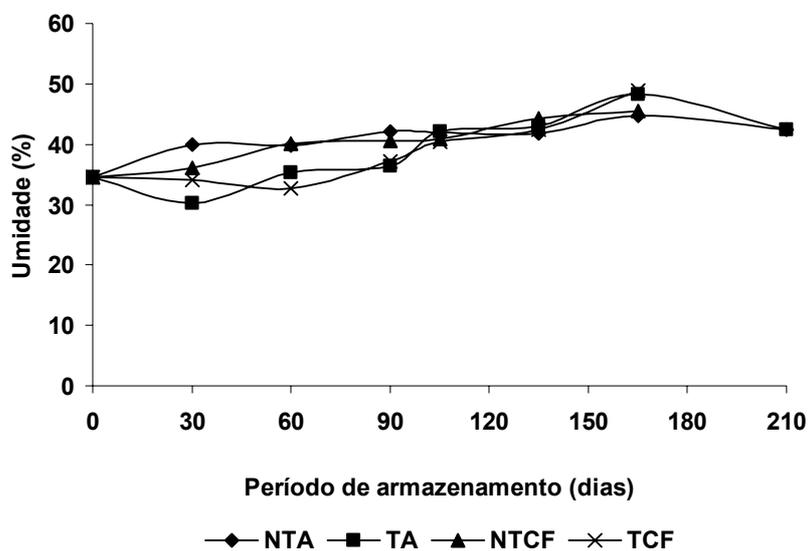


FIGURA 1 Médias, em porcentagem, do grau de umidade de sementes de seringueira, com (T) e sem (NT) tratamento fungicida, armazenadas à temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$ (A) e em câmara fria 10°C (CF) ao longo do armazenamento (zero, 30, 60, 90, 105, 135, 165 e 210 dias). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Vale ressaltar que durante todo o período de armazenamento, os valores de grau de umidade das sementes foram superiores a 30%, pré-requisito básico para a manutenção da viabilidade de sementes dessa espécie (Cícero, 1986).

4.2 Avaliações fisiológicas

4.2.1 Emergência de plântulas

Pelos resultados do resumo da análise de variância referente à porcentagem de emergência de plântulas (Tabela 1A), observa-se significância para a interação tripla, tratamento químico x ambiente de armazenamento x

período de armazenamento, indicando que os três fatores estão interagindo, ou são dependentes, com um dos fatores influenciando na ação dos outros dois.

De maneira geral, observa-se pela Figura 2, redução na porcentagem de emergência de plântulas com o decorrer do armazenamento das sementes em todos os tratamentos. Com relação ao ambiente de armazenamento (Figura 2), observam-se menores valores de emergência de plântulas em sementes armazenadas em câmara fria a 10°C, durante todo o período de armazenamento, quando comparado àquelas acondicionadas à temperatura ambiente, $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Esses resultados corroboram com os verificados por Pereira (1980), com sementes de seringueira. Entretanto, diferem dos observados por Paula et al. (1997), nos quais se verificou que a baixa temperatura de armazenamento foi mais eficaz em manter a viabilidade das sementes de seringueira do que a temperatura ambiente 25°C. Provavelmente a diferença nos resultados da presente pesquisa com os observados por Paula et al. (1997), sejam em decorrência do menor grau de umidade das sementes utilizadas pela autora, 27% durante todo o período de armazenamento, em comparação as utilizadas nesse trabalho, 35% atingindo valores de 41% durante o armazenamento (Figura 1).

Em trabalhos com sementes de diversas espécies recalcitrantes, como manga (Fu et al., 1990), pupunha (Villalobos et al., 1992), e cacau (Hor et al., 1984), evidenciou-se o efeito negativo da baixa temperatura sobre a sua viabilidade durante o armazenamento. De acordo com Probert & Smith (1996), sementes recalcitrantes tropicais não podem ser armazenadas em temperaturas abaixo de 15-20°C, uma vez que são danificadas pelo frio.

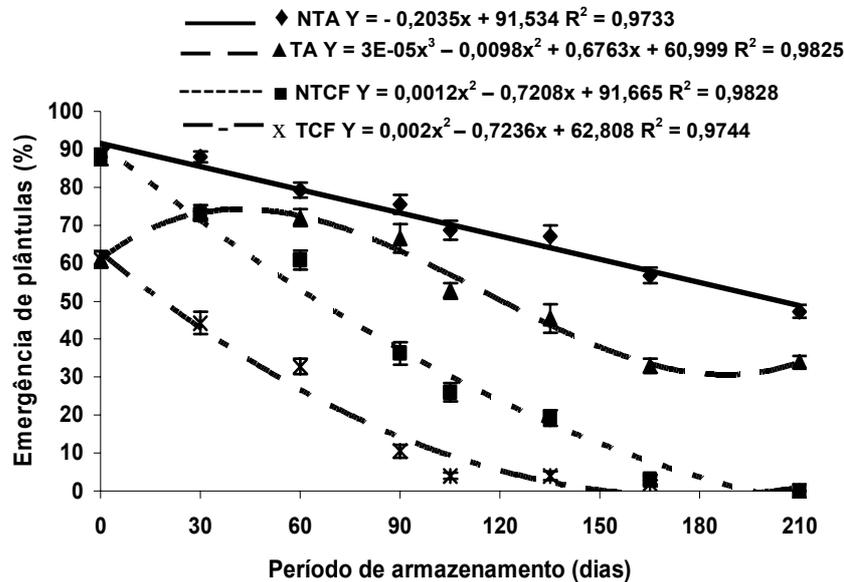


FIGURA 2 Estimativa da porcentagem de emergência de plântulas originadas de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida (tratada (T) e não tratada (NT)), do ambiente de armazenamento (temperatura ambiente $\pm 20^\circ\text{C}$ (A) e câmara fria 10°C (CF)) e do período de armazenamento (0, 30, 60, 90, 105, 135, 165 e 210 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFPA, Lavras, MG, 2006.

Quando se observa o fator tratamento fungicida, nota-se seu efeito negativo sobre a viabilidade das sementes. Vale ressaltar, que o efeito prejudicial dos fungicidas foi imediato, causando uma redução, de 27%, na emergência de plântulas, antes do início do armazenamento, em relação às sementes não tratadas. Entretanto, aos 30 dias de armazenamento, sementes tratadas e acondicionadas à temperatura ambiente apresentaram um acréscimo nos valores de emergência de plântulas com posterior queda a partir do segundo mês. O mesmo não foi verificado para sementes tratadas e armazenadas em câmara fria. Vieira et al. (1995) verificaram resultados semelhantes com

sementes de seringueira tratadas com benlate e armazenadas a temperatura ambiente. Os autores atribuíram à queda na germinação das sementes, após o segundo mês de armazenamento, mais ao envelhecimento do que ao efeito fitotóxico do fungicida utilizado.

No geral, nota-se em ambas as condições de ambiente (baixa temperatura, 10°C e temperatura ambiente \pm 20°C) uma menor porcentagem de emergência de plântulas em sementes tratadas com os fungicidas Tecto 600 e Captan durante todo o período de armazenamento quando comparada à observada em sementes não tratadas. Esse resultado sugere um efeito fitotóxico dos fungicidas sobre as sementes. Sementes com alta umidade apresentam uma elevada atividade metabólica, o que pode conduzir a uma rápida absorção do produto químico causando a fitotoxicidade. Bonome & Von Pinho (1999) verificaram efeito fitotóxico dos fungicidas Tecto 600 e Captan sobre sementes de *Citromelo swingle*, espécie recalcitrante, quando armazenadas com alta umidade. No entanto, Garcia & Vieira (1994) não verificaram efeito negativo do fungicida Captan sobre a qualidade fisiológica das sementes de seringueira, embora outros como o Thiran e o Benomyl tenham contribuído para a perda de sua viabilidade.

Assim, fica evidenciado pela Figura 2, que tanto a baixa temperatura quanto o tratamento fungicida foram prejudiciais ao armazenamento das sementes de seringueira. Vale ressaltar que a baixa temperatura teve efeito mais drástico sobre a viabilidade das sementes do que o tratamento fungicida. Por outro lado, quando esses dois fatores foram utilizados juntos, notou-se uma redução na porcentagem de emergência de plântulas mais severa do que quando utilizados isoladamente, atingindo valores próximos de zero aos 105 dias de armazenamento. Em contrapartida, sementes armazenadas a temperatura ambiente apresentaram ao fim de 210 dias de armazenamento, 47 % e 34% de

emergência de plântulas, quando não tratadas e tratadas com fungicidas, respectivamente.

4.2.2 Índice de velocidade de emergência de plântulas

Verifica-se pelos resultados da Tabela 1A, que houve efeito significativo para interação tripla tratamento fungicida x ambiente de armazenamento x período de armazenamento.

Pela Figura 3, nota-se tanto em sementes não tratadas quanto naquelas tratadas com fungicidas, uma oscilação, com tendência de queda, nos valores do índice de velocidade de emergência de plântulas com o avanço do período de armazenamento das sementes, quando as mesmas foram armazenadas a temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Já em sementes armazenadas a baixa temperatura, 10°C , observou-se uma redução linear nos valores do índice de velocidade de emergência de plântula, tanto em sementes tratadas com fungicidas quanto naquelas não tratadas com o avanço do período de armazenamento. Por meio desses resultados infere-se que o vigor das sementes é afetado negativamente pelo armazenamento. De acordo com Matthews (1985) a principal consequência da deterioração de sementes é a redução dos valores de germinação, entretanto, isto é frequentemente precedido pela redução na velocidade de germinação e emergência de plântulas. Para Popinigis (1985), pelo teste de vigor, evidenciam-se alterações mais sutis resultantes da deterioração das sementes do que pelo teste de germinação.

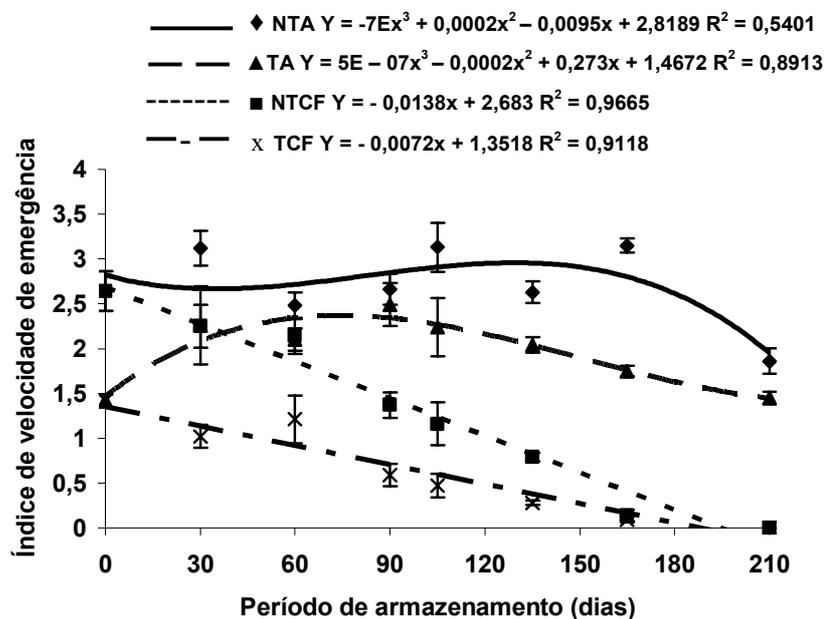


FIGURA 3 Estimativa do índice de velocidade de emergência de plântulas oriundas de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida (tratada (T) e não tratada (NT)), do ambiente de armazenamento (ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$ (A) e câmara fria 10°C (CF)) e do período de armazenamento (0, 30, 60, 90, 105, 135, 165 e 210 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Semelhantemente ao observado para emergência de plântulas, nota-se que a temperatura ambiente, $\pm 20^{\circ}\text{C}$, foi mais apropriada para manutenção do vigor das sementes de seringueira do que a baixa temperatura, 10°C , tanto em sementes tratadas com fungicidas como nas não tratadas. Pereira (1980) também observou maior declínio no vigor de sementes de seringueira quando estas foram armazenadas em câmara fria em comparação àquelas armazenadas a temperatura ambiente. Segundo King & Roberts (1979), espécies tropicais apresentam sensibilidade ao frio, o que dificulta a utilização de temperaturas inferiores a 10°C .

Observa-se ainda pela Figura 3 o fato de as sementes não tratadas apresentarem maior vigor durante todo o período de armazenamento quando comparadas àquelas tratadas com fungicidas, em ambos os ambientes de armazenamento. A redução no vigor das sementes com o tratamento fungicida, provavelmente, deve-se ao efeito fitotóxico dos produtos utilizados sobre elas. Garcia & Vieira (1994) também verificaram perda de vigor em sementes de seringueira em decorrência da fitotoxidez provocada pela utilização de fungicidas.

Similarmente ao observado para a emergência de plântulas (Figura 2) fica evidenciado pela Figura 3 o fato de os danos provocados pela baixa temperatura terem sido mais severos do que aqueles proporcionados pelo tratamento fungicida. Por outro lado, a associação dos dois fatores, baixa temperatura e tratamento fungicida, resultaram num maior decréscimo do vigor das sementes.

4.2.3 Primeira contagem

Para os dados de primeira contagem, diferença significativa foi detectada para a interação tripla tratamento fungicida x ambiente de armazenamento x período de armazenamento (Tabela 1 A).

De acordo com o vigor medido pelo teste de primeira contagem (Figura 4), verificam-se resultados semelhantes aos observados no índice de velocidade de emergência e porcentagem de emergência de plântulas, em que foi verificada tendência de queda no vigor e na viabilidade das sementes com o decorrer do armazenamento e efeito fitotóxico dos fungicidas.

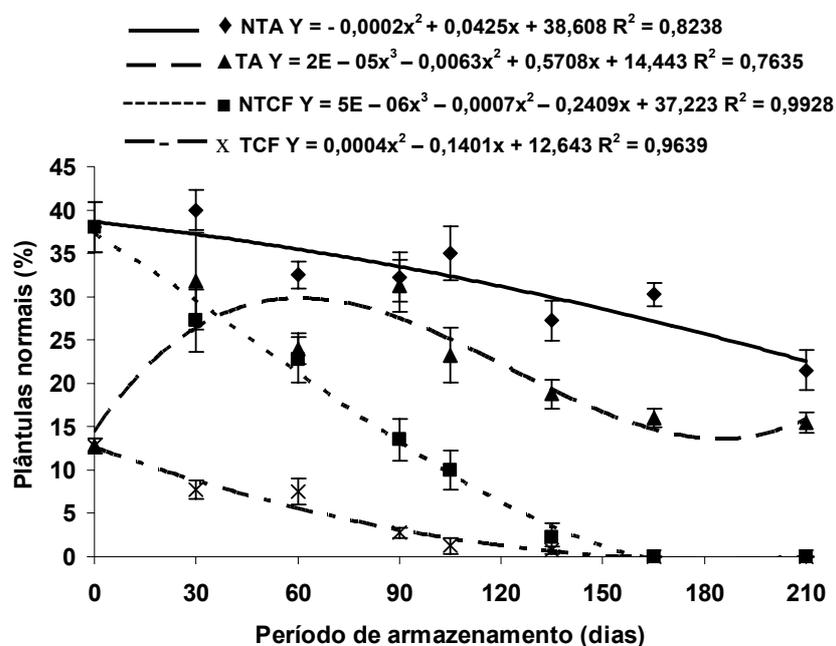


FIGURA 4 Estimativa de porcentagem de plântulas normais na primeira contagem do teste de emergência de plântulas em função do tratamento fungicida (tratada (T) e não tratada (NT)), do ambiente de armazenamento (ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$ (A) e câmara fria 10°C (CF)) e do período de armazenamento (0, 30, 60, 90, 105, 135 e 165 e 210 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006

Com relação ao ambiente de armazenamento, verifica-se que as sementes armazenadas em câmara fria apresentaram maior declínio no vigor, medido pelo teste de primeira contagem, com o decorrer do armazenamento do que aquelas armazenadas à temperatura ambiente. Ferreira & Gentil (2003), também observaram redução no vigor de sementes de camu-camu, espécie recalcitrante, quando foram armazenadas à temperatura de 10°C .

Vale ressaltar que a redução no vigor das sementes, foi ainda mais acentuada, quando elas foram armazenadas em câmara fria e tratadas com fungicidas, atingindo valor de plântulas normais na primeira contagem, próximo de zero, aos 90 dias de armazenamento. Já em sementes não tratadas e submetidas à mesma condição de ambiente, valor próximo de zero só foi verificado a partir de 135 dias de armazenamento.

Diversos pesquisadores utilizam o teste de primeira contagem, realizado durante o teste de germinação ou emergência de plântulas, como um índice de vigor, o qual se baseia na premissa de que as plântulas que apresentam maior velocidade de crescimento provêm de sementes mais vigorosas. Segundo Camargo (2003), esse foi um eficiente método para avaliação da redução no vigor de sementes de milho-doce durante o armazenamento.

4.2.4 Condutividade elétrica

Pelos resultados da análise de variância Tabela 2A, observa-se efeito significativo para as interações tratamento fungicida x período de armazenamento, tratamento fungicida x ambiente de armazenamento e ambiente de armazenamento x período de armazenamento.

Observa-se pela Figura 5, que os valores de condutividade elétrica na solução de embebição das sementes tenderam a subir com o aumento do período de armazenamento, tanto nas sementes tratadas com fungicidas quanto nas não tratadas. Esses resultados sugerem que o sistema de membranas das células estão se desorganizando com o armazenamento, reduzindo a qualidade fisiológica das sementes. De acordo com Vieira & Krzyzanowski (1999), o aumento no teor de lixiviados no meio de embebição das sementes, está diretamente relacionado com o nível de degradação das membranas e perda do controle da permeabilidade. Para Delouche & Baskin (1973), a degradação das membranas celulares se constitui no primeiro processo de deterioração, sendo dessa maneira,

um método muito mais sensível para detectar o envelhecimento das sementes do que o teste de germinação. Para Martins et al. (2003), entre os testes de vigor empregados em sua pesquisa, o de condutividade elétrica foi o mais eficiente em detectar a deterioração de sementes de palmeira real australiana (*Archontophoenix alexandrae*).

Ainda pela Figura 5, notam-se maiores valores de condutividade elétrica em sementes tratadas durante todo o período de armazenamento, quando comparadas aos das não tratadas, com exceção do período de 165 dias de armazenamento, em que os valores de ambos os tratamentos não diferiram estatisticamente. Com esses resultados, comprovam-se mais uma vez o efeito negativo dos fungicidas utilizados sobre a qualidade fisiológica das sementes de seringueira.

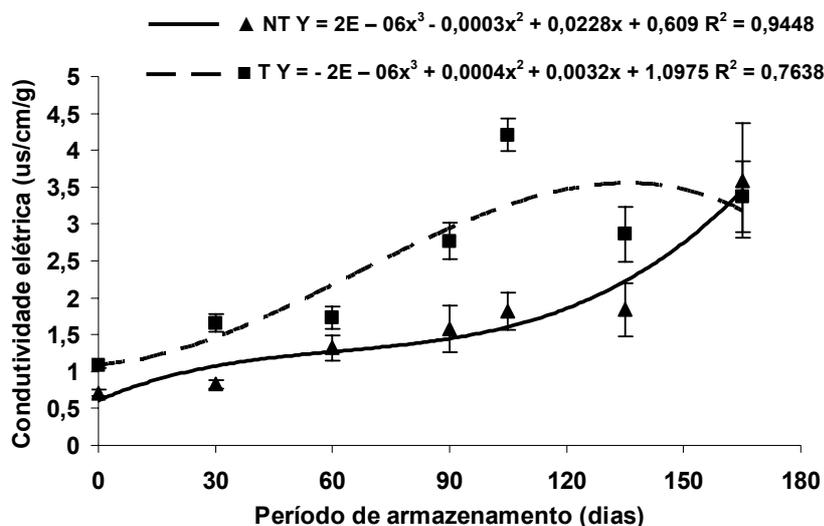


FIGURA 5 Estimativa dos valores de condutividade elétrica de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida (tratada (T) e não tratada (NT)) e do período de armazenamento (0, 30, 60, 90, 105, 135 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Pela Tabela 1, observa-se que tanto o tratamento fungicida quanto a baixa temperatura de armazenamento contribuíram para o aumento de lixiviados na solução de embebição das sementes, o que significa que essas condições não foram eficientes em preservar a integridade das membranas celulares. Por outro lado, em sementes sem tratamento fungicida e armazenadas à temperatura ambiente foram observados menores valores de condutividade elétrica na solução de embebição, sugerindo ter sido essa a melhor condição para a manutenção da sua viabilidade. Esses resultados corroboram com os obtidos no teste de emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência de plântulas e primeira contagem, nos quais sementes tratadas e armazenadas em câmara fria apresentaram menor viabilidade e vigor quando comparadas às não tratadas e armazenadas à temperatura ambiente.

Ferreira & Gentil (2003), trabalhando com sementes de camu-camu (*Myrciaria dúbia*), espécie recalcitrante, também verificaram efeito negativo da baixa temperatura de armazenamento, 10°C, sobre a qualidade fisiológica das sementes. Segundo Chin (1988), sementes recalcitrantes são sensíveis à baixa temperatura, no entanto, essa sensibilidade pode variar consideravelmente entre as espécies. Mediante a isso, Farrant et al. (1988) classificaram as sementes recalcitrantes em altamente, moderadamente e minimamente recalcitrantes, sendo as duas primeiras sensíveis a baixas temperaturas e a minimamente recalcitrante mais tolerante, desde que a temperatura seja superior a 0°C.

Tabela 1 Resultados médios de condutividade elétrica de sementes de seringueira em função da temperatura de armazenamento (ambiente \pm 20°C e câmara fria 10°C) e do tratamento fungicida (tratado e não tratado com fungicida). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Temperatura de armazenamento	Tratamento fungicida	
	Tratada	Não tratada
Temperatura ambiente	2,06Ab	1,02Aa
Câmara fria	2,99 Bb	2,31Ba

Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A não-tolerância à dessecação das sementes de seringueira em graus de umidade inferiores a 30% (Cícero, 1986) associada à sua perda de viabilidade e vigor quando armazenadas à baixa temperatura, como exposto no presente trabalho, indicam que as sementes dessa espécie, provavelmente, sejam altamente ou moderadamente recalcitrantes de acordo com a classificação de Farrant et al. (1988).

Pela Figura 6, fica evidenciado que ambos os fatores, temperatura de armazenamento e período de armazenamento, contribuíram para a elevação nos valores de condutividade elétrica na solução de embebição das sementes. Entretanto, quando essas sementes foram armazenadas à temperatura ambiente, o incremento no valor de lixiviados foi menos expressivo do que quando elas foram armazenadas à temperatura de 10°C, indicando que a condição de baixa temperatura teve efeito deletério sobre as sementes de seringueira, o que é comumente constatado em sementes recalcitrantes (Chin, 1988). Pereira (1980) também constatou efeito prejudicial da baixa temperatura no armazenamento sobre a viabilidade de sementes de seringueira. Por outro lado, esse resultado se

opõe à recomendação de Paula (1997), que indica a temperatura de 10°C para a manutenção da viabilidade das sementes dessa espécie.

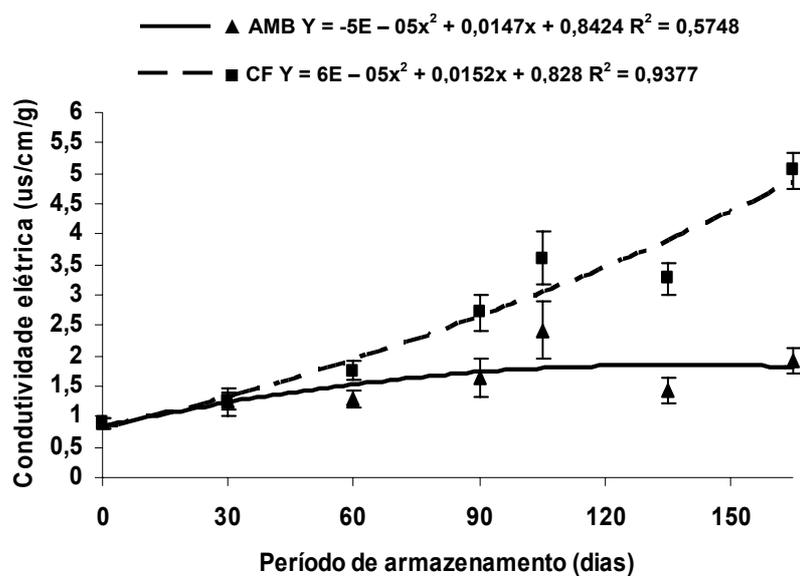


FIGURA 6 Estimativa dos valores de condutividade elétrica de sementes de seringueira em função da temperatura de armazenamento (temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$ (AMB) e câmara fria 10°C (CF)) e do período de armazenamento (0, 30, 60, 90, 105, 135 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

4.3 Avaliações bioquímicas e ultra-estruturais

4.3.1 Amido

Para o teor de amido, diferença significativa foi detectada para a interação ambiente de armazenamento x período de armazenamento no embrião (Tabela 4A) e para o fator período de armazenamento no endosperma das sementes (Tabela 5A).

O teor inicial de amido (aproximadamente 7%) verificado tanto no embrião quanto no endosperma das sementes de seringueira foi superior ao observado por Alencar (2003) e por Paula (1997), os quais encontraram valores de 5% e 0,1%, respectivamente. A variação no teor de amido entre as sementes de seringueira utilizadas nos três trabalhos, talvez, se deva às diferenças na qualidade fisiológica dessas sementes, cujos valores de porcentagem de germinação foram 90%, 70% e 40%, respectivamente. Em diversos trabalhos, evidenciam-se modificações expressivas nas principais reservas das sementes durante a sua deterioração, principalmente, devido à ação de lípases, proteases e amilases (Abdul-Baki & Anderson, 1972; Basavarajappa et al., 1991; Smith & Berjak, 1995).

No embrião, quando as sementes foram armazenadas em câmara fria, verificou-se uma manutenção no teor de amido nos primeiros dois meses, com posterior queda no decorrer do armazenamento (Figura 7). Já quando as sementes foram armazenadas à temperatura ambiente, o declínio no teor de amido seguiu um padrão linear, apresentando aos 60 dias, um menor teor de amido quando comparado ao embrião de sementes armazenadas à baixa temperatura. Entretanto, aos 105 e 165 dias de armazenamento, não houve diferença estatística no teor de amido entre os embriões de sementes armazenadas em ambas as temperaturas. Provavelmente, o menor teor de amido no embrião de sementes armazenadas aos 60 dias à temperatura ambiente se deva ao mais alto metabolismo das sementes nessas condições, necessitando de maiores quantidades de açúcares menores para o suprimento da respiração (Roberts, 1979).

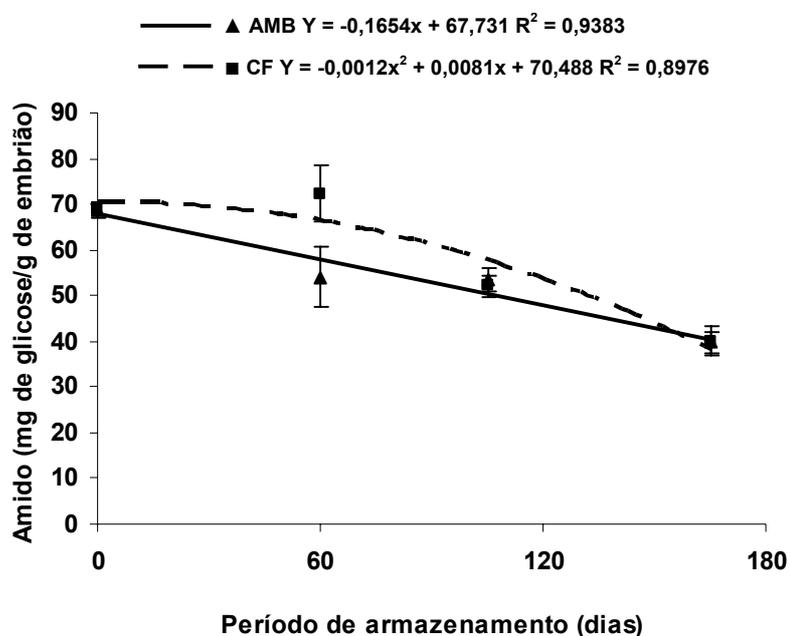


FIGURA 7 Estimativa do teor de amido em embrião de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (câmara fria 10°C (CF) e temperatura ambiente \pm 20°C (AMB)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

No endosperma, a variação no teor de amido (Figura 8) seguiu um padrão semelhante ao observado no embrião de sementes armazenadas em câmara fria, em que se nota uma manutenção na quantidade de amido nos meses iniciais de armazenamento, com posterior declínio até o final desse período, cujo valor foi 31% menor do que o observado no endosperma das sementes, antes do armazenamento. Decréscimo no teor de amido durante o armazenamento de sementes também foi relatado por Ramos & Souza (1991) trabalhando com sementes de araucária e por Paula (1997) com sementes de seringueira. Provavelmente, a redução no teor de amido no embrião e no endosperma das

sementes no decorrer do período de armazenamento seja em função da maior atividade de amilases clivando esse carboidrato em açúcares menores para a utilização como substrato respiratório (Roberts, 1979).

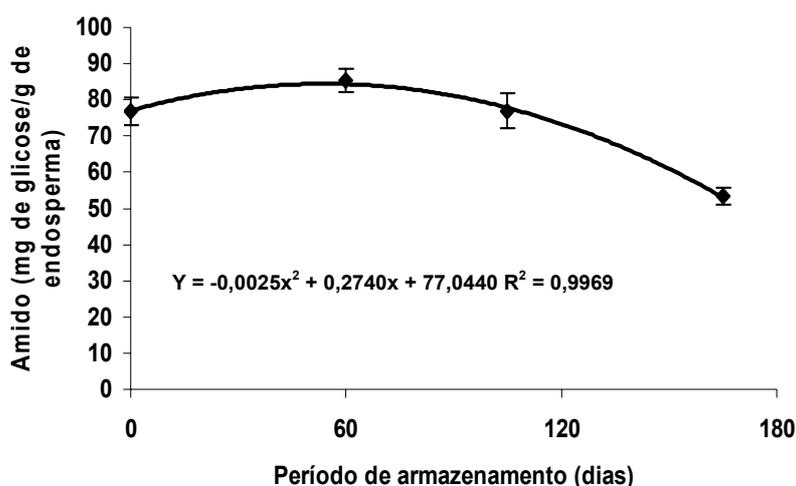


FIGURA 8 Estimativa do teor de amido em endosperma de sementes de seringueira em função do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

4.3.2 Açúcares solúveis totais (AST)

Pelos resultados da análise de variância, observa-se efeito significativo para a interação ambiente de armazenamento x período de armazenamento no embrião (Tabela 4A) e para as interações ambiente de armazenamento x período de armazenamento e tratamento fungicida x período de armazenamento no endosperma das sementes (Tabela 5A).

Pela Figura 9, verifica-se que o teor de AST no embrião das sementes, antes do armazenamento, foi em torno de 16,5%, valor 22% superior ao

observado no endosperma (Figura 10). Nota-se ainda, que esse valor decresce, no embrião, com o decorrer do armazenamento, independentemente da temperatura de acondicionamento das sementes. Entretanto, a redução no teor de AST no embrião de sementes armazenadas à temperatura ambiente ocorre mais acentuadamente quando comparado ao embrião de sementes armazenadas à baixa temperatura. Mas ao fim do período de armazenamento, o teor de AST no embrião das sementes não diferiu estatisticamente entre os ambientes de armazenamento, cujos valores foram 11,9% (câmara fria) e 12% (temperatura ambiente). Segundo Bernal-Lugo & Leopold, (1992), a redução no vigor de plântulas, devido ao envelhecimento das sementes, está associado ao decréscimo no teor de carboidratos solúveis.

No endosperma de sementes armazenadas em câmara fria observa-se um incremento no teor de AST nos dois primeiros meses de armazenamento e, a partir daí, tendência de declínio até o fim do mesmo (Figura 10). Já no endosperma de sementes armazenadas à temperatura ambiente verifica-se um comportamento diferente, com redução no teor de AST nos dois meses iniciais de armazenamento e posterior acréscimo nesse valor com o avanço desse período.

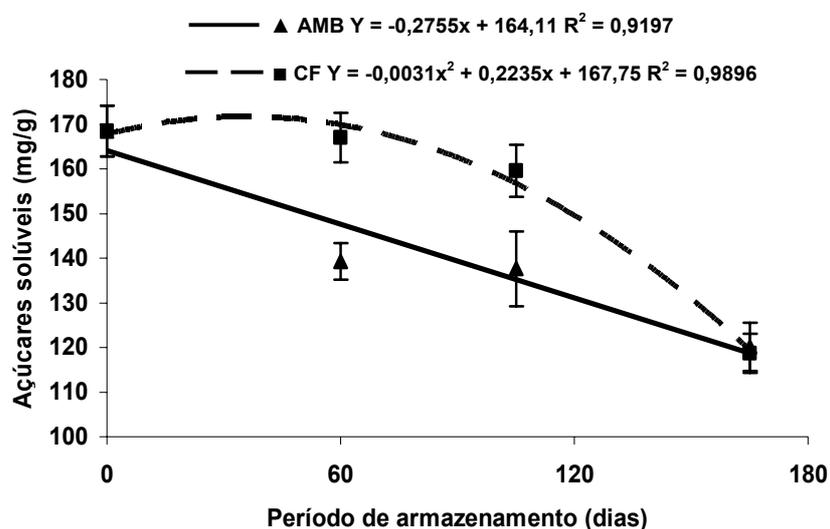


FIGURA 9 Estimativa do teor de açúcares solúveis totais em embrião de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (câmara fria 10°C (CF) e temperatura ambiente \pm 20°C (AMB)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Provavelmente, a queda no teor de AST tanto no embrião quanto no endosperma das sementes com o decorrer do armazenamento, principalmente, naquelas acondicionadas à temperatura ambiente tenha ocorrido em função da sua alta atividade metabólica, uma vez que, foram armazenadas com altos teores de água. Dessa maneira, é possível que os AST tenham sofrido oxidação para a produção de energia durante o processo respiratório (Bewley & Black, 1994). Eichelberger et al. (2002) também verificaram declínio no teor de açúcares solúveis em sementes de azevém durante o armazenamento.

Por outro lado, o incremento no teor de AST no endosperma das sementes acondicionadas à temperatura ambiente, após os primeiros 60 dias de

armazenamento, pode ser devido à hidrólise do amido (Figura 8), associado à hidrólise de reservas de lipídios armazenados na semente. As sementes de seringueira são ricas em lipídios (Alencar, 2003), portanto, a degradação desse composto pode ter influenciado no aumento dos AST. A conversão de lipídios em sacarose é um processo comum durante a germinação de sementes oleaginosas. Esse processo é iniciado com a hidrólise dos triacilgliceróis armazenados nos corpos lipídicos, por ação de lípases, para liberar os ácidos graxos. Esses por sua vez são oxidados nos glioxissomos por meio da β -oxidação para produzir acetil-CoA. A acetil-CoA é metabolizada no glioxissomo para produzir succinato, o qual é transportado do glioxissomo para a mitocôndria, onde é convertido primeiro a oxalacetato e então a malato. O processo termina no citosol, com a conversão do malato a glicose via gliconeogênese e, então, a sacarose (Taiz & Zeiger, 2004). Assim, sugere-se na presente pesquisa que em sementes de seringueira esse processo de conversão de lipídios em sacarose ocorra durante o armazenamento, uma vez que, as sementes dessa espécie são armazenadas com alta umidade e, portanto, se encontram metabolicamente ativas. Em estudo com *Euphorbia heterophylla*, Suda & Giorgini (2000) observaram que os AST aumentaram no embrião sem uma concomitante diminuição no endosperma, sugerindo que os açúcares solúveis são originados do catabolismo de lipídios. Rodrigues et al. (2005) também observaram aumento no teor de AST com o avanço do período de armazenamento de sementes de *Syagrus coronata* submetidas a diversas condições de ambiente.

A manutenção na concentração de AST observado no embrião e o ligeiro incremento observado no endosperma das sementes armazenadas em câmara fria, nos primeiros 105 dias de armazenamento, podem ser em decorrência de uma menor atividade metabólica das sementes nessas condições. Entre as utilidades da câmara fria no armazenamento de sementes destaca-se a sua eficiência na redução do metabolismo celular. Além disso, foi observado nas

Figuras 2, 3, 4 e 6 que, nessa condição de armazenamento, ocorreu uma maior deterioração das sementes. De acordo com Wilson & McDonald (1986), existe uma diminuição da atividade respiratória em sementes com a evolução do seu processo deteriorativo. Booth et al. (1999) observaram degradação mitocondrial em células da radícula do embrião de sementes de *Eurotia lanata* armazenadas a 5°C. De acordo com os autores, o envelhecimento das sementes provoca um acúmulo de diferentes ácidos graxos livres nas membranas mitocondriais como resultado da ativação da fosfolipase A₂ (Luzikov et al., 1985), induzindo o desacoplamento da fosforilação oxidativa e, como consequência, reduzindo o nível de ATP endógeno. Dessa maneira, pode ser que com a redução na taxa respiratória tenha ocorrido uma menor oxidação desses açúcares nas sementes quando armazenadas nessas condições.

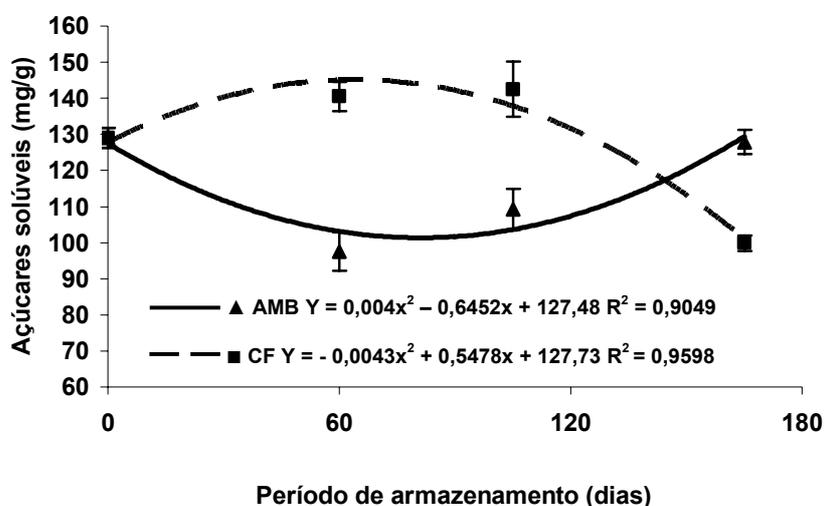


FIGURA 10 Estimativa do teor de açúcares solúveis totais em endosperma de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (câmara fria 10°C (CF) e temperatura ambiente ± 20°C (AMB)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Vale destacar que, durante todo o período de armazenamento, o teor de AST no endosperma das sementes (Figura 10) armazenadas à temperatura ambiente foi inferior ao das acondicionadas em câmara fria, semelhante ao observado no embrião (Figura 9). Exceção feita aos 165 dias de armazenamento, nos quais se notou uma inversão nesses valores no endosperma das sementes.

Pelos resultados apresentados na Tabela 2, verifica-se redução no teor de AST, no endosperma de sementes tratadas, com o decorrer do armazenamento. O mesmo não foi verificado no endosperma das sementes não tratadas, o qual teve um acréscimo no valor de AST aos 105 dias de armazenamento. Esses resultados indicam que o tratamento fungicida associado ao período de armazenamento contribuiu para a redução no teor de AST no endosperma das sementes, provavelmente, devido ao maior metabolismo das sementes quando tratadas com fungicidas, os quais causaram fitotoxidez a elas, sendo responsável pelo decréscimo do seu vigor e da sua germinabilidade (Figuras 2, 3, 4 e 6).

Quando se compara sementes tratadas com fungicidas com as não tratadas, verifica-se que só ocorreu diferença significativa entre os tratamentos no período de 105 dias, com superioridade na concentração de AST para as sementes não tratadas com fungicidas.

TABELA 2 Resultados médios do teor de açúcares solúveis totais em endosperma de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida (tratada e não tratada) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Período de armazenamento	Tratamento fungicida	
	Tratada	Não tratada
0	132,33Aa	125,66ABa
60	119,79ABa	118,24Ba
105	115,81Bb	135,91Aa
165	113,71Ba	114,04Ba

Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.3.3 Açúcares redutores (AR)

Para açúcares redutores, verifica-se efeito significativo entre as interações ambiente de armazenamento x período de armazenamento e tratamento fungicida x ambiente de armazenamento no embrião (Tabela 4A) e nas interações ambiente de armazenamento x período de armazenamento, tratamento fungicida x período de armazenamento e tratamento fungicida x ambiente de armazenamento no endosperma das sementes (Tabela 5A).

Pela Figura 11, observa-se que o teor de AR no embrião decresceu com o decorrer do armazenamento das sementes em ambos os ambientes. Entretanto, a partir de 105 dias os valores desses açúcares tenderam a declinar mais acentuadamente em embrião de sementes armazenadas em câmara fria do que naquelas armazenadas à temperatura ambiente. A redução nos teores de AR no embrião das sementes com o decorrer do armazenamento pode ser uma

conseqüência da demanda metabólica dessas sementes, as quais foram armazenadas com elevado grau de umidade, sendo os açúcares, utilizados como substrato na respiração. Entretanto, Wilson & McDonald (1986) afirmam que durante o processo deteriorativo das sementes ocorre uma redução em sua atividade respiratória, devido à quebra do gradiente protônico necessário para manter o processo respiratório.

Outra explicação para a redução no teor de açúcares redutores nas sementes durante o armazenamento pode ser a sua utilização na reação de Amadori e, subsequentemente, na de Maillard (Bernal-Lugo & Leopold 1992). Essas reações envolvem o ataque não enzimático ao grupamento amina de aminoácido e de proteínas pelos açúcares redutores, formando derivados frutossil ou glucosilamina (reação de Amadori), com a subsequente interação entre esses produtos, formando compostos poliméricos, responsáveis pela chamada “reação do escurecimento” (reação de Maillard) (Wettlaufer & Leopold, 1991). Trabalhando com sementes de soja envelhecidas artificialmente Wettlaufer & Leopold (1991) verificaram uma relação entre o aumento dos produtos de Maillard no eixo embrionário das sementes e o decréscimo na sua germinabilidade.

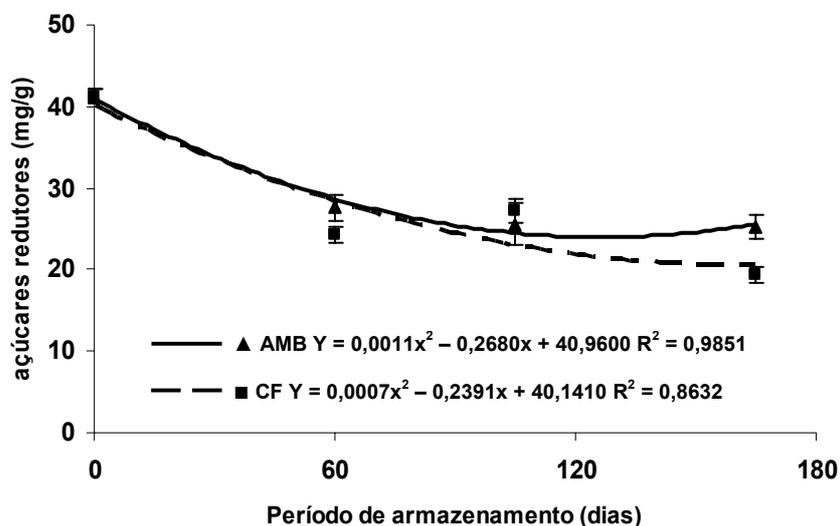


FIGURA 11 Estimativa do teor de açúcares redutores em embrião de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (câmara fria 10°C (CF) e temperatura ambiente \pm 20°C (AMB)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Maior teor de AR foi observado no embrião de sementes armazenadas à temperatura ambiente e sem tratamento fungicida (Tabela 3). Por outro lado, sementes tratadas com fungicidas apresentaram menores valores, provavelmente, devido à participação desses açúcares nas reações de Amadori e Maillard. Bernal-Lugo & Leopold (1992) observaram redução no teor de glicose, frutose e galactose durante o envelhecimento de sementes de milho e atribuíram a redução em seus níveis à participação dos mesmos nas reações de Amadori e Maillard.

Relacionando esses resultados com os obtidos nas avaliações fisiológicas (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6), observa-se que a maior quantidade de AR no embrião das sementes armazenadas à temperatura ambiente e sem tratamento

fungicida está associada à maior porcentagem de emergência de plântulas e vigor das sementes. Esses resultados corroboram com os observados por Bernal-Lugo & Leopold (1992), os quais relataram uma associação entre o declínio no teor de AR no embrião de sementes de milho e redução no vigor das sementes. No entanto, parece que os açúcares não são os únicos responsáveis por essa redução na germinabilidade e no vigor das sementes de seringueira, uma vez que seus valores não representam as diferenças observadas nos parâmetros fisiológicos avaliados, entre os tratamentos. Diversas alterações bioquímicas ocorrem durante a deterioração das sementes, no entanto, a exata causa da perda de sua viabilidade é ainda desconhecida (Sung, 1996).

TABELA 3 Resultados médios do teor de açúcares redutores em embrião de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (câmara fria 10°C e temperatura ambiente \pm 20°C) e do tratamento fungicida (tratada e não tratada). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Ambiente de armazenamento	Tratamento fungicida	
	Tratada	Não tratada
Temperatura ambiente	27,52Ab	32,33Aa
Câmara fria	27,97Aa	28,09Ba

Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pelos resultados apresentados na Figura 12, observa-se uma tendência de aumento no teor de AR no endosperma das sementes, quando acondicionadas à temperatura ambiente, até os 105 dias de armazenamento. A partir daí, nota-se um decréscimo nesse valor, entretanto, não atingindo teores inferiores ao observado no endosperma das sementes antes do armazenamento.

Para as sementes armazenadas em câmara fria, semelhantemente, ao observado naquelas acondicionadas à temperatura ambiente, verifica-se um incremento no teor de açúcares redutores nos primeiros dois meses de armazenamento. Vale ressaltar que esse aumento foi 27% superior ao observado no endosperma das sementes armazenadas à temperatura ambiente.

O aumento no teor de AR no endosperma das sementes em ambos os ambientes de armazenamento, provavelmente, tenha ocorrido em função da degradação de açúcares solúveis totais (Figura 10) como oligossacarídeos e sacarose pelas enzimas α galactosidase, SuSy e invertases, respectivamente ou pela hidrólise de lipídios, por ação de lipases e, posterior conversão dos ácidos graxos formados em açúcares, via gliconeogênese. Por outro lado, o maior acúmulo desses açúcares em sementes armazenadas em câmara fria, nos dois primeiros meses, pode ter ocorrido em função da menor respiração das sementes nessas condições. De acordo com Wilson & McDonald (1986), existe uma diminuição da atividade respiratória em sementes com a evolução do processo deteriorativo. Para os autores, isso ocorre devido ao aumento da peroxidação de lipídios, uma vez que, a membrana interna das mitocôndrias é rica em lipídios insaturados. Como consequência, há uma diminuição da fluidez das membranas e/ou um aumento na sua permeabilidade (Wilson & McDonald, 1986), culminando com a quebra do gradiente protônico necessário para manter o acoplamento respiratório (Moreland & Huber, 1978). Vale ressaltar que nas sementes acondicionadas nas condições de baixa temperatura, ocorreu maior queda no vigor e na porcentagem de emergência de plântulas (Avaliações fisiológicas - Figuras 2, 3, 4 e 6).

Contrariamente ao verificado no endosperma de sementes acondicionadas à temperatura ambiente, a partir do segundo mês de armazenamento o teor de AR do endosperma de sementes acondicionadas à baixa temperatura começou a decrescer, até atingir o valor de 16,5 mg/g aos 165

dias de armazenamento. Esse valor representa 26% menos AR em relação ao endosperma das sementes antes do armazenamento. A elevada queda no teor de AR, a partir do segundo mês, pode ser devido à participação desses açúcares nas reações de Amadori e Maillard (Feeney & Whitaker, 1982). Vale destacar que a redução no teor de AR no endosperma de sementes armazenadas em câmara fria, após os dois meses iniciais de armazenamento, está positivamente associada com a perda do vigor e da viabilidade das sementes (Figuras 2, 3, 4 e 6 – avaliações fisiológicas). Segundo Salisbury & Ross (1992), sérios distúrbios podem ocorrer nas células em virtude da perda dos açúcares redutores, uma vez que, alguns desses açúcares são importantes substratos para a respiração celular, enquanto outros são componentes estruturais de ácidos nucleicos, além de constituírem blocos básicos da construção de muitos outros carboidratos, incluindo amido e celulose.

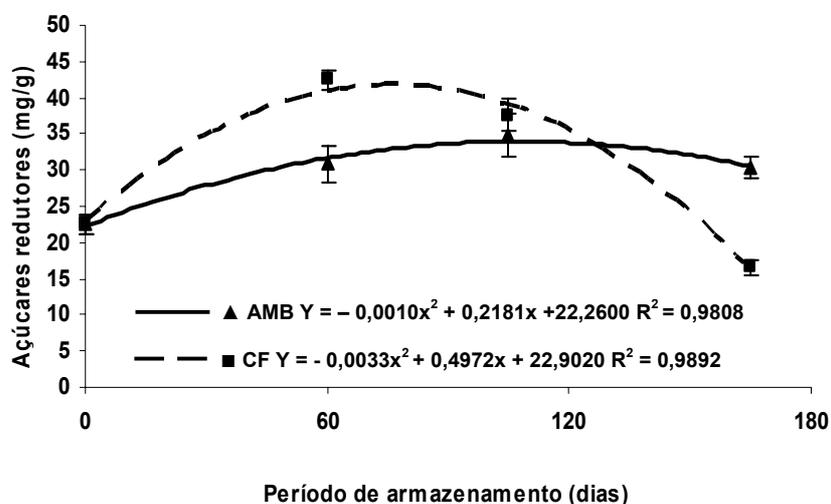


FIGURA 12 Estimativa do teor de açúcares redutores em endosperma de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (câmara fria 10°C (CF) e temperatura ambiente \pm 20°C (AMB)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Em relação ao tratamento fungicida (Figura 13), verifica-se um aumento no teor de AR, no endosperma das sementes, até os 80 dias de armazenamento, tanto em sementes tratadas como nas não tratadas com fungicidas. A partir daí, nota-se uma queda abrupta nesses valores, em ambos os tratamentos, não apresentando diferença estatística ao final do período de armazenamento.

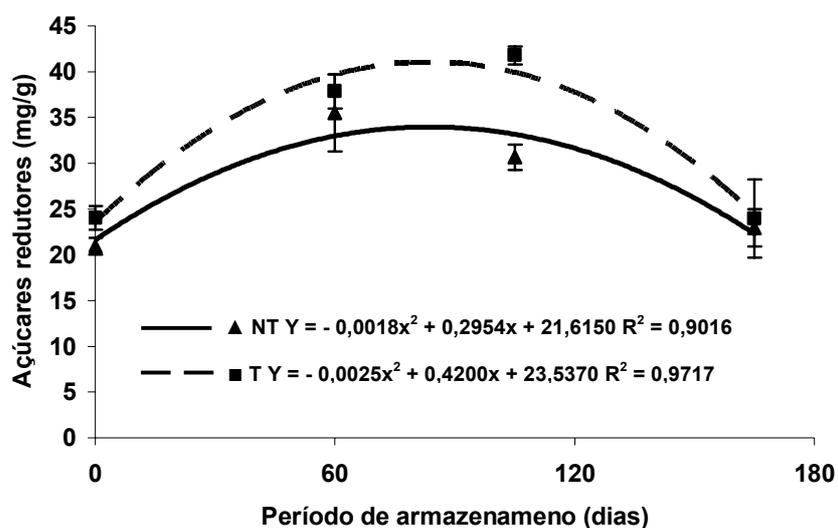


FIGURA 13 Estimativa do teor de açúcares redutores em endosperma de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida (tratada (T) e não tratada (NT)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Nas avaliações fisiológicas (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6), ficou evidenciado que o tratamento fungicida teve efeito negativo sobre a qualidade fisiológica das sementes. Entretanto, esse tratamento parece não proporcionar expressivas variações no teor de AR no endosperma das sementes, diferentemente do observado entre as diferentes temperaturas de armazenamento, nas quais notaram-se grandes alterações nos níveis desses açúcares (Figura 12).

Quando se avalia a interação ambiente de armazenamento x tratamento fungicida (Tabela 4), verificam-se menores valores de AR em endosperma de sementes sem tratamento fungicida e armazenadas à temperatura ambiente quando comparado aos demais tratamentos. Esses resultados diferem daqueles observados para o embrião das sementes (Tabela 3), nas quais se verificaram maiores teores de açúcares redutores nessas condições. Talvez o maior acúmulo de AR no endosperma das sementes, quando armazenadas em câmara fria e/ou tratadas (condições prejudiciais à qualidade fisiológica das sementes – avaliações fisiológicas), seja em decorrência da maior hidrólise de lipídios no endosperma das sementes nessas condições e não devido à diminuição das reações de Amadori e Maillard.

TABELA 4 Resultados médios de teor de açúcares redutores em endosperma de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (temperatura ambiente \pm 20°C e câmara fria 10°C) e do tratamento fungicida (tratado e não tratado). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Ambiente de armazenamento	Tratamento fungicida	
	Tratada	Não tratada
Temperatura ambiente	33,26 Aa	25,96 Bb
Câmara fria	30,54 Ba	29,06 Aa

Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.3.4 Lipídios

Em relação à composição lipídica, foi verificado efeito significativo para o fator ambiente de armazenamento e para a interação tratamento fungicida x período de armazenamento, no embrião (Tabela 4A) e para a interação tripla tratamento fungicida x ambiente de armazenamento x período de armazenamento, no endosperma (Tabela 5A).

De maneira geral, verificam-se altos teores de lipídios tanto no embrião (Figura 18) quanto no endosperma (Figura 22) das sementes de seringueira. Com superioridade em 21 pontos percentuais desse último em relação ao observado no embrião das sementes, antes do armazenamento.

O alto teor de lipídios pode ser comprovado pela fotomicrografia de cotilédones (Figura 14) e pelas eletromicrografias de varredura (Figuras 15, 16 e 17) de sementes de seringueira, nas quais, se verificam grandes quantidades de oleossomos aderidos às membranas celulares e dispersos no citoplasma. Segundo Aigbodion (1994), as sementes de seringueira possuem em média 43% de lipídios, sendo esse o seu principal componente de reserva. De acordo com Taiz & Zeiger (2004), óleos e gorduras são formas importantes de armazenagem de carbono reduzido em muitas espécies de importância econômica como soja, amendoim e algodão.



FIGURA 14 Fotomicrografia de cotilédone de sementes de seringueira, corado com Sudan IV, antes do armazenamento. A coloração alaranjada evidencia a presença de lipídios. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Verifica-se ainda nas Figuras 15 e 16 a formação de coalescência de lipídios, dando origem, a uma grande estrutura compacta. A coalescência dos corpos lipídicos pode ocorrer em função da redução de enzimas denominadas de oleosina. Essas enzimas cobrem a superfície dos oleossomos e impedem que os fosfolipídios de corpos lipídicos adjacentes entrem em contato e se fusionem (Taiz & Zeiger 2004). A formação de coalescência lipídica foi positivamente correlacionada à deterioração de sementes de *Coffea canephora* durante o armazenamento (Brandão Jr., 2000). Dessa maneira, pode ser que no presente trabalho, o aparecimento dessas estruturas nos cotilédones de sementes de seringueira possa estar envolvido com o avanço de sua deterioração.

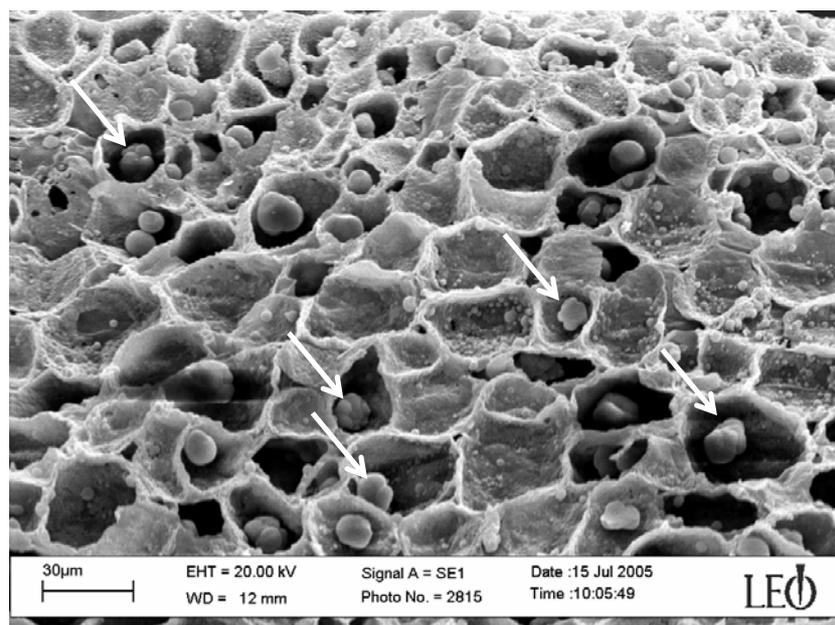


FIGURA 15 Eletromicrografias de varredura de cotilédones de sementes de seringueira armazenadas por 120 dias à temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$. As setas evidenciam a coalescência de corpos lipídicos. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Ainda em relação ao embrião, observa-se um acréscimo no teor de lipídios com o decorrer do armazenamento das sementes, tanto em sementes tratadas com fungicidas quanto naquelas não tratadas (Figura 18). Priestley & Leopold (1979), encontraram resultados semelhantes em sementes de *Glycine max* submetidas ao envelhecimento acelerado, tendo sido detectado um aumento de 20% no teor de lipídios. Resultado similar também foi verificado por Ramos & Souza (1991) em sementes de *Araucária angustifolia* armazenadas. De acordo com os autores, existe alguma ligação entre o acréscimo desse componente e a perda da viabilidade das sementes.

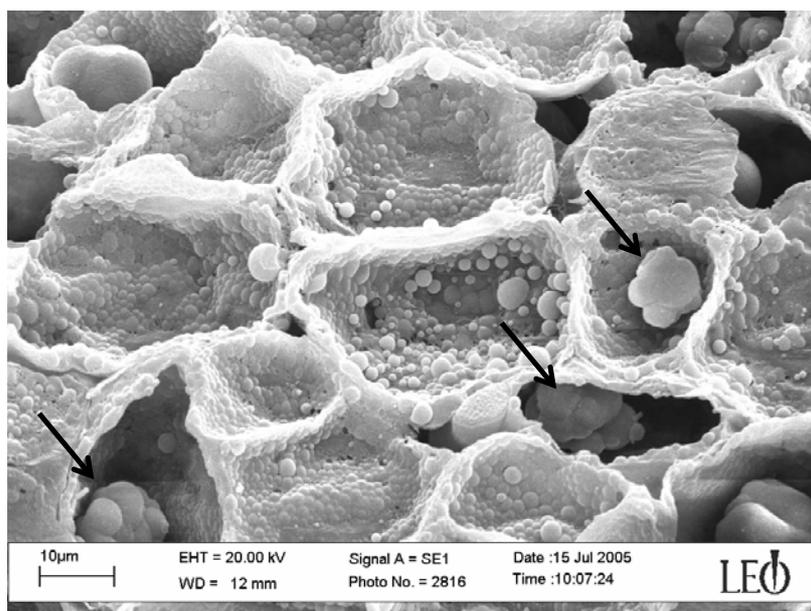


FIGURA 16 Eletromicrografias de varredura de cotilédones de sementes de seringueira armazenadas por 120 dias à temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$. As setas evidenciam a coalescência de corpos lipídicos. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Para o embrião de sementes tratadas com fungicidas (Figura 18), verifica-se uma elevação linear no teor de lipídios, atingindo ao fim de 165 dias o valor de 47%, teor 19% superior ao observado no embrião das sementes antes do armazenamento. Já no embrião de sementes não tratadas, o teor de lipídios permaneceu estável nos primeiros 60 dias de armazenamento e a partir daí tendeu a subir com o decorrer desse período. Entretanto, esse acréscimo foi sempre inferior ao observado no embrião das sementes tratadas.

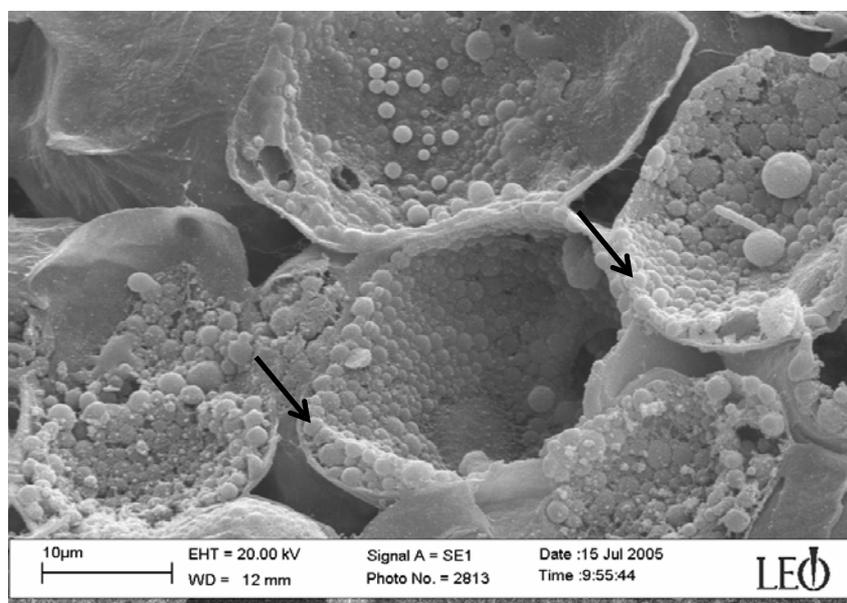


FIGURA 17 Eletromicrografias de varredura de cotilédones de sementes de seringueira armazenadas por 120 dias à temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$. As setas evidenciam os oleossomos aderidos às membranas celulares. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Estes resultados sugerem a ocorrência de biossíntese de lipídios no embrião das sementes com o decorrer do armazenamento. De acordo com Kermode (1990), uma das principais diferenças entre as sementes ortodoxas e as recalcitrantes é a capacidade da primeira em tolerar um essencial processo de dessecação ao final da maturação das sementes. Por esse processo, permite-se que as sementes mudem seu metabolismo de desenvolvimento para o de germinação. O mesmo não ocorre em sementes recalcitrantes, o que sugere a hipótese de que essas sementes apresentam um desenvolvimento incompleto (Farrant et al., 1997). De acordo com Marcos Filho (2005), nas sementes recalcitrantes, em média, apenas 60% das células estão em fase de pré-replicação celular no momento da maturidade fisiológica, de modo que a continuidade do metabolismo em sementes mais úmidas pode ser considerada o fator determinante da sensibilidade à dessecação.

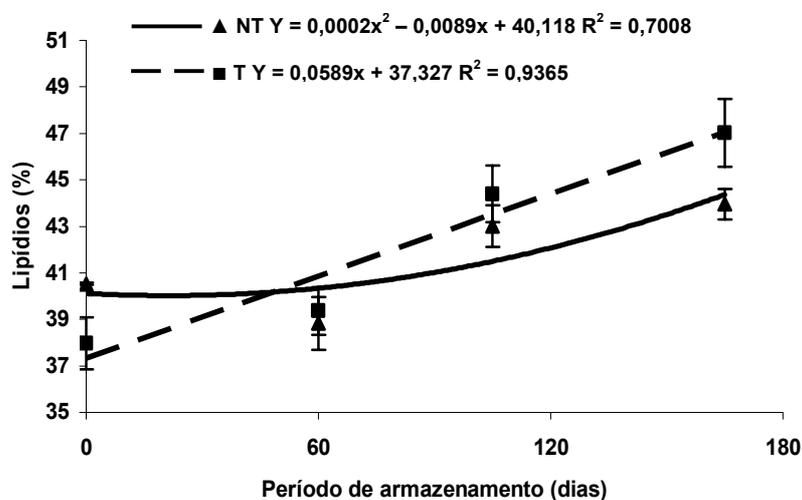


FIGURA 18 Estimativa do teor de lipídios no embrião de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida (tratada (T) e não tratada (NT)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Dessa maneira, tem sido sugerido que sementes com característica recalcitrante continuam o seu desenvolvimento após a abscisão da planta-mãe. Esse fato pode ser evidenciado por meio das Figuras 19, 20 e 21, nas quais é observada a divisão celular no eixo embrionário das sementes ao zero, 60 e 105 dias de armazenamento, indicando que os embriões ainda estavam em processo de formação nesses períodos. Isso pode justificar a elevação no teor de lipídios no embrião das sementes durante o armazenamento, uma vez que tais componentes são essenciais à estruturação de membranas celulares, além de constituírem a principal substância de reserva das sementes desta espécie.

Vale ressaltar que na presente pesquisa não foi observada germinação das sementes nas embalagens durante o armazenamento, o que descarta a possibilidade da divisão celular ter ocorrido em função do início da germinação das sementes. Por outro lado, resultados de pesquisas recentes com embrião de sementes de café (Silva, 2002) e embrião de sementes de tomate (Castro et al., 2000) evidenciam a ocorrência de divisão celular precedendo o início da protrusão radicular (germinação).

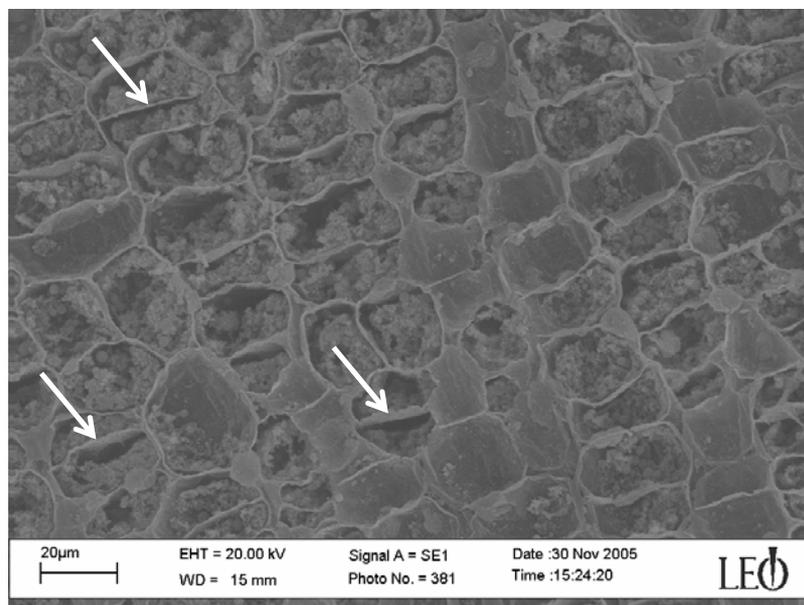


FIGURA 19 Micrografias de varredura de eixo embrionário de sementes de seringueira armazenadas por 105 dias à temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$. As setas evidenciam a divisão celular. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Pelos resultados apresentados na Tabela 5, observa-se maior teor de lipídios no embrião de sementes armazenadas em câmara fria do que naquelas armazenadas à temperatura ambiente. Provavelmente, isso tenha ocorrido devido à menor taxa respiratória do embrião nas sementes acondicionadas em baixa temperatura, sendo necessário consequentemente, uma menor degradação de lipídios para gerar substrato para a respiração.

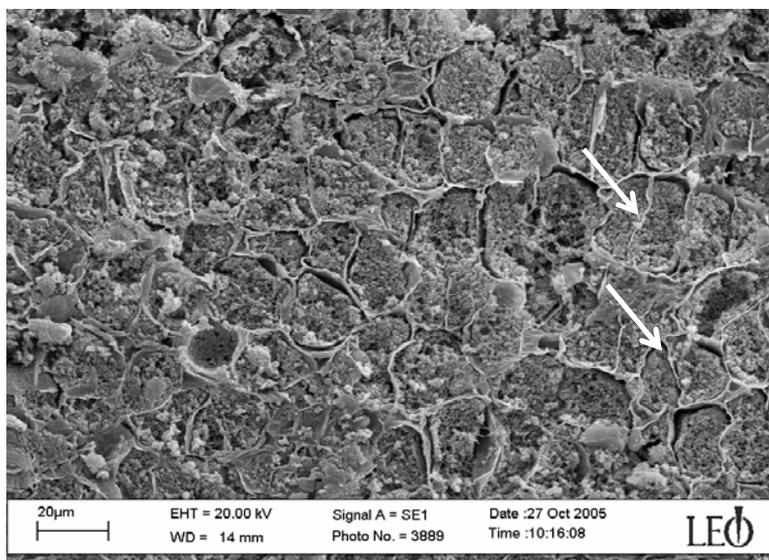


FIGURA 20 Micrografias de varredura de eixo embrionário de sementes de seringueira armazenadas por 60 dias à temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$. As setas evidenciam a divisão celular. UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 5 Resultados médios de teor de lipídios em embrião de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$ e câmara fria 10°C). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Ambiente de armazenamento	Teor de lipídios (%)
Temperatura ambiente	41,20B
Câmara fria	42,57A

Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

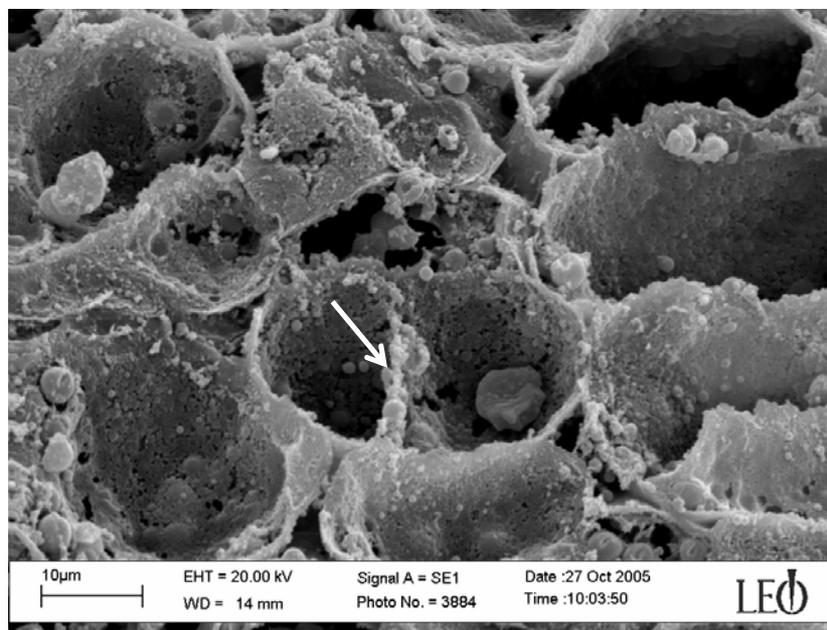


FIGURA 21 Micrografias de varredura de eixo embrionário de sementes de seringueira antes do armazenamento. As setas evidenciam a divisão celular. UFLA, Lavras, MG, 2006.

No endosperma das sementes (Figura 22) verifica-se uma tendência de queda no teor de lipídios com o decorrer do armazenamento das sementes em todos os tratamentos. Redução no teor de lipídios com o avanço da deterioração das sementes tem sido amplamente relatada na literatura. De acordo com Kalpana & Madhava Rao (1996), a deterioração da membrana durante o envelhecimento é frequentemente associada com o decréscimo no conteúdo de fosfolipídio total, bem como, com a redução de ácidos graxos polinsaturados (Linn & Pearce, 1990), os quais são a fonte de substrato para a peroxidação de lipídios (Stewart & Bewley, 1980).

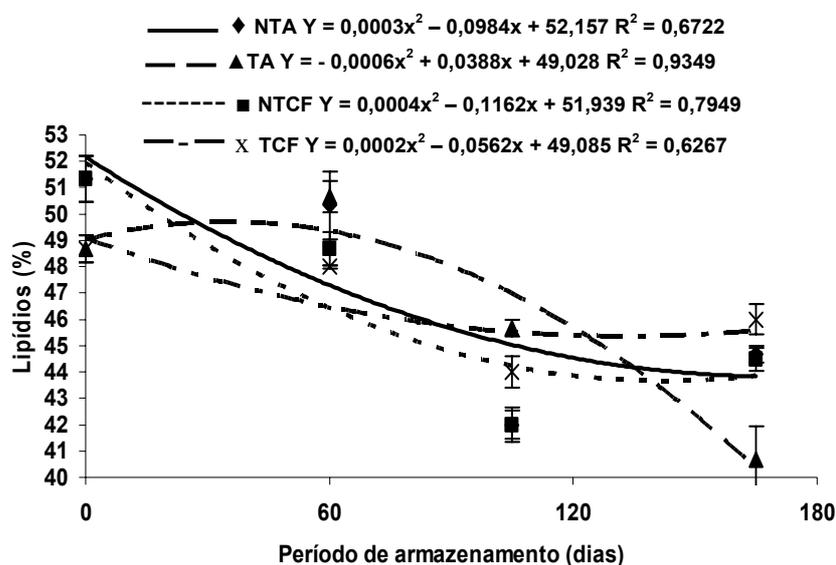


FIGURA 22 Estimativa do teor de lipídios em endosperma de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (câmara fria 10°C (CF) e temperatura ambiente \pm 20°C (A)), do tratamento fungicida (tratada (T) e não tratada (NT)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

4.3.5 Peroxidação de lipídios

Para os dados de peroxidação de lipídios, avaliada pela quantidade de MDA foi detectada diferença significativa para a interação tripla tratamento fungicida x ambiente de armazenamento x período de armazenamento (Tabela 3A).

Verifica-se por meio da Figura 23 que houve um acréscimo no teor de MDA nas sementes nos primeiros 105 dias de armazenamento em todos os tratamentos avaliados, com tendência de queda após esse período. Exceção feita

para as sementes armazenadas à temperatura ambiente e não tratadas com fungicidas, cujo valor de MDA tendeu a decrescer com o decorrer do armazenamento. Estes resultados indicam a ocorrência de peroxidação de lipídios nas sementes de seringueira durante o armazenamento. Stewart & Bewley (1980), avaliando a peroxidação de lipídios em eixo embrionário de sementes de soja submetidas ao envelhecimento acelerado, encontraram resultados semelhantes, nos quais se verificou incremento no nível de MDA nos primeiros dias de envelhecimento e posterior queda nesses valores com o avanço do mesmo. Os autores sugeriram que o decréscimo no nível de MDA ocorreu em função da redução no teor do ácido graxo insaturado (ácido linolênico) precursor dessa reação, ou ainda, devido à facilidade de oxidação do MDA (Beuge & Aust, 1978). Zacheo et al. (2000) estudando as alterações bioquímicas em sementes de amendoim após o armazenamento também verificaram redução nos teores de ácidos graxos insaturados, linoléico e linolênico.

Quando se compara o ambiente de armazenamento, observa-se que as sementes armazenadas à baixa temperatura, 10°C, apresentaram maiores valores de MDA do que aquelas armazenadas à temperatura ambiente (Figura 23). No entanto, vale ressaltar que as sementes tratadas e armazenadas à temperatura ambiente apresentaram aos 105 dias valores de MDA próximos aos observados em sementes armazenadas em câmara fria. Esses resultados corroboram com os observados no teste de emergência de plântulas e de vigor (avaliações fisiológicas – Figuras 2, 3, 4, 5, 6), nos quais foi verificado que a baixa temperatura de armazenamento e o tratamento fungicida afetaram negativamente a qualidade fisiológica das sementes. A peroxidação de lipídios associada ao estresse oxidativo por radicais livres tem sido considerada uma das principais responsáveis pela deterioração de sementes (Murthy & Sun 2000), podendo afetar a estrutura e a função das membranas celulares, incluindo a inativação de

proteínas da membrana e sua permeabilidade (Hendry, 1993; Priestley, 1986; Wilson & McDonald, 1986).

Em relação ao tratamento fungicida verifica-se pela Figura 23 que este também contribuiu para a elevação no teor de MDA das sementes, cujos valores diferenciaram-se estatisticamente em relação às sementes não tratadas somente nos períodos finais de armazenamento.

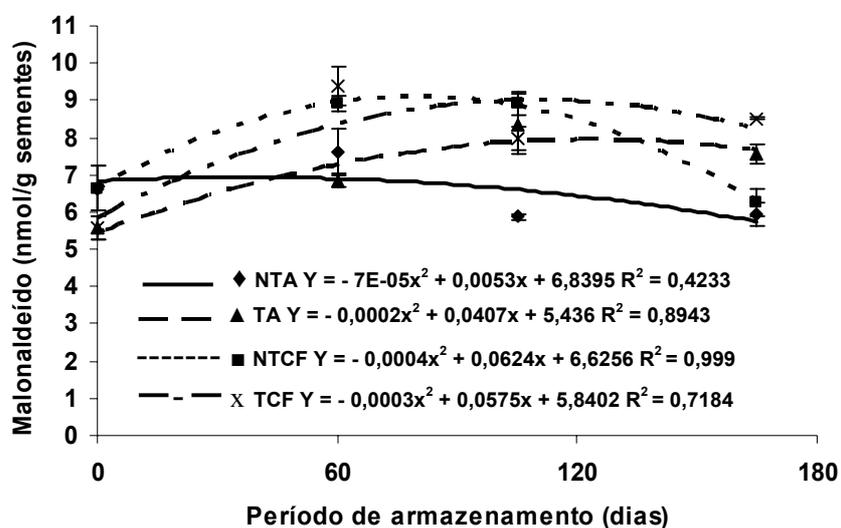


FIGURA 23 Estimativa de peroxidação de lipídios em sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (câmara fria 10°C (CF) e temperatura ambiente 20°C (A)), do tratamento fungicida (tratada (T) e não tratada (NT)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

4.3.6 Proteínas

Quanto ao teor de proteínas solúveis totais verifica-se significância para a interação tripla tratamento fungicida x ambiente de armazenamento x período

de armazenamento no embrião das sementes (Figura 4A) e interação dupla ambiente de armazenamento x período de armazenamento no endosperma (Tabela 5A).

Nas Figuras 24 e 25, estão apresentadas as alterações no teor de proteínas solúveis totais no embrião e no endosperma de sementes de seringueira, respectivamente. Comparando-se as duas figuras, nota-se que o endosperma das sementes possui cerca de 8% mais proteínas do que o embrião, cujos valores médios foram de 140mg/g e 130mg/g, respectivamente. Esses valores estão um pouco abaixo dos observados por Paula (1997), cujo teor de proteínas solúveis totais encontrados foi de 18%. Provavelmente, essa diferença ocorreu em decorrência das distintas metodologias utilizadas entre os trabalhos. No presente estudo utilizou-se a extração sequencial das proteínas de acordo com Osborne (1924), para sua quantificação e no conduzido por Paula foi utilizado o método que Kjeldhal, que se baseia na determinação do nitrogênio total. Esse método quantifica, além das proteínas solúveis, também as insolúveis. Além disso, de acordo com Morrison (1992), quando se utiliza o método de Kjeldhal para a quantificação de proteínas, parte do nitrogênio determinado pode ser proveniente de lipídios, fazendo com que os valores de proteínas sejam superestimados.

Por outro lado, o valor de proteínas solúveis encontrado por Alencar (2003), em endosperma de sementes de seringueira foi 29% inferior ao observado no presente trabalho, embora se tenha utilizado o mesmo procedimento de extração. Possivelmente, a diferença no teor de proteínas solúveis nos distintos estudos, seja em decorrência da dificuldade de preservação da mesma quantidade de material durante todas as extrações. Pois a cada centrifugação com os diferentes solventes foi necessária a filtragem do sobrenadante com papel de filtro e posterior recuperação de parte da amostra aderida ao mesmo, uma vez que, foi observado que a velocidade de

centrifugação utilizada no presente trabalho não foi suficiente para que o precipitado ficasse completamente aderido ao tubo de centrifugação. Esse procedimento de filtragem não foi realizado por Alencar.

Outra possibilidade é a variação no teor de proteínas entre os materiais. Agunbiagle et al. (1995) relataram que a concentração de proteínas totais em endosperma de sementes de seringueira pode variar. Os mesmos autores encontraram valores entre 16,8 e 22,4%. De acordo com Marcos Filho (2005) fatores como: genótipo, condições climáticas, idade das sementes, fertilidade do solo e nutrição da planta mãe podem afetar a composição química das sementes.

Observando os dados apresentados na Figura 24, nota-se uma grande redução no teor de proteínas, no embrião das sementes (aproximadamente 45% para sementes armazenadas em câmara fria e 41% para as armazenadas à temperatura ambiente), nos primeiros 105 dias de armazenamento, tanto em sementes tratadas como nas não tratadas com fungicidas. A partir daí, nota-se uma estabilização no teor de proteínas no embrião de sementes armazenadas à temperatura ambiente e uma tendência de acréscimo no embrião de sementes armazenadas em câmara fria.

Declínio no teor de proteínas com o decorrer do armazenamento também foi observado por Chaitanya et al. (2000) em sementes de *Shorea robusta*. Para Smith & Berjak (1995), a redução no teor de proteínas durante o envelhecimento das sementes ocorre em virtude do aumento da atividade proteolítica. Entretanto, outros fatores além do incremento da atividade proteolítica podem contribuir para a diminuição do teor de proteínas (Chaitanya et al., 2000). Gutteridge & Halliwell (1990) consideram a degradação de proteínas como uma das principais conseqüências da peroxidação de lipídios. Comparando-se a Figura 23 com a 24, nota-se que os maiores teores de malonaldeído está associado aos menores valores de proteínas solúveis no embrião.

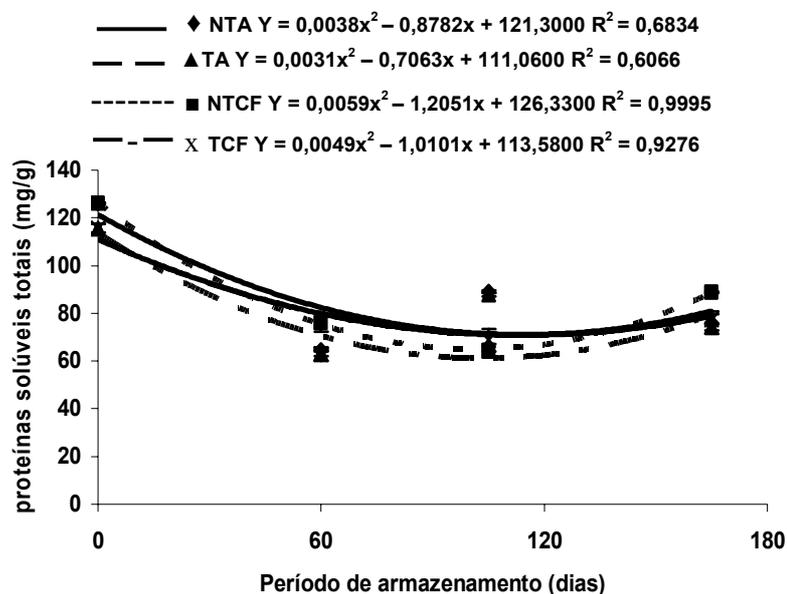


FIGURA 24 Estimativa do teor de proteínas solúveis totais em embrião de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (câmara fria 10°C (CF) e temperatura ambiente \pm 20°C (A)), do tratamento fungicida (tratada (T) e não tratada (NT)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

No endosperma (Figura 25), similarmente ao observado no embrião ocorre um decréscimo no teor de proteínas solúveis totais com o decorrer do armazenamento, tanto em sementes acondicionadas à temperatura ambiente quanto naquelas em câmara fria. Estes resultados sugerem, mais uma vez, a provável degradação das proteínas por meio do incremento da atividade proteolítica (Dunlop et al., 2002), além da destruição dessas proteínas como consequência da peroxidação de lipídios (Araújo, 1995).

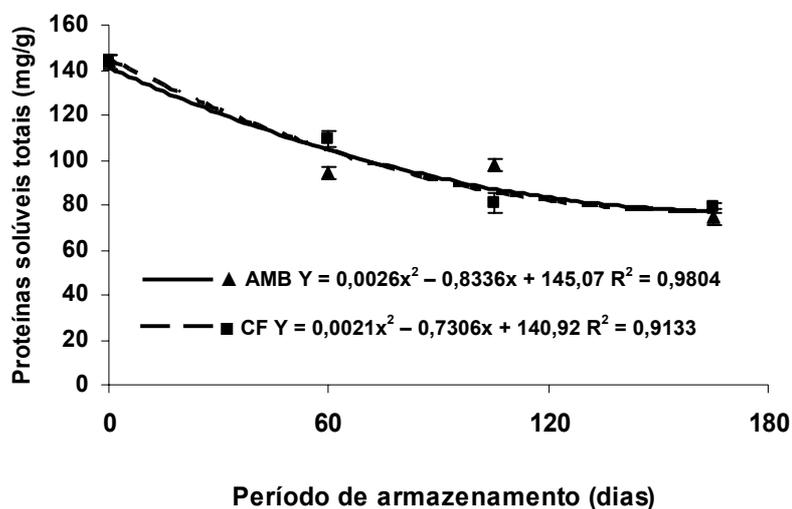


FIGURA 25 Estimativa do teor de proteínas solúveis totais em endosperma de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (câmara fria 10°C (CF) e temperatura ambiente \pm 20°C (AMB)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Nas Figuras 26 e 27, estão representadas as frações de proteínas solúveis no embrião durante o armazenamento das sementes à temperatura ambiente e em câmara fria, respectivamente.

Na temperatura ambiente a fração dominante – a glutelina – declina severamente nos 60 dias iniciais de armazenamento, com posterior acréscimo no seu valor aos 105 dias e novamente tendência de queda após esse período. Na fração de albuminas, verifica-se uma queda no seu teor até os 105 dias de armazenamento das sementes e um ligeiro acréscimo após esse período. Já nas menores frações, globulinas e prolaminas verificam-se declínio nos seus valores com o decorrer do armazenamento das sementes.

O declínio mais acentuado nos primeiros meses de armazenamento das sementes para todas as frações protéicas, provavelmente, está associado à maior ocorrência de peroxidação lipídica (Figura 23), bem como maior atividade proteolítica nesse período. Por outro lado, a elevação no teor de algumas frações de proteínas após os dois primeiros meses de armazenamento pode ser em decorrência da diminuição da peroxidação de lipídios (Figura 23), talvez devido à redução de substrato para a sua ocorrência (Stewart & Bewley 1980). Além disso, pode ter ocorrido uma diminuição na atividade proteolítica. Chaitanya et al. (2000) estudando alterações no teor de proteínas e na atividade proteolítica durante o envelhecimento de sementes de *Shorea robusta* verificaram declínio na atividade proteolítica após determinado período de envelhecimento das sementes.

Outra explicação para o aumento nas frações glutelinas e albuminas no embrião das sementes durante o armazenamento é a possibilidade de estar ocorrendo síntese desse componente, uma vez que foi observado que até os 105 dias de armazenamento das sementes estava ocorrendo divisão celular no eixo embrionário (Figuras 19, 20 e 21).

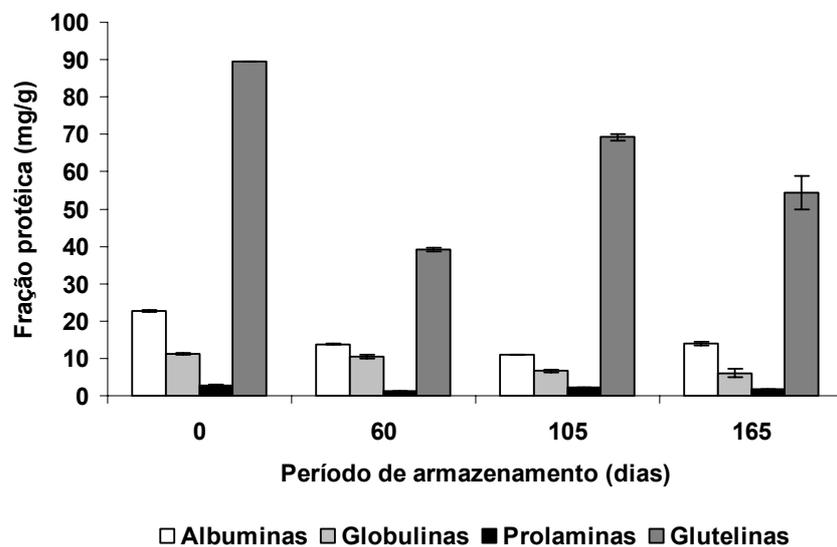


FIGURA 26 Conteúdo de frações de proteínas solúveis em embrião de sementes de seringueira durante o armazenamento a temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$. As barras nas colunas exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A variação nas frações de proteínas solúveis em embriões de sementes armazenadas em câmara fria (Figura 27) foi semelhante ao observado em sementes armazenadas à temperatura ambiente. Exceção feita à fração glutelina aos 105 dias de armazenamento a qual não apresentou diferença estatística do valor observado aos 60 dias de armazenamento.

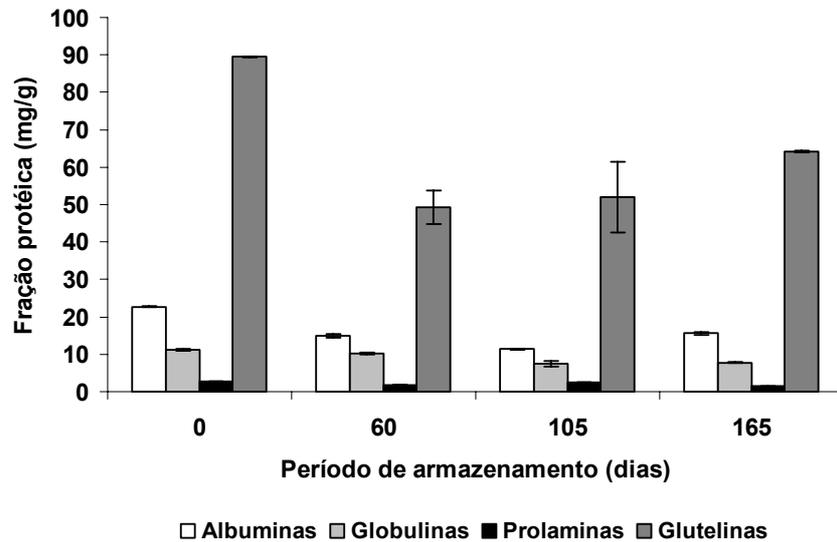


FIGURA 27 Conteúdo de frações de proteínas solúveis em embrião de sementes de seringueira durante o armazenamento em câmara fria 10°C. As barras nas colunas exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Nas Figuras 28 e 29 estão representadas as frações protéicas em endosperma de sementes de seringueira acondicionadas à temperatura ambiente e em câmara fria, respectivamente, durante o armazenamento.

No endosperma similarmente ao observado no embrião das sementes, a maior fração protéica foi de glutelinas. Esses resultados corroboram com os observados por Alencar (2003), o qual também verificou maiores teores de glutelina no endosperma de sementes de seringueira. Comparando-se o valor inicial dessa fração no endosperma com o do embrião, nota-se uma superioridade do primeiro em relação ao segundo.

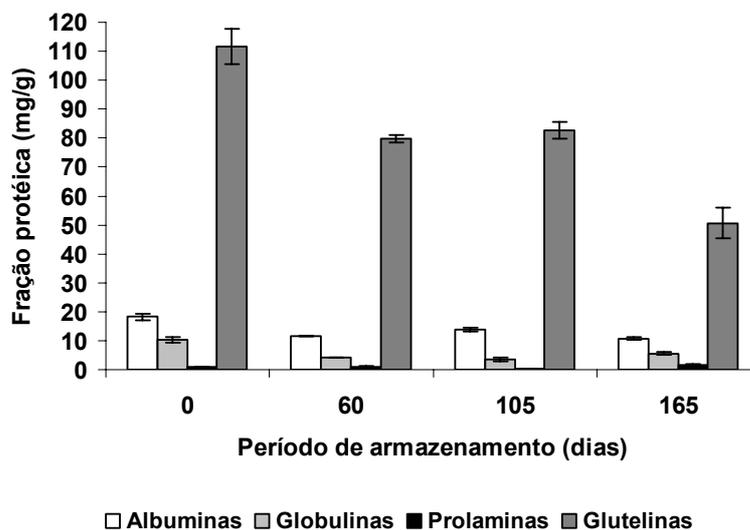


FIGURA 28 Conteúdo de frações de proteínas solúveis em endosperma de sementes de seringueira durante o armazenamento à temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$. As barras nas colunas exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Nota-se ainda, pelas Figuras 28 e 29, uma redução no teor de glutelina durante o armazenamento, tanto no endosperma de sementes armazenadas à temperatura ambiente quanto naquelas acondicionadas em câmara fria. Exceção feita para o endosperma de sementes armazenadas por 105 dias à temperatura ambiente, cujo valor não diferiu estatisticamente do observado aos 60 dias de armazenamento. Vale ressaltar, que ao final do período de armazenamento os valores observados para a fração glutelina no endosperma foram inferiores aos do embrião das sementes, provavelmente, devido à síntese dessas proteínas no embrião, associado à maior degradação das mesmas no endosperma.

Em relação às albuminas, verificam-se menores valores dessa fração no endosperma quando comparado ao embrião das sementes, independentemente do ambiente de armazenamento. No entanto, sua resposta se assemelha à observada no embrião, cujos valores oscilaram durante o armazenamento. Porém, quando se compara o valor de albuminas antes do armazenamento com o observado ao fim dele, nota-se uma redução dessa fração no endosperma com o armazenamento das sementes. De acordo com Palmiano & Juliano (1972), a degradação das albuminas por proteases libera aminoácidos livres para a síntese de novas proteínas solúveis (enzimas).

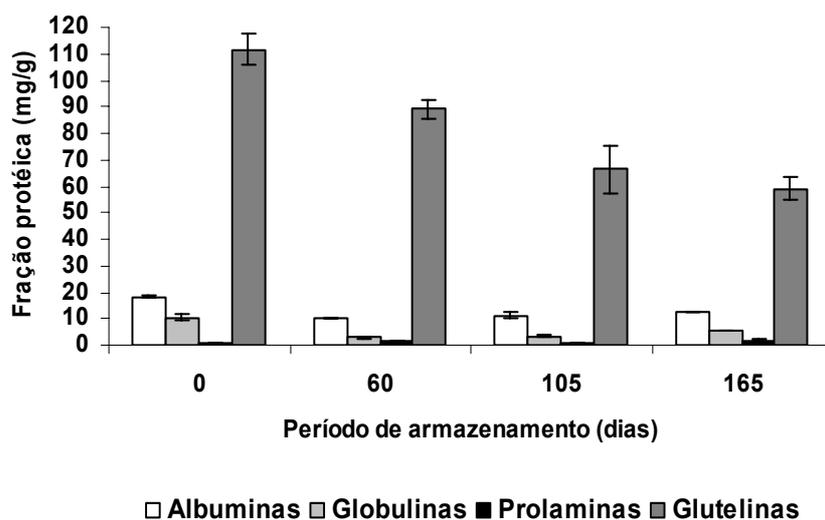


FIGURA 29 Conteúdo de frações de proteínas solúveis em endosperma de sementes de seringueira durante o armazenamento em câmara fria a 10°C. As barras nas colunas exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

As frações das globulinas e prolaminas, as menores frações protéicas do endosperma, também apresentam valores inferiores quando comparados aos do embrião das sementes, considerando que as globulinas tiveram um grande decréscimo com o armazenamento das sementes e a prolaminas estiveram quase inexistentes em todos os períodos de avaliação.

4.3.7 Aminoácidos

O resumo da análise de variância dos teores de aminoácidos em embriões e endospermas de sementes de seringueira está apresentado nas Tabelas 4A e 5A, respectivamente.

Para o embrião verifica-se interação tripla, tratamento fungicida x ambiente de armazenamento x período de armazenamento e para o endosperma observa-se significância apenas para o fator período de armazenamento.

Observa-se no embrião (Figura 30), que ocorreu um pequeno decréscimo no teor de aminoácidos, em todos os tratamentos, nos primeiros 60 dias de armazenamento das sementes. Entretanto, esperava-se um aumento, resultante da degradação de proteínas por proteases. Segundo Smith & Berjak (1995), ocorre um acréscimo no conteúdo de aminoácidos com o envelhecimento das sementes devido ao aumento da atividade proteolítica. Provavelmente, o não-acúmulo de aminoácidos no embrião das sementes, nos meses iniciais de armazenamento, deu-se em função da sua destruição por meio dos produtos da peroxidação de lipídios. Comparando-se a Figura 23 com a 30, verifica-se uma associação entre altos níveis de malonaldeído e baixos níveis de aminoácidos. Para Araújo (1994), uma das principais conseqüências da peroxidação de lipídios é a destruição de aminoácidos, especialmente metionina, lisina, histidina, cisteína e triptofano.

Outra possibilidade para o não-acúmulo de aminoácidos nos primeiros 105 dias de armazenamento seria sua destruição pela ocorrência das reações de

Amadori e Maillard (Wettlaufer & Leopold, 1991). Essas reações são caracterizadas pelo ataque não enzimático aos grupos amins pelos açúcares redutores. Comparando-se os resultados apresentados para açúcares redutores (Figura 11) e aminoácidos (Figura 30), observa-se uma associação entre os dados. Paula (1997), também trabalhando com sementes de seringueira, verificou um comportamento semelhante nos resultados de aminoácidos e de açúcares redutores e sugeriu que os aminoácidos poderiam estar sendo atacados pelos açúcares redutores nas reações de Amadori e Maillard.

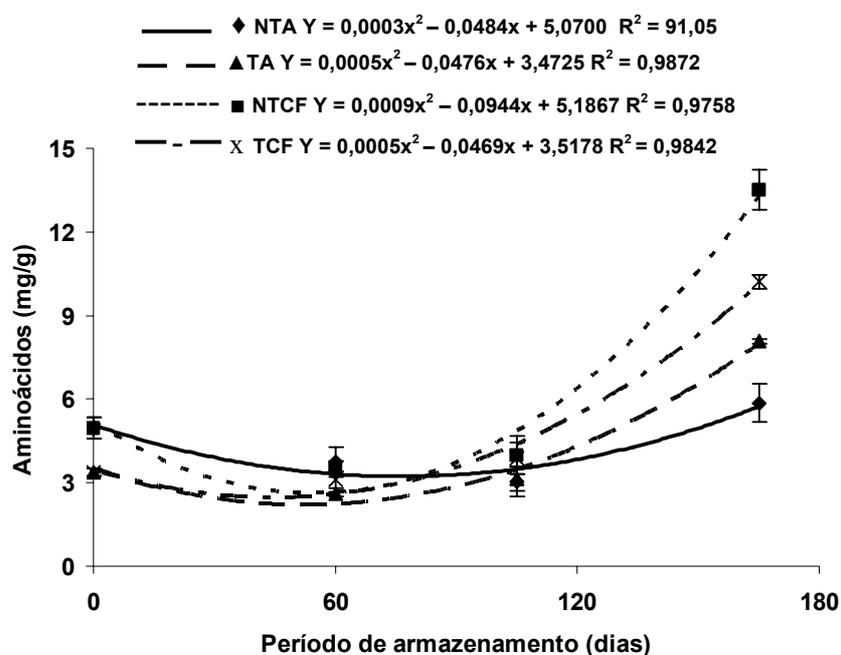


FIGURA 30 Estimativa do teor de aminoácidos em embrião de sementes de seringueira em função do ambiente de armazenamento (câmara fria 10°C (CF) e temperatura ambiente ± 20°C (A)), do tratamento fungicida (tratada (T) e não tratada (NT)) e do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

No fim do período de armazenamento, nota-se uma elevação no teor de aminoácidos em todos os tratamentos, cujos valores diferiram estatisticamente, sendo o mais alto observado no embrião de sementes armazenadas em câmara fria e não tratadas, seguidas pelo embrião de sementes tratadas e armazenadas nas mesmas condições. Nesse último por sua vez, foi observado valor superior ao do embrião de sementes tratadas e armazenadas à temperatura ambiente, que, por outro lado, foi mais elevado do que o observado no embrião de sementes não tratadas e armazenadas nas mesmas condições. Esse acúmulo de aminoácidos no fim do período de armazenamento, provavelmente, ocorreu em função da redução na peroxidação de lipídios (Figura 23) e das reações de Amadori e Maillard, esta última, sugerida devido à manutenção no teor de açúcares redutores (Figura 11).

Os valores e as alterações nos níveis de aminoácidos no endosperma (Figura 31) seguiram os mesmos padrões do observado no embrião das sementes, no qual foi observado pequeno decréscimo no seu teor nos primeiros 60 dias de armazenamento e posterior acúmulo até o fim desse período. O não-acúmulo de aminoácidos nos períodos iniciais de armazenamento, no endosperma, parece estar mais relacionado à alta peroxidação de lipídios, verificada nesse período (Figura 23), do que à destruição desses pelas reações de Amadori e Maillard. Visto que, ao se compararem os dois resultados, Figura 12 e 31 esses não apresentam associação. Já o aumento no teor de aminoácidos no fim do período de armazenamento das sementes, provavelmente, ocorreu devido à queda da peroxidação de lipídios, observada neste período (Figura 23), associado à continuidade da degradação de proteínas no endosperma (Figura 25).

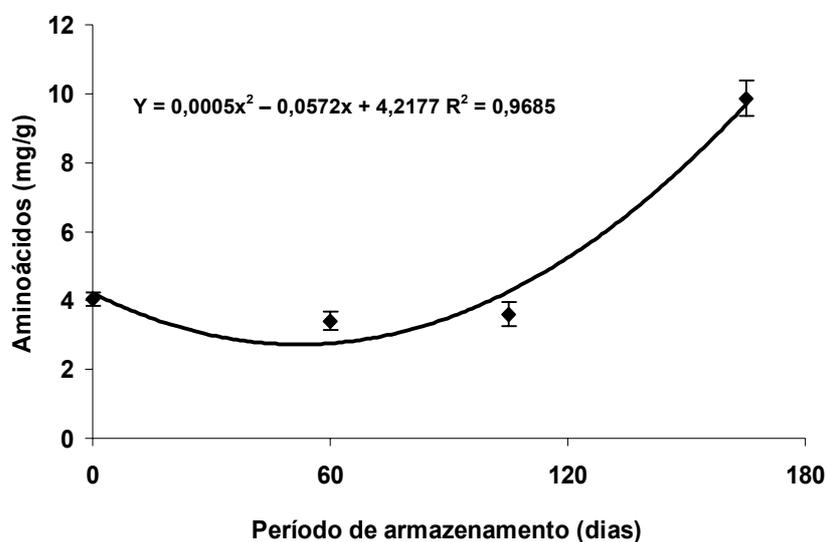


FIGURA 31 Estimativa do teor de aminoácidos em endosperma de sementes de seringueira em função do período de armazenamento (0, 60, 105 e 165 dias). As barras exibem o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2006.

4.4 Avaliações moleculares

Nos perfis isoenzimáticos de embrião de sementes de seringueira, verificou-se, para a álcool desidrogenase (ADH), uma diminuição da intensidade das bandas com o aumento do período de armazenamento das sementes (Figura 32 a e b), independentemente, se armazenadas à temperatura ambiente ou em câmara fria. Vale ressaltar, no entanto, que no embrião de sementes acondicionadas em câmara fria, a intensidade e o número de bandas foram maiores do que naquelas à temperatura ambiente.

Esses resultados estão de acordo com os observados por Brandão Junior (1996), o qual verificou redução na intensidade de banda, da ADH, com o aumento do tempo de envelhecimento de sementes de milho. Throneberry &

Smith (1955) também observaram correlação positiva entre a viabilidade de sementes de milho e a atividade da álcool desidrogenase.

A álcool desidrogenase é uma enzima que atua no metabolismo anaeróbico de plantas, reduzindo o acetaldeído a etanol. Em estudos de efeitos de voláteis endógenos no processo de deterioração de sementes Zhang et al. (1994) verificaram maior efeito danoso do acetaldeído nas sementes, independentemente da umidade relativa e da temperatura do ambiente de armazenamento, quando comparado ao etanol. De acordo com os autores, esse último só causou deterioração das sementes em condição de umidade relativa alta. Assim, no presente trabalho, pode ser que a diminuição da atividade da álcool desidrogenase com o avanço do período de armazenamento tenha tornado a semente mais susceptível à ação deletéria do acetaldeído, reduzindo com isso a sua viabilidade.

Quando se compara tratamento fungicida, verifica-se maior intensidade e número de bandas em embrião de sementes tratadas em relação às não tratadas (Figuras 32 a e b). O mesmo é verificado quando se compara a temperatura de armazenamento, no qual embrião de sementes submetidas à baixa temperatura apresentou maior atividade da ADH quando comparado ao de sementes armazenadas à temperatura ambiente. De acordo com Zhang et al. (1994), a formação de etanol tem influência sobre o processo deteriorativo de sementes em condições de alta umidade relativa.

A maior atividade da ADH nos embriões de sementes de seringueira, nessas condições de estresse (tratamento fungicida e baixa temperatura), provavelmente, dá-se em decorrência do mal-funcionamento das mitocôndrias, favorecendo uma maior conversão do piruvato, produzido por meio da glicólise, em acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase, e conseqüentemente, maior produção de ADH para formar o etanol. Booth et al. (1999) observaram degradação mitocondrial em células da radícula do embrião

de sementes de *Eurotia lanata* armazenadas a 5°C. De acordo com os autores, o envelhecimento das sementes, nessa condição, favorece um acúmulo de ácidos graxos livres nas membranas mitocôndrias, como resultado da ativação da fosfolipase A₂ (Luzikov et al., 1985), induzindo o desacoplamento da fosforilação oxidativa e, como consequência, reduzindo o nível de ATP endógeno.

Para a enzima esterase (EST) (Figura 32 c e d), semelhantemente ao observado para a enzima ADH, nota-se uma maior atividade em embriões de sementes tratadas e armazenadas em câmara fria quando comparadas às não tratadas e armazenadas à temperatura ambiente, demonstrando que os embriões de sementes armazenadas na primeira situação apresentavam maior peroxidação de lipídios, e conseqüentemente, estavam num processo deteriorativo mais avançado do que o embrião de sementes não tratadas e armazenadas à temperatura ambiente. Alterações nos padrões da enzima esterase, evidenciam a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução na germinação das sementes, uma vez que, essa enzima está envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo de lipídios (Santos et al., 2004).

De maneira geral, verifica-se uma redução na atividade da EST no embrião das sementes de seringueira com o avanço do período de armazenamento, independentemente do tratamento fungicida e das condições de armazenamento, exceção feita para o embrião de sementes não tratadas e armazenadas à temperatura ambiente e câmara fria, cujas intensidades de bandas de esterase (*est₁*, *est₂* e *est₃*, respectivamente) aumentaram com o decorrer do armazenamento. Esses resultados corroboram com os observados por Brandão Junior (1996) e Carvalho et al. (2006), os quais verificaram redução na intensidade de um grupo de bandas de esterase com o aumento do tempo de envelhecimento artificial de sementes de milho e *Copaifera langsdorffii*,

respectivamente. Apesar das esterases serem um grupo de enzimas amplamente associadas à deterioração de sementes por estarem envolvidas em reações de hidrólise de ésteres de membrana (Ribeiro, 2000; Santos et al., 2005). Estas enzimas podem também atuar na hidrólise de triacilglicerois presentes em oleossomos, constituindo uma importante fonte de energia para a germinação de sementes (Aung & McDonald, 1995).

Avaliando a atividade de esterases durante a deterioração de sementes de amendoim Aung & McDonald (1995) observaram decréscimo na sua atividade total com o aumento da deterioração, tanto em sementes embebidas como não embebidas. No entanto, com base nos perfis de bandas, observaram-se que essas mudanças não foram uniformes entre todas as espécies de isoesterases. Sete isoenzimas aumentaram e quatro diminuíram durante a embebição. Os autores concluíram que isoesterases específicas são suscetíveis à deterioração durante o envelhecimento de sementes de amendoim e que outras isoesterases associadas à germinação são preferencialmente sintetizadas durante a embebição.

Além disso, Vieira (1996) relata que apesar de a esterase ser uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres e desempenhar papel essencial no metabolismo de lipídios, ponto importante no processo deteriorativo de sementes, a variação no seu perfil eletroforético parece estar mais relacionado à associação de microrganismos do que o processo deteriorativo em si. Essa talvez, tenha sido a causa da redução da atividade dessa enzima em embrião de sementes tratadas, com o avanço do armazenamento, uma vez que tal procedimento tem por finalidade minimizar a proliferação de microrganismos. Já em sementes armazenadas à temperatura ambiente e sem tratamento fungicida, foi observada a presença de maior quantidade de microrganismos com o decorrer do armazenamento, o que pode justificar o aumento da atividade da esterase.

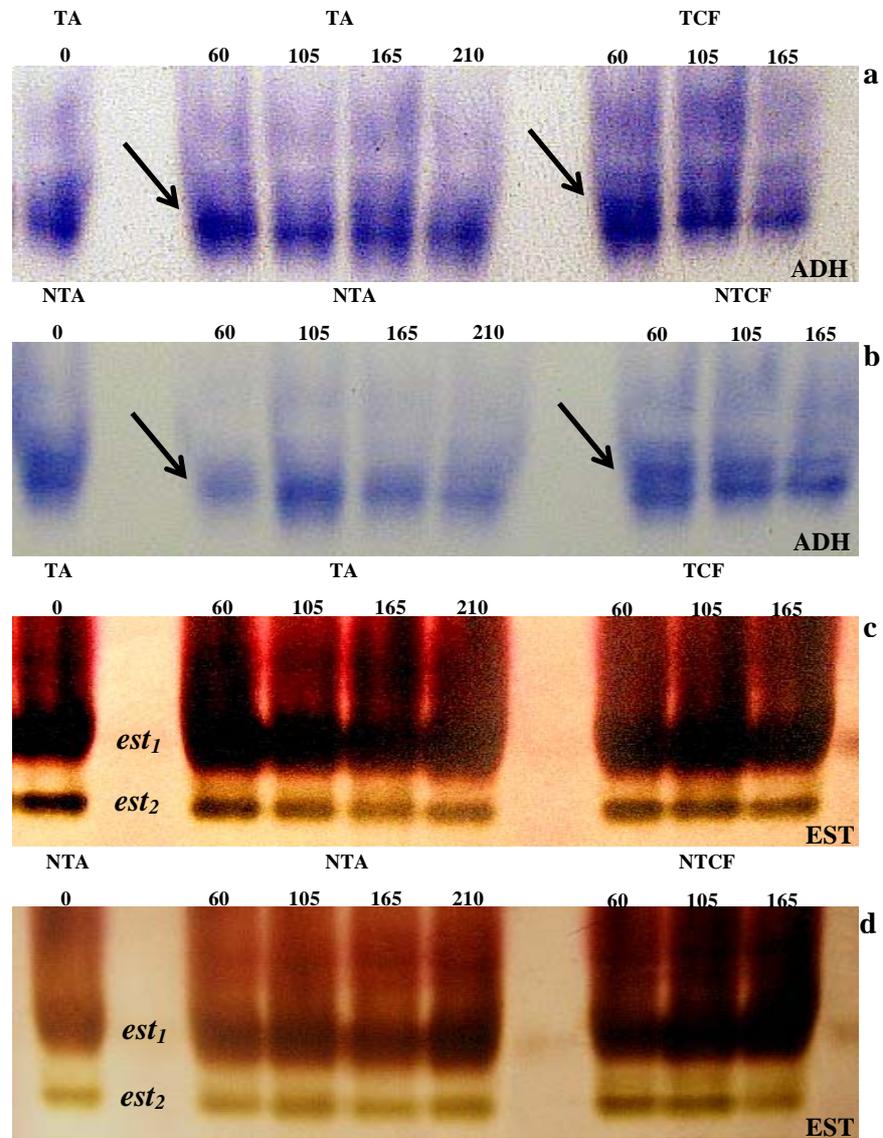


FIGURA 32 Padrões isoenzimáticos de álcool desidrogenase (ADH) e esterase (EST) de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida (tratadas (T) e não tratadas com fungicidas (NT)) e do período de armazenamento (0, 60, 105, 165 e 210 dias) sob duas condições (temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$ (A) e câmara fria 10°C (CF)). As setas evidenciam o número e/ou a intensidade de bandas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Para a glutamato-oxalacetato transaminase (GOT) (Figura 33 a e b), verifica-se uma menor intensidade e número de bandas no embrião de sementes tratadas com fungicidas, quando comparado às não tratadas, independentemente, se armazenadas em câmara fria ou à temperatura ambiente. Esses resultados diferem dos observados por Silva et al. (2000) que, avaliando as alterações dos padrões de isoenzimas em sementes de milho infectadas por fungos, verificaram uma redução na atividade da GOT quando essas sementes não foram tratadas com fungicidas em comparação às tratadas. Vale ressaltar que essa diferença na atividade da GOT encontrada por Silva et al. (2000) só foi notada na segunda época de avaliação (30 dias de incubação das sementes a 25°C e 95% de umidade relativa), época de maior incidência dos fungos *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp e não na primeira (15 dias de incubação das sementes a 25°C e 95% de umidade relativa).

Em embrião de sementes não tratadas e armazenadas à temperatura ambiente, nota-se um aumento da atividade e do número de bandas da GOT nos 105 dias iniciais de armazenamento, com posterior queda na atividade da enzima e no número de bandas após esse período. Provavelmente, a redução da atividade e a diminuição do número de bandas da GOT, ocorreram em função do aumento da incidência de microrganismos com o avanço do período de armazenamento das sementes nessas condições. Silva et al. (2000) relataram redução na intensidade de bandas da GOT em sementes de milho infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp.

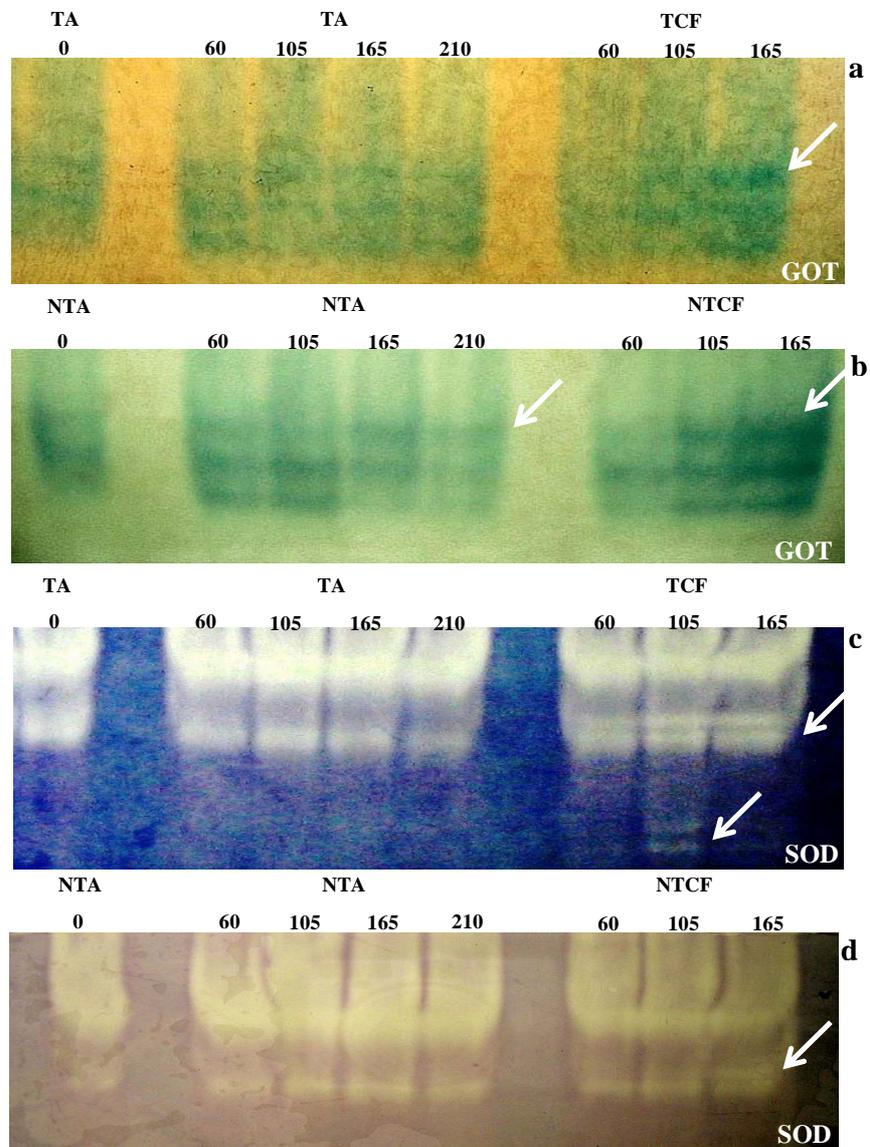


FIGURA 33 Padrões isoenzimáticos de glutamato oxalacetato transaminase (GOT) e superóxido dismutase (SOD) de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida (tratadas (T) e não tratadas com fungicidas (NT)) e do período de armazenamento (0, 60, 105, 165 e 210 dias) sob duas condições (temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$ (A) e câmara fria 10°C (CF)). As setas evidenciam o número e/ou a intensidade de bandas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Por outro lado, embrião de sementes armazenadas em câmara fria, independentemente do tratamento fungicida, apresentou aumento da atividade e do número de bandas da GOT com o avanço do período de armazenamento das sementes. Esse resultado está de acordo com os obtidos por Chauhan et al. (1985), que observaram em sementes de soja e cevada um incremento do número de bandas da GOT com o declínio de viabilidade das sementes no envelhecimento artificial. De acordo com Conn & Stumpf (1980), a GOT é uma enzima que tem um importante papel no processo de degradação e síntese de proteínas. Portanto, apresenta fundamental importância na germinação de sementes. Assim, é provável que os aumentos do número e intensidade de bandas estejam relacionados ao aumento da atividade metabólica das sementes, nessas condições.

Para a enzima superóxido dismutase (SOD) (Figuras 33 c e d), verifica-se um incremento da intensidade de bandas, no embrião, com o aumento do período de armazenamento das sementes, independentemente do tratamento fungicida e do ambiente de armazenamento aos quais foram submetidas, exceção feita para o embrião de sementes tratadas e armazenadas à temperatura ambiente, no qual houve redução da intensidade de bandas com o avanço do período de armazenamento das sementes. Quando se compara esses padrões em embrião de sementes armazenadas em câmara fria com os observados em sementes armazenadas à temperatura ambiente nota-se um incremento da intensidade e do número de bandas da primeira em relação à segunda condição de armazenamento. Vale ressaltar que a baixa temperatura foi a pior condição de armazenamento para a manutenção da viabilidade e do vigor de sementes de seringueira (avaliações fisiológicas – Figuras 2, 3, 4 e 6).

Pukacka & Ratajczak (2005), avaliando a produção de superóxido, de peróxido de hidrogênio e de enzimas scavenging em sementes de *Fagus sylvatica*, sob diferentes temperaturas e umidades relativas de armazenamento

verificaram um aumento na produção de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio com o envelhecimento das sementes, independentemente da temperatura e da umidade relativa de armazenamento. De acordo com os autores, esse aumento de superóxido e de peróxido de hidrogênio foi seguido pelo aumento das enzimas SOD e CAT, entretanto, não nas mesmas proporções. Dessa maneira, os autores concluíram que a baixa germinabilidade durante o armazenamento das sementes de *Fagus sylvatica* foi devido ao alto estresse oxidativo associado a um ineficiente sistema scavengers de radicais livres.

No presente trabalho é possível que tenha ocorrido algo semelhante, ou seja, embora tenha sido notado um aumento da atividade e do número de bandas da SOD no embrião com o decorrer do armazenamento das sementes, esse incremento pode não ter seguido as mesmas proporções do aumento de superóxido.

A catalase (CAT), enzima envolvida na remoção de peróxido de hidrogênio apresentou um ligeiro incremento em sua atividade até os 165 dias de armazenamento, quando as sementes foram acondicionadas à temperatura ambiente, independentemente se tratadas com fungicidas ou não (Figura 34 a e b). Após esse período, nota-se uma redução em sua atividade. Bailly et al. (1996) e Jeng & Sung (1994) também verificaram redução da atividade da catalase com o envelhecimento de sementes de girassol e amendoim, respectivamente.

Quando as sementes foram armazenadas em câmara fria, a atividade da catalase manteve-se inalterada com o avanço do processo deteriorativo das sementes, independentemente do tratamento fungicida. Vale ressaltar que a atividade dessa isoenzima foi menor em embriões de sementes armazenadas em câmara fria quando comparada às armazenadas a temperatura ambiente.

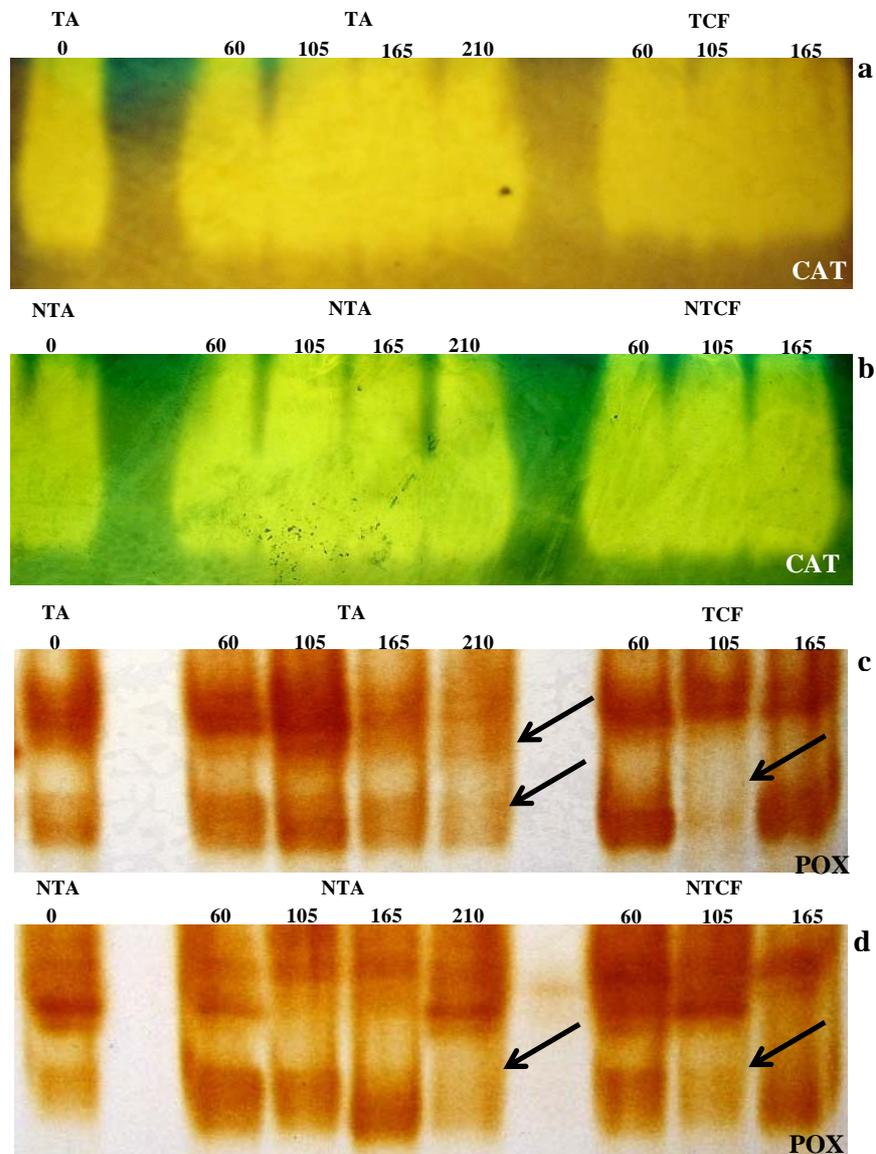


FIGURA 34 Padrões isoenzimáticos de catalase (CAT) e peroxidase (POX) de sementes de seringueira em função do tratamento fungicida (tratadas (T) e não tratadas com fungicidas (NT)) e do período de armazenamento (0, 60, 105, 165 e 210 dias) sob duas condições (temperatura ambiente $\pm 20^{\circ}\text{C}$ (A) e câmara fria 10°C (CF)). As setas evidenciam a ausência de bandas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A catalase pode desempenhar um controle de peróxidos endógenos, através de um ciclo de óxido-redução, envolvendo glutathione e ascorbato. Assim, uma ineficiência em sua atividade pode resultar numa diminuição da prevenção de danos oxidativos. A presença do tóxico H_2O_2 favorece a geração de um radical muito mais reativo, o OH^\cdot (Pukacka & Ratajczak, 2005). Esse radical ataca praticamente todas as macromoléculas, causando a degradação dos componentes celulares, conduzindo à sua morte (Scandalios, 1993).

Os padrões isoenzimáticos da peroxidase (POX), no embrião (Figura 34 c e d), diminuíram em número e intensidade de bandas, com o avanço do período de armazenamento das sementes quando acondicionadas à temperatura ambiente, independentemente do tratamento fungicida. Merece destaque o embrião de sementes armazenadas à temperatura ambiente e tratadas com fungicidas nas quais praticamente não se observou atividade da POX a partir de 165 dias de armazenamento. Esses resultados corroboram com os obtidos por Carvalho et al. (2006), Kalpana & Rao (1994), Sung & Chiu (1995), Sung (1996) os quais observaram redução na atividade da peroxidase com o envelhecimento das sementes. Os autores associaram a queda da atividade da peroxidase ao aumento da peroxidação de lipídios. A peroxidase é uma enzima responsável pela remoção de peróxido e a perda da sua atividade pode tornar as sementes mais susceptíveis aos efeitos deletérios do O_2 e de radicais livres sobre ácidos graxos insaturados de membrana, o que provoca a sua degeneração.

Quando se analisa embrião de sementes armazenadas em câmara fria, nota-se uma maior intensidade de bandas para a POX comparado ao embrião de sementes armazenadas à temperatura ambiente. Entretanto, semelhantemente ao observado para embrião de sementes armazenadas à temperatura ambiente, verifica-se uma redução da intensidade e do número de bandas com o avanço do período de armazenamento das sementes (a partir de 105 dias). Redução na atividade da POX também foi observada por Brandão Junior (1996), em

sementes de milho e por Jeng & Sung (1994) em sementes de amendoim, ambas envelhecidas. Vale ressaltar que a condição de baixa temperatura foi prejudicial à manutenção da viabilidade e do vigor das sementes de seringueira (avaliações fisiológicas – Figuras 2, 3, 4 e 6). Provavelmente, essa condição de estresse induziu a um aumento da atividade da POX, no entanto, esse incremento pode ter sido menor do que o de radicais livres, tornando o mecanismo de eliminação de peróxido de hidrogênio ineficaz, como sugerido por Pukacka & Ratajczak (2005), em trabalho com sementes de *Fagus sylvatica*.

5 CONCLUSÕES

5.1 Avaliações fisiológicas

O tratamento fungicida causou fitotoxidez às sementes de seringueira, contribuindo para a redução do seu vigor e da sua viabilidade;

A baixa temperatura no armazenamento, 10°C, contribuiu para a perda do vigor e da viabilidade das sementes de seringueira;

A associação do tratamento fungicida com a baixa temperatura de armazenamento teve efeito mais prejudicial sobre o vigor e a viabilidade das sementes de seringueira do que quando comparado à utilização desses fatores isoladamente;

As melhores condições para a conservação de sementes de seringueira foi à temperatura ambiente $\pm 20^\circ\text{C}$, ausente de tratamento fungicida.

5.2 Avaliações bioquímicas e ultra-estruturais

Ocorreu redução na concentração de amido tanto no embrião quanto no endosperma das sementes no decorrer do período de armazenamento;

Ocorreu redução nos teores de açúcares solúveis e redutores nos embriões de sementes armazenadas tanto em câmara fria quanto em temperatura ambiente;

Ocorreu biossíntese de lipídios no embrião das sementes de seringueira no decorrer do armazenamento das sementes;

No endosperma das sementes de seringueira ocorreu degradação de lipídios durante o avanço do armazenamento;

Ocorreu divisão celular no eixo embrionário das sementes de seringueira até os 105 dias de armazenamento;

Ocorreu peroxidação de lipídios nos primeiros meses de armazenamento das sementes de seringueira, principalmente quando acondicionadas à baixa temperatura;

Os teores de proteínas solúveis decresceram com o armazenamento das sementes tanto no embrião quanto no endosperma;

Os níveis de aminoácidos do embrião e do endosperma das sementes de seringueira aumentaram, sobremaneira, a partir de 105 dias de armazenamento;

Sementes armazenadas à baixa temperatura apresentaram, no final do período de armazenamento, maiores teores de aminoácidos no embrião.

5.3 Avaliações moleculares

Variações eletroforéticas de isoenzimas estão associadas ao processo deteriorativo de sementes de seringueira;

As enzimas álcool desidrogenase, esterase, glutamato-oxalacetato trasaminase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase revelaram-se como importantes ferramentas para a elucidação dos processos deteriorativos de sementes de seringueira.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOSLOWSKI, T. T. **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. v. 1, 416 p.
- AGUNBIABLE, J. A.; WISEMAN, J.; COLE, D. J. A. Improving the nutritive value of Nigerian rubber kernel (*Hevea brasiliensis*) products through processing. 1. Chemical a nutritional composition. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 72, n. 4, p. 308-314, Oct. 1995.
- AIGBODION, A. I. Effect of storage of seeds on quality of rubber seed oil. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, Kerala, v. 7, 141-143, 1994.
- ALENCAR, M. A. A. **Mobilização e distribuição de reservas de sementes de seringueira (Hevea brasiliensis Muell. Arg.) durante a germinação e o crescimento inicial**. Lavras, 2003. 59 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. MG.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.
- ARAÚJO, J. M. A. **Oxidação de lipídios**. Viçosa: UFV. Imprensa Universitária, 1994. 22 p.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: UFV. Imprensa Universitária, 1995. 335 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA. **Seed vigor testing handbook**. East Lansing: AOSA, 1983. 88 p. (Contribution, 32).
- AUNG, U. T.; MCDONALD, M. B. Changes in esterase activity associated with peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed deterioration. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, n. 1, p. 101-111, 1995.
- BACCHI, O. Estudos sobre a conservação de sementes. XI. Ingá. **Bragantia**, Campinas, v. 20, n. 35, p. 805-814, Ago. 1961.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 1, p. 93-107, Mar. 2004.

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

BASAVARAJAPPA, B.; SHETTY, H.; PRAKASH, H. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1991.

BEGNAMI, C. N. **Alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas durante a perda da viabilidade de sementes de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho**. 1998. 93 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Chapter 4: Orthodox and Recalcitrant Seeds. In: **Tropical Tree Seed Manual**. [s. l]: USDA Forest Service's/Reforestation, Nurseries, & Genetics Resources, 2003.

BERNAL-LUGO, I.; LEOPOLD, A. C. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 3, p. 1207-1210, Mar. 1992.

BEUGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, Oxford, v. 52, p. 302-310, 1978.

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

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Viability and longevity. In: **Physiology and biochemistry of seeds**. Berlin: Springer Verlag, 1982. v. 2, p. 47.

BONOME, L. T. da S.; VON PINHO, É. V. de R. Efeito do teor de água das sementes, embalagens e ambiente de armazenamento na conservação de sementes de citros. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPA, 12., 1999, Lavras. **Anais...** Lavras: CICESAL, 1999. p. 42.

BOOTH, D. T.; AGUSTRINA, R.; ABERNETHY, R. Evidence of cell deterioration in winterfat seeds during refrigerated storage. **Journal of Range Management**, Denver, v. 52, n. 3, p. 290-296, May 1999.

BOWLER, C.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D. Suoeroxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO JUNIOR, D. S. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRANDÃO JUNIOR, D. S. **Marcadores da tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro**. 2000. 144 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRANDÃO JUNIOR, D. S.; CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 114-121, 1999.

BRANDÃO JUNIOR, D. S.; VIEIRA, M. G. G. C.; BERNARDINO FILHO, J.; HILHORST, H.; GUIMARÃES, R. M. Uso de padrões eletroforéticos na identificação de cultivares e do nível de deterioração de sementes de *Coffea arabica*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CAFEICULTURA, 24., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

BRUGGINK, H.; KRAAK, H. L.; DIJEMA, M. H. G. E.; BEKENDAM, J. Some factors influencing electrolyte leakage from maize (*Zea mays* L.) Kernels. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 1, n. 1, p. 15-20, Mar. 1991.

BRUNI, F.; LEOPOLD, A. C. Glass transitions in soybean seed: relevance to anhydrous biology. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 2, p. 660-663, June 1991.

CAMARGO, R. **Armazenamento de sementes de milho doce**. 2003. 81 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

- CARNEIRO, J. G. A.; AGUIAR, I. B. Armazenamento de sementes florestais. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Ed.). **Sementes de espécies florestais tropicais**. Brasília: ABRATES/CTSF, 1991. 500 p. (mimeografado).
- CARVALHO, D.; FERREIRA, R. A.; OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, A. F.; GEMAQUE, R. C. R. Eletroforese de proteínas e isoenzimas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 1, p. 19-24, jan./fev. 2006.
- CARVALHO, M. L. M.; VON PINHO, E. V. R. **Armazenamento de sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 67 p.
- DE CASTRO, R. D.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; GROOT, S. P. C.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. M. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 2, p. 327-335, Feb. 2000.
- CERAMI, A.; VLASSARA, H.; BROWLEE, M. Glucose and aging. **Scientific American**, New York, v. 256, n. 5, p. 82-88, May 1987.
- CHAITANYA, K. S. K.; KESHAVKANT, S.; NAITHANI, S. C. Changes in total protein and protease activity in dehydrating recalcitrant sal (*Shorea robusta*) seeds. **Silva Fennica**, Helsinki, v. 34, n. 1, p. 71-77, 2000. Research notes.
- CHAITANYA, K. S. K.; NAITHANI, S. C. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn. f. **New Phytologist**, Cambridge, v. 126, n. 4, p. 623-627, Apr. 1994.
- CHAUHAN, K. P. S.; GOPINATHAN, M. C.; BASU, C. R. Electrophoretic variation of protein and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 13, v. 3, p. 629-641, 1985.
- CHIN, H. F. **Recalcitrant seeds: a status report**. Rome: IBPGR, 1988. 18 p.
- CHIN, H. F.; AZIZ, M.; ANG, B. B.; HANZAH, S. The effect of moisture and temperature on the ultrastructure and viability of seeds of *Hevea brasiliensis*. **Seed Science and Tecnology**, Zurich, v. 9, n. 2, p. 411-422, 1981.

CÍCERO, S. M. Produção, coleta, transporte e armazenamento de sementes de seringueira. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DA SERINGUEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO, 1., 1986, Piracicaba. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1986. p. 133-138.

CÍCERO, S. M.; MARCOS FILHO, J.; TOLEDO, F. F. Efeitos do tratamento fungicida e de três ambientes de armazenamento sobre a conservação de sementes de seringueira. **Anais ESALQ**, Piracicaba, v. 43, n. 2, p. 763-787, 1986.

CÍCERO, S. M.; TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J.; MENTEN, J. O. M. Uso da mesa gravitacional e tratamento fungicida em sementes de seringueira. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 9, n. 1, p. 53-62, 1987.

CONN, E. C.; STUMPF, P. K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Bliicher, 1980. 451 p.

CORBINEAU, F.; GAY-MATHIEU, C.; VINEL, D.; CÔME, D. Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 116, 489-496, 2002.

CROWE, L. M.; MOURDIAN, R.; CROWE, J. H.; JACKSON, S. A.; WOMERSLY, C. Effects of carbohydrates on membrane stability at lower water activities. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 769, n. 1, p. 141-150, 1984.

DAHLE, I. K.; HILL, E. G.; HOLMAN, R. T. The TBA reaction and the autoxidation of polyunsaturated fatty acid methyl esters. **Archives of Biochemistry Biophysics**, San Diego, v. 98, n. 2, p. 253, 1962.

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

DUNLOP, R. A.; RODGERS, K. J.; DEAN, R. T. Recent development in the intracellular degradation of oxidized proteins. **Free Radic Biol Med**, v. 33, p. 894-906, 2002.

EATON, J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 118, n. 1, p. 3-4, July 1991.

EDJE, O. T.; BURRIS, J. S. Physiological and biochemical changes in deteriorating soybean seeds. **Proceedings of the Association Off Seed Analisis**, Brunswick, v. 60, p. 158-166, 1970.

EICHELBERGER, L.; MAIA, M. S.; PESKE, S. T.; MORAES, D. M. Composição química de sementes de azevém em resposta ao retardamento da secagem e ao armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 693-701, maio 2002.

ESPINDOLA, L. S.; NOIN, M.; CORBINEAU, F.; COME, D. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n3, p. 193–201, Sept. 1994.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Recalcitrance: a current assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 16, n. 1, p. 155-166, 1988.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; WALTERS, C. Sub cellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n. 2, p. 135-144, June 1997.

FEENEY, R. E.; WHITAKER, J. R. The Maillard reaction and its prevention. In: CHERRY, J. P. (Ed.). **Food protein deterioration**: American Chemical Society symposium. Washington: American Chemical Society, 1982. n. 206, p. 201-230.

FERRAZ, I. D. K.; SAMPAIO, P. T. B. Métodos simples de armazenamento das sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C. Meliaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 26, n. 3, p. 137-144, set. 1996.

FERREIRA, D. F. Sisvar – Sistema de Análise de Variância. 2006.

FERREIRA, S. A. N.; GENTIL, D. F. O. Armazenamento de sementes de camu-camu (*Myrciaria dúbia*) com diferentes graus de umidade e temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 440-442, dez. 2003.

FIGUEIREDO, S. F. L. Conservação da viabilidade da semente de cacau. IV. Efeito de fungicidas e peletização. **Theobroma**, Ilhéus, v. 16, n. 4, p. 173-188, out./dez. 1986.

- FONSECA, N. R.; MYCZKOWSKI, M. L.; PRIOR, M.; SÁ, R. O.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. ZANOTTO, M. D. Testes de avaliação da viabilidade e do vigor em sementes de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. v. 1, p. 52-57.
- FU, J. R.; ZHANG, B. Z.; WANG, X. P.; QIAO, Y. Z.; HUANG, X. L. Physiological studies on desiccation, wet storage and cryopreservation of recalcitrant seeds of three fruit species and their excised embryonic axes. **Seed Science and Tecnology**, Zurich, v. 18, n. 3, p. 743-754, 1990.
- GARCIA, A.; VIEIRA, R. D. Germinação, armazenamento e tratamento fungicida de sementes de seringueira. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 128-133, 1994.
- GIRARD, J.; LE MESTE, M. Absence de relation entre le taux de radicaux libres mesure' par RPE et la viabilite' des semences deble'. **C R Academie Science Paris**, Serie III, Paris, p. 417-422, 1992.
- GOEL, A.; GOEL, A. K.; SHEORAN, I. S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 160, n. 9, p. 1093-1100, Sept. 2003.
- GOLDBACH, H. Imbibed storage of *Melicoccus bijugatus* and *Eugenia brasiliensis* using abscisic acid as a germination inhibitor. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 7, n. 3, p. 403-406, 1979.
- GONÇALVES, P. de S.; PAIVA, J. R.; SOUZA, R. A. Retrospectiva e atualidade do melhoramento genético da seringueira (*Hevea* spp.) no Brasil e em países asiáticos. Manaus: EMBRAPA-CNPDS, 1983. 69 p. (EMBRAPA-CNPDS. Documentos, 2).
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Science**, London, v. 15, n. 4, p. 129-135, Apr. 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed.). **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989. p. 86-123.
- HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. **Handbook of vigour test methods**. 3rd. ed. Zurich: ISTA, 1995. 117 p.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photo peroxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, SandDiego, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1993.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behavior**. Rome: IPGRI, 1996. 55 p. (IPGRI Technical Bulletin n. 1).

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Chapter 3: Storage. In: **Tropical tree seed manual**. [S. l]: USDA Forest Service's, Reforestation, Nurseries, & Genetics Resources, 2003.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Interspecific variation in seed storage behavior within two genera – *Coffea* and *Citrus*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, n. 1, p. 165-181, 1995.

HOR, Y. L.; CHIN, H. F.; KARIM, M. Z. The effect of seed moisture and storage temperature on the storability of cocoa seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 12, n. 2, p. 415-420. 1984.

HOTTIGER, T.; DE VIRGILIO, C.; HALL, M. N.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast: II physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 219, p. 187-193, May 1994.

IBRAHIM, A. E.; ROBERTS, E. H. Viability of lettuce seeds. I. Survival in hermetic storage. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 34, n. 142, p. 620-630, May 1983.

JENG, T. L.; SUNG, J. M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1994.

JENSEN, W. A. Histochemical techniques. In: _____. **Botanical histochemistry**. San Francisco, USA: Freeman and Company, 1962. p. 206-256.

- KALPANA, R.; MADHAVA RAO, K. V. Lipid changes during accelerated ageing of seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) cultivars. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 24, n. 3, p. 475–483, 1996.
- KALPANA, R.; RAO, K. V. M. Absence of the role of lipid peroxidation during accelerated ageing of seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) cultivars. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 22, n. 2, p. 253-260, 1994.
- KERMODE, A. R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 9, n. 2, p. 155-195, 1990.
- KEYS, R. D. Dynamic conductometric analysis of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed leachate using the CASAS (computerized automated seed analysis system). **Journal of Seed Technology**, London, v. 7, n. 1, p. 36-59, 1982.
- KING, M. W.; ROBERTS, E. H. **The storage of recalcitrant seeds: Achievements and possible approaches**. Rome: IBPGR, 1979. 96 p.
- KOSTER, K.; LEOPOLD, A. C. sugar and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, n. 3, p. 829-832, Nov. 1988.
- KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 745 p.
- KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D. V.; NETO J. B. F. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.
- LEE, A. T.; CERAMI, A. Non-enzymatic glycosylation of DNA by reducing sugars. In: BAYNES, J. W.; MONNIER, V. M. (Ed.) **The Maillard reaction in ageing, diabetes and nutrition**. New York: Alan R Liss, 1989. p. 291-299.
- LEPRINCE, O.; BRONCHART, R.; DELTOUR, R. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 539–546, Aug. 1990a.
- LEPRINCE, O.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 338, p. 1515–1524, Sept. 1999.

- LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P. C.;ATHERTON, N. M.; HENDRY, G. A. F. The role of free radicals and radical processing systems in loss desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, London, v. 116, n. 4, p. 573-580, Dec. 1990b.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 231-246, Sept. 1993.
- LEPRINCE, O.; VERTUCCI, C. W. A calorimetric study of the glass transition behavior in axes of bean seeds with relevance to storage stability. **Plant physiology**, Rockville, v. 109, n. 4, p. 1471-1481, Dec. 1995.
- LIN, S. S.; PEARCE, R. S. Changes in lipids in bean seeds (*Phaseolus vulgaris*) and corn caryopses (*Zea mays*) aged in contrasting environments. **Annals of Botany**, London, v. 65, n. 4, p. 452-456, Apr. 1990.
- LOEFFLER, T. M.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. The bulk conductivity test as indicator of soybean quality. **Journal of Seed Technology**, London, v. 12, n. 1, p. 37-53, 1988.
- LUZIKOV, V. N.; GALKIN, A. V.; ROODY, D. B. N. **Mitochondrial biogenesis and breakdown**. New York: Consultant Bureau, 1985.
- MAGUIRRE, J. D. Speed of germination - aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.
- MARTINS, C. C.; BOVI, M. L. A.; NAKAGAWA, J. Desiccation effects on germination and vigor of King palm seeds. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 88-92, jan./mar. 2003.
- MATTHEWS, S. Physiology of seed ageing. **Outlook of Agriculture**, Wallingford, v. 14, n. 2, p. 89-94, 1985.
- MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessments. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MERIGA, B.; REDDY, B. K.; RAO, K. R.; REDDY, L. A.; KISHOR, P. B. K. Aluminium-induced protection of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, n. 1, p. 63-68, Jan. 2004.

MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. Amino acid metabolism. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 28, p. 299-329, 1977.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MING, S.; YULONG, G.; YUN, Z.; *et al.* Methods of seed vigour testing for cabbage (*Brassica capitata* L.). **Journal of Southwest Agricultural University**, Beijing, v. 17, n. 6, p. 506-508, 1995. Resumo em CAB-Abstracts on CD-ROM, 1996/77.

MISRA, N. M.; KAR, R. K. Regulation of storage protein degradation in cotyledons of germinating cowpea. **Indian Journal of Plant Physiology**, New Delhi, v. 33, n. 4, p. 333-339, 1990.

MORELAND, D. E.; HUBER, S. C. Fluidity and permeability changes induced in the inner mitochondrial membrane by herbicides. In: DUCET, G.; LANCE, L. (Ed.). **Plant mitochondria**. Amsterdam: North-Holland Biomedical Press, 1978. p. 191-198.

MORRISON, W. R. Analysis of cereal starches. In: LINSKENS, H. F.; JACKSON, J. F. **Seed analysis**. Germany: Springer-Verlag, 1992. 380 p.

MURTHY, U. M. N.; SUN, W. Q. Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 348, p. 1221-1228, July 2000.

OKUDA, T.; MATSUDA, A.; YAMAMAKA, S.; SAGISAKA. Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of wheat is caused by cold treatment. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 3, p. 1265-1267, Nov. 1991.

OSBORNE, T. B. **The vegetable proteins**. 2. ed. London: Longmans Green and Company, 1924. 154 p.

PALMIANO, E. P.; JULIANO, B. O. Biochemical changes in the rice grain during germination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 49, n. 5, p. 751-756, May 1972.

PAULA, N. F. **Alterações fisiológicas em sementes de seringueira** (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento. Viçosa, 1997. 52 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PAULA, N. F.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; PAULA, R. C. Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 326-333, abr. 1997.

PEREIRA, J. P. Conservação da viabilidade do poder germinativo da semente de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 237-244, 1980.

PERL, M.; LURIA, I.; GELMOND, H. In: BEWLEY, J. D.; BLACK, M. (Ed.). **Viability and longevity. Physiology and biochemistry of seeds**. Berlin: Springer Verlag, 1978. v. 2, p. 48.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília; s.ed., 1985. 289p.

PRIESTLEY, D. A. **Seed ageing**. Ithaca: Cornell University Press, 1986.

PRIESTLEY, D. A.; LEOPOLD, A. C. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 63, n. 3, p. 726-729, 1979.

PRIESTLEY, D. A.; LEOPOLD, A. C. Lipid changes during natural ageing of soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 63, n. 3, p. 726-729, 1983.

PROBERT, R.; SMITH, R. Seed viability and the prediction of longevity. In: SEED CONSERVATION TRAINING COURSE, 1996, Jaboticabal. [Course], Jaboticabal: UNESP, 1996. não paginado.

PUKACKA, S. Changes in membrane lipid components and antioxidant levels during natural ageing of seeds of *Acer platanoides*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 82, n. 2, p. 306-310, June 1991.

PUKACKA, S.; RATAJCZAC, R. Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 162, n. 8, p. 873-885, Aug. 2005.

PUNTARULO, S.; BOVERIS, A. Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soybean embryonic axes. **Plant Science**, Clare, v. 68, n. 1, p. 27-32, 1990.

RAMOS, A.; SOUZA, G. B. Utilização das reservas alimentícias de sementes de araucária durante o armazenamento. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 22/23, p. 21-27, jan./dez. 1991.

RIBEIRO, U. P. **Condicionamento fisiológico de sementes de algodão: efeitos sobre a germinação, vigor, atividade enzimática e armazenabilidade**. 2000. 79 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

ROBERTS, E. H. Seed determination and loss of viability. **Advances in Research and Technology of Seeds**, New York, v. 4, p. 25-42, 1979.

RODRIGUES, M. O. S.; CREPALDI, I. C.; LUCHESE, A. M.; CARVALHO, N. O. S.; BRITO, A. L.; PELACANI, C. R.; LEDO, C. A. S. Influência do armazenamento nos teores de açúcares solúveis totais e redutores em sementes de *Syagrus coronata* (Martius) Beccari (Arecaceae). **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 5, n. 2, p. 72-75, 2005.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, 112-119, jan./fev. 2001.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. California: Wadsworth, 1992. 682 p.

SANTOS, C. M. **Influência do controle do crescimento, do uso de fungicidas e da frequência de colheita, nos caracteres agronômicos e na qualidade da fibra e da semente do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1993. 184 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

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

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.

SCHULTZ, H. W. **Symposium of foods: lipids and their oxidation**. Westport: AVI, 1962.

SILVA, E. A. A.; VAN EKEREN, P.; TOOROP, P. E.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; HILHORST, H. W. M. ABA reduces the abundance of microtubules and inhibits their transversal organization, embryo cell elongation and cell division during coffee (*Coffea Arabica* cv. Rubi) seed germination. In: SILVA, E. A. A. **Coffee (*Coffea Arabica* cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation**. PhD thesis, 105 p.

SILVA, E. A. A.; VON PINHO, É. V. R.; VIEIRA, M. G. G. C.; CARVALHO, M. L.; MACHADO, J. C. Alterações dos padrões de isoenzimas em sementes de milho infectadas por fungos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1725-1732, set. 2000.

SMITH, M. T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of storage desiccation-tolerant and desiccation –sensitive seeds. In: KIMOJEL, Y.; GOLILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853 p.

STEWART, R. R. C.; BEWLEY, J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 65, n. 2, p. 245-248, 1980.

STUBSGAARD, F. **Seed moisture**. Humlebaek: DFSC, 1990. 30 p.

SUDA, N. K. C.; GIORGINI, J. F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 2, n. 3, p. 226- 245, dez. 2000.

SUN, W. Q.; LEOPOLD, A. C. The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, n. 1, p. 94–104, May 1995.

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

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

SUNG, J. M.; JENG, T. L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated ageing of peanut seed. **Physiol Plantarum**, Copenhagen, v. 91, n. 1, p. 51–55, May 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAYLOR, A. G.; LEE, S. S.; BERESNIEWICZ, M. M. et la., Amino acid leakage from aged vegetable seeds. **Seed Science and Technology**, Ziruch, v. 23, n. 1, p. 113-122, 1995.

THRONEBERRY, G. O.; SMITH, F. G. Relation of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability. **Plant Physiology**, Rockville, v. 30, n. 4, p. 337, July 1955.

TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. **Manual de sementes: tecnologia da produção**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977. 224 p.

UGWANYI, J. O.; NJOKU, O. U. Effect of fermentation of seed on the chemical properties and fatty acid profile of rubber seed oil. **Indian Journal of National Rubber Research**, New Delhi, v. 9, n. 1, p. 75–81, 1996.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Dekker, 1997. p. 237-271.

VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 127 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, R. D.; BERGAMASCHI, M. C. M.; MINOHARA, L. Qualidade fisiológica de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), tratadas com benlate durante o armazenamento. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 151-157, Jan./abr. 1995.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1, 4, 26.

VILLALOBOS, R.; HERRERA, J.; MORA-URPI, J. Germinacion de la semilla de pejobaye. III. Efecto del contenido de agua y de las condiciones de almacenamiento. **Agronomia Costarricense**, San José, v. 16, n. 1, p. 69-76, 1992.

WANG, J.; FUGIMOTO, K.; MIYAZAWA, T.; ENDO, Y.; KITAMURA, K. Sensitivity of lipoxygenase-lacking soybean seeds to accelerated aging and their chemiluminescence levels. **Phytochemistry**, Oxford, v. 29, n. 12, p. 3739-3742, Dec. 1990.

WETTLAUFER, S. H.; LEOPOLD, A. C. Relevance of Amadori and Maillard reactions to seed deterioration. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 1, p. 165-169, Sept. 1991.

WILSON, D. O.; MCDONALD, M. B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 14, n. 2, p. 269-300, 1986.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, London, v. 80, n. 948, p. 209-213, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

ZACHEO, G.; CAPPELLO, M. S.; GALLO, A.; SANTINO, A.; CAPPELLO, A. R. Changes associated with post-harvest ageing in almond seeds. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v. 33, n. 6, p. 415-423, 2000.

ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FUTIHATA, Y.; NORAMURA, Y.-I.; ESASHI, Y. A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evoked by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 49-56, Mar. 1994.

ZELNY, L. Chemical, physical and nutritive changes during storage. In:
ANDERSON, J. A.; ALCOCK, A. W. **Storage of cereal grains and their
products**. Minnesota, 1954. 515 p.

ANEXOS

TABELA 1A	Resumo das avaliações fisiológicas - teste de emergência de plântulas (EP), índice de velocidade de emergência de plântulas (IVEP) e primeira contagem (PC). UFLA, Lavras, MG, 2006.	121
TABELA 2A	Resumo das avaliações fisiológicas – teste de condutividade elétrica (C.E.). UFLA, Lavras, MG, 2006.	122
TABELA 3A	Resumo das avaliações bioquímicas – peroxidação de lipídios. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	122
TABELA 4A	Resumo das avaliações bioquímicas – amido, açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), lipídios, proteínas e aminoácidos em embrião de sementes de seringueira. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	123
TABELA 5A	Resumo das avaliações bioquímicas – amido, açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), lipídios, proteínas e aminoácidos em endosperma de sementes de seringueira. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	124

ANEXOS

TABELA 1A Resumo das avaliações fisiológicas - teste de emergência de plântulas (EP), índice de velocidade de emergência de plântulas (IVEP) e primeira contagem (PC). UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	Quadrados médios		
		EP	IVEP	PC
T.F.	1	9800,0000**	16,1241**	3507,0313**
A.A.	1	36992,0000**	59,8555**	10260,2813**
P.A.	7	6785,6429**	3,1972**	690,3884**
T.F. x A.A.	1	28,1250 ^{ns}	0,0382 ^{ns}	3,7813 ^{ns}
T.F. x P.A.	7	145,6250**	0,4051**	193,4598**
A.A. x P.A.	7	1070,8036**	2,3127**	267,2098**
T.F. x A.A. x P.A.	7	234,3214**	0,4092**	72,9955**
Erro	96	18,3645	0,1248	7,4063
CV	-	9,31	21,35	15,03

* e ** Significativo pelo Teste F a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente
^{ns} não significativo pelo Teste F a 5% de probabilidade.

TABELA 2A Resumo das avaliações fisiológicas – teste de condutividade elétrica (C.E.). UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	Quadrados médios
		C.E.
T.F.	1	20,6143**
A.A.	1	34,3103**
P.A	6	14,2264**
T.F. x A.A	1	0,9417*
T.F. x P.A.	6	2,6917**
A.A. x P.A.	6	5,0226**
T.F. x A.A. x P.A.	6	0,3089 ^{ns}
Erro	84	0,1680
CV		19,56

TABELA 3A Resumo das avaliações bioquímicas – peroxidação de lipídios. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	Quadrado médio
		Pex. Lip.
T.F.	1	1,0513 ^{ns}
A.A.	1	7,5661**
P.A	3	6,7072**
T.F. x A.A	1	0,2701 ^{ns}
T.F. x P.A.	3	3,3412**
A.A. x P.A.	3	1,3863 *
T.F. x A.A. x P.A.	3	2,2004 **
Erro	16	0,3435
CV		8,05

TABELA 4A Resumo das avaliações bioquímicas – amido, açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), lipídios, proteínas e aminoácidos em embrião de sementes de seringueira. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS					
		Amido	AST	AR	Lipídios	Proteínas	Aminoácidos
T.F.	1	134,5360 ^{ns}	1751,6230**	43,2440*	4,4105 ^{ns}	392,3349**	6,3511**
A.A.	1	263,5781 ^{ns}	184,9566 ^{ns}	72,7669**	22,3178*	53,2355 ^{ns}	25,9896**
P.A	3	2418,3435**	5056,0169**	844,2201**	124,5747**	6838,3617**	101,7162**
T.F. x A.A	1	326,5633 ^{ns}	435,1046 ^{ns}	65,7540**	13,2195 ^{ns}	43,3010 ^{ns}	4,6004**
T.F. x P.A.	3	152,9927 ^{ns}	673,0784*	33,3241*	16,7648*	79,9429**	1,2645 ^{ns}
A.A. x P.A.	3	323,5270*	477,9015 ^{ns}	9,1427 ^{ns}	8,2610 ^{ns}	559,8797**	16,1215**
T.F. x A.A. x P.A.	3	171,4621 ^{ns}	77,6753 ^{ns}	11,0796 ^{ns}	7,5291 ^{ns}	49,2659*	6,1888**
Erro	32	85,8702	176,3880	9,0763	5,3112	16,8480	0,5830
CV	-	14,84	9,01	10,40	5,50	4,77	15,02

TABELA 5A Resumo das avaliações bioquímicas – amido, açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), lipídios, proteínas e aminoácidos em endosperma de sementes de seringueira. UFPA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS					
		Amido	AST	AR	Lipídios	Proteínas	Aminoácidos
T.F.	1	203,2399 ^{ns}	111,9047 ^{ns}	231,4408**	1,1563 ^{ns}	74,6255 ^{ns}	1,6539 ^{ns}
A.A.	1	133,7002 ^{ns}	1742,3095**	0,4219 ^{ns}	0,1355 ^{ns}	11,1844 ^{ns}	2,5808 ^{ns}
P.A.	3	2801,0438**	555,1551**	728,8243**	146,3605**	10128,9662**	115,7208**
T.F. x A.A.	1	504,0792 ^{ns}	0,3728 ^{ns}	101,4427**	1,5230 ^{ns}	23,6462 ^{ns}	0,3870 ^{ns}
T.F. x P.A.	3	50,2731 ^{ns}	414,0032*	62,7811**	16,3230**	80,5313 ^{ns}	1,4739 ^{ns}
A.A. x P.A.	3	191,3639 ^{ns}	3159,2822**	333,6107**	11,9744**	481,8807**	2,4404 ^{ns}
T.F. x A.A. x P.A.	3	472,3153 ^{ns}	60,7481 ^{ns}	19,0086 ^{ns}	8,0452**	105,9457 ^{ns}	3,1894 ^{ns}
Erro	32	180,5783	108,2551	9,7831	1,6615	60,8873	1,2792
CV	-	16,55	8,53	10,53	2,76	7,58	21,61