

VIVIANA BORGES CORTE

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE SEMENTES
DE *Melanoxylon brauna* ENVELHECIDAS NATURAL E
ARTIFICIALMENTE

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C827a
2008

Corte, Viviana Borges, 1981-

Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes
de *Melanoxylon brauna* envelhecidas natural e artificial-
mente / Viviana Borges Corte. – Viçosa, MG, 2008.
viii, 129f: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Sementes - Fisiologia. 2. Sementes - Armaze-
namento. 3. Sementes - Deteorização. 4. Florestas.
5. Bioquímica. 6. Enzimas. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDO adapt. CDD 634.9232315

VIVIANA BORGES CORTE

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE SEMENTES DE
MELANOXYLON BRAUNA ENVELHECIDAS NATURAL E
ARTIFICIALMENTE

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

APROVADA: 03 de Dezembro de 2008.



Prof.ª Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias
Co-Orientadora



Prof. Helio Garcia Leite
Co-Orientador



Prof.ª Idalina Tereza de Almeida Leite



Prof. Antonio Cláudio Davide



Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges
Orientador

Aos meus pais, Valdir e Santina

Dedico

Agradecimentos

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Engenharia Florestal, pela oportunidade de realizar o curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Eduardo Euclides de Lima e Borges, pela oportunidade, confiança e amizade.

Ao professor Hélio e Dirceu, pelas sugestões e auxílio nas análises.

Aos funcionários Leacir e Francisco e todos os funcionários do Setor de Silvicultura, pelo apoio e agradável convivência ao longo do trabalho. Ao Mauro pela atenção, cuidado, dedicação e bom humor no acompanhamento dos experimentos. A Marquione, pelo carinho e pela paciência em atender a todos os pedidos. Ao Júnior pela ajuda e paciência na fase final de elaboração.

Aos meus amigos de pós-graduação Claudinha, Antonio Jorge, Mirian, Elaine e Márcio pelo apoio e companheirismo. As amigas de república Lídia, Viviane, Juliana e Samantha pela alegria no dia a dia.

Por fim, o mais importante:

À Deus, pela vida e permissão de mais essa etapa vencida.

Aos meus pais, pelo amor, compreensão da ausência e apoio constante. À minha mãe, em especial, pelo incentivo e exemplo de vida.

Aos meus avós, irmã e toda a família que torceram por mim.

Biografia

Viviana Borges Corte, filha de Valdir Corte e Santina Soeiro Borges, neta de Luiz Corte/ Cremilda Carneiro Corte e Argeu Soeiro Borges/ Ana Maria das Dores Borges, nasceu em Vitória, Espírito Santo, em 25 de junho de 1981.

Realizou seus estudos básicos em Vitória, Espírito Santo.

Em setembro de 1999 iniciou seu curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Espírito Santo, concluindo-o em licenciatura em novembro de 2003.

Ingressou no Programa de Pós Graduação em Ciências Florestais em nível de Mestrado na Universidade Federal de Viçosa em março de 2004. Concluiu os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae* em julho de 2005 com defesa da dissertação, e os requisitos para obter o título de *Doctor Scientiae* em dezembro de 2008 com defesa da tese.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | viii |
| 1. Introdução geral | 1 |
| 2. Revisão de literatura | 3 |
| 3. Referências bibliográficas | 22 |
| 4. Objetivos..... | 37 |
| | |
| Capítulo I..... | 38 |
| Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> | |
| Resumo | 39 |
| Abstract | 40 |
| 1. Introdução | 41 |
| 2. Material e métodos | 42 |
| 3. Resultados | 44 |
| 4. Discussão | 45 |
| 5. Conclusões | 48 |
| 6. Referências bibliográficas | 49 |
| 7. Figuras | 53 |
| | |
| Capítulo II | 54 |
| Qualidade fisiológica de sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> envelhecidas natural e artificialmente | |
| Resumo | 55 |
| Abstract | 56 |
| 1. Introdução | 57 |
| 2. Material e métodos | 59 |

| | |
|---|-----|
| 3. Resultados e discussão | 61 |
| 4. Conclusões | 67 |
| 5. Referências bibliográficas | 68 |
| 6. Figuras | 77 |
| | |
| Capítulo III | 83 |
| Estudo enzimático da deterioração de sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> envelhecidas natural e artificialmente | |
| Resumo | 84 |
| Abstract | 85 |
| 1. Introdução | 86 |
| 2. Material e métodos | 88 |
| 3. Resultados e discussão | 91 |
| 4. Conclusões | 96 |
| 5. Referências bibliográficas | 97 |
| 6. Figuras | 102 |
| | |
| Capítulo IV | 106 |
| Estudo bioquímico da deterioração de sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> no envelhecimento natural e artificial | |
| Resumo | 107 |
| Abstract | 108 |
| 1. Introdução | 103 |
| 2. Material e métodos | 109 |
| 3. Resultados e discussão | 110 |
| 4. Conclusões | 119 |
| 5. Referências bibliográficas | 119 |
| 6. Figuras | 125 |

RESUMO

CORTE, Viviana Borges, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Dezembro, 2008.
Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Melanoxylon brauna* envelhecidas natural e artificialmente. Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Co-orientadores: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias e Helio Garcia Leite.

O conhecimento atual a respeito das alterações bioquímicas e fisiológicas de sementes florestais durante o armazenamento é limitado, bem como dos testes de avaliação de vigor durante esta etapa. O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Melanoxylon brauna* durante o armazenamento e o envelhecimento acelerado, estabelecendo relações entre essas alterações e a deterioração das sementes. Foram retiradas amostras de sementes para a realização dos testes de germinação, condutividade elétrica, teste do tetrazólio, emergência de plântulas e estresse hídrico, além das análises bioquímicas e enzimáticas quantificados nos cotilédones e no eixo embrionário. As porcentagens de germinação das sementes envelhecidas natural e artificialmente a 40 e 45°C foram reduzidas a partir dos 6 meses para o primeiro e 96 e 24 horas para os dois últimos, respectivamente. A condutividade elétrica aumentou e o número de sementes viáveis caiu significativamente em ambos os métodos de envelhecimento. Os teores de lipídios e oligossacarídeos apresentaram redução gradativa em ambos compartimentos da semente e métodos de envelhecimento, tendo sido considerados evidências do processo de deterioração. Os ácidos graxos não foram considerados responsáveis pela deterioração das sementes de brauna. Atividade da SOD aumentou aos 12 meses e 72 horas de envelhecimento natural e artificial, respectivamente. Atividades da CAT e POX e as reservas de lipídios decrescem com o envelhecimento. Houve correspondência entre os resultado obtidos para ambos os sistemas de envelhecimento.

ABSTRACT

CORTE, Viviana Borges, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, December, 2008.
Changes physiology and biochemistry of seeds of *Melanoxylon brauna* during deterioration. Advisor: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Co-Advisors: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias and Helio Garcia Leite.

The knowledge at present about the biochemical and physiologic changes in forest tree seeds is limited, as well as those of vigour evaluation testes during this stage. The objective of this work was to evaluate the physiological and biochemical changes of *Melanoxylon brauna* seeds during storage and the accelerated aging, establishing relations between these changes and decay of the seeds. Seed samples were taken to carry out germination, electrical conductivity and tetrazolium tests, as well as of emergence of the seedlings and water stress, besides the quantified biochemical and enzymatic analyses in the cotyledons and embryonary axis. Te germination percentage of the naturally and artificially aged seeds at 40 and 45°C were reduce, starting at six months in the first one and at 96 and 24 hours for the two last ones, respectively. The electrical conductivity increased and the number of viable seeds dropped significantly in both aging methods. The fat and oligosaccharides contents showed a steady reduction in both compartment of the seed and of the aging method, in correlation with the decaying process. Correlation between the fat acid contents and the seed decay of the species was not detected. Evidence that the fat acids were responsible for the decay of the seeds was not observed. The SOD activity increased at 12 months and 72 hours of natural and artificial aging, respectively. Activities of CAT and POX and the fat reserve decrease with aging. There was a correlation between the results of both aging systems.

1. Introdução Geral

A conservação da biodiversidade dos ecossistemas florestais tropicais tem sido uma das principais preocupações da humanidade nas últimas décadas. Em decorrência da devastação florestal para a extração de madeira visando o atendimento das necessidades do país e da expansão da agricultura, tem-se observado um comprometimento do potencial genético de muitas espécies. Desta forma a produção de sementes de espécies florestais ganhou grande importância em programa de reposição florestal, reflorestamento, recuperação de áreas degradadas, arborização urbana e a preservação das espécies florestais nativas em extinção, entre outras atividades.

Um dos aspectos mais pesquisados nos últimos anos tem sido a qualidade fisiológica das sementes, em decorrência de estarem sujeitas a mudanças degenerativas de origem bioquímica e fisiológica, as quais estão associadas com a redução do vigor. Por isso pesquisadores e analistas de sementes, sobretudo os que trabalham com espécies florestais, têm focado estudos que forneçam informações sobre a qualidade das sementes, especialmente no que diz respeito à padronização, aperfeiçoamento e estabelecimento dos métodos de análise.

A necessidade de utilização de sementes viáveis para atender os programas de conservação e de produção florestal levou ao aumento do número de estudos sobre a classificação fisiológica das sementes de espécies florestais nativas do Brasil quanto à capacidade de armazenamento. Esse conhecimento permite que sejam adotadas condições de armazenamento adequadas para cada espécie, além da elaboração de programas para a conservação de germoplasma. No entanto, diante da grande diversidade de espécies nas florestas tropicais, a literatura ainda é deficiente sobre a tecnologia dessas sementes, principalmente em relação ao comportamento no armazenamento (Davide et al., 2003).

A conservação de espécies vegetais pode ser realizada na forma *in situ*, na qual os recursos vegetais são mantidos no seu habitat natural, e na *ex situ*, ou seja, fora do seu ambiente natural, através de banco de sementes, bancos *in vitro* ou de plantas cultivadas em bancos de germoplasma. Entretanto, o conhecimento

básico a respeito da fisiologia e bioquímica de sementes florestais, que permitem sua conservação, em ambas as condições, a longo prazo é ainda insuficiente diante da complexidade e diversidade dessas espécies.

Como os estudos tecnológicos das sementes são, fundamentalmente, o ponto de partida para a utilização e a exploração de forma racional das espécies nativas, faz-se necessário melhor entendimento dos processos fisiológicos e bioquímicos relacionados à perda da viabilidade e vigor de forma a se aprimorar métodos de armazenamento.

Vários autores têm voltado suas pesquisas para um enfoque tecnológico, objetivando melhoramento das técnicas de armazenamento de sementes de espécies florestais (Chaves & Usberti, 2003; Medeiros et al. 2000; Cabral et al. 2003; Santos, 2000). Entretanto McDonald (1999) Corte (2005) e Corte (2006) ressalta que pesquisas direcionadas ao conhecimento da bioquímica de sementes podem ser fundamentais para o esclarecimento de dúvidas ainda existentes.

Nesse sentido, este trabalho objetiva avançar e aprofundar o conhecimento acerca do comportamento fisiológico e bioquímico, além do tecnológico, de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. (Leguminosae - Caesalpinoideae) quando submetidas ao envelhecimento natural (armazenamento) e artificial (acelerado), visando contribuir para um melhor manejo e conservação das espécies nos bancos de germoplasma.

2. Revisão de Literatura

MELANOXYLON BRAUNA

Braúna preta (*Melanoxylon brauna* Schott. - Leguminosae-Caesalpinoideae) é uma árvore nativa do Brasil muito conhecida pela qualidade, durabilidade, sendo considerada uma madeira-de-lei de grande valor econômico. A madeira apresenta característica acastanhada, quase negra nos espécimes mais velhos; a casca é utilizada em curtume para extração de tintura negra enquanto a seiva o é na medicina e na indústria, o que fez com que hoje ela seja raramente encontrada nas matas. Além disso, suas sementes são muito procuradas por insetos, o que torna difícil encontrar sementes viáveis em grandes quantidades.

A árvore atinge cerca de 17 metros e é também conhecida pelos nomes de árvore-da-chuva, braúna-preta, canela, canela-amarela, coração-de-negro, maria-preta, maria-preta-da-mata, maria-preta-do-campo, muiraúna, paravaúna, parovaúna, perovaúna e rabo-de-macaco (Lorenzi, 1992).

Seu fruto é um legume deiscente, contendo várias sementes duras envoltas por estrutura membranácea que possibilita sua dispersão pelo vento (Barroso et al., 1999).

Segundo Lorenzi (1992), a espécie ocorre na floresta pluvial da encosta atlântica especialmente das regiões Nordeste, Sudeste da Bahia até São Paulo e Minas Gerais. Além destes, o IBAMA (2008) ainda descreve sua ocorrência nos estados do Goiás, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Maranhão e Piauí.

Devido à exploração de sua madeira e a falta de replantios a espécie está classificada como vulnerável, conforme a “lista oficial de flora ameaçada de extinção” estabelecida pela Portaria número 37-N, de 3 de abril de 1992 (IBAMA, 2008).

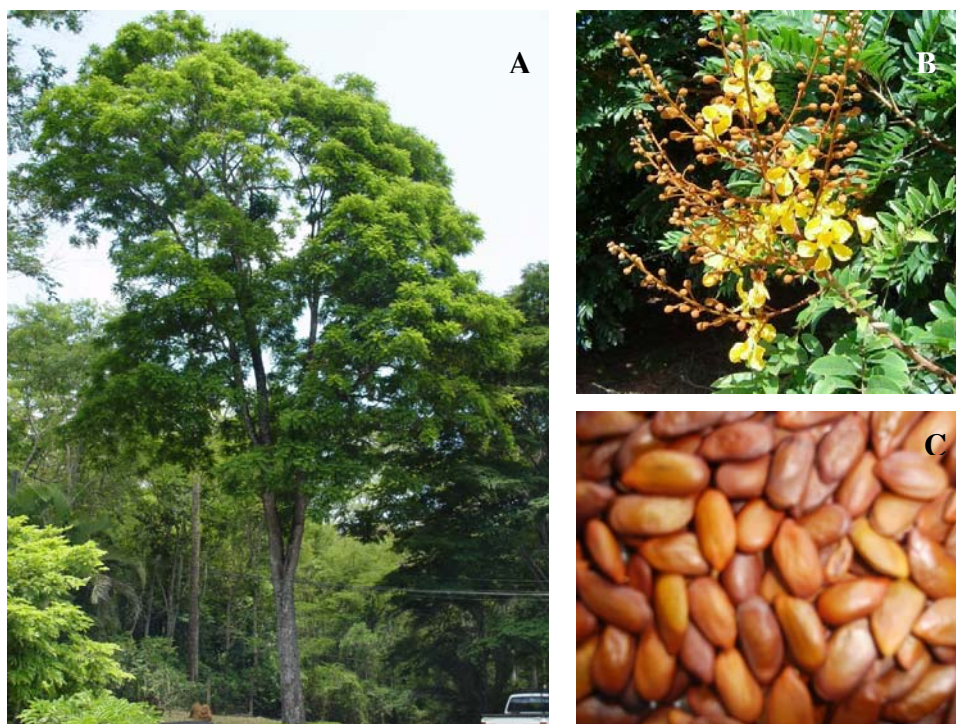


Figura 1 - Aspecto geral da árvore (A); detalhe da floração (B); detalhe das sementes de braúna (*Melanoxylon brauna*). Fonte: Campus da UFV, Viçosa – MG.

TEOR DE ÁGUA

A maturação das sementes compreende as transformações morfológicas, fisiológicas e funcionais que acontecem no óvulo fertilizado, e que culminam com o ponto de máximo peso de matéria seca da semente. Neste ponto, a semente atinge também máximo poder germinativo e máximo vigor, sendo por isso denominado “ponto de maturidade fisiológica”. As principais modificações durante a maturação ocorrem no grau de umidade, no peso de matéria seca, no poder germinativo e no vigor da semente (Popinigis, 1977).

Por isso, determinação do teor de água em sementes é de fundamental importância logo após a maturação fisiológica, seja na colheita, secagem, armazenamento e comercialização, considerando-se que erros na determinação da umidade irão acarretar prejuízos econômicos (Luz, et al., 1993).

O método de determinação de umidade oficial adotado no Brasil, prescreve a utilização de estufa, sem ventilação forçada, à temperatura de $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

durante 24 horas, sem moer as sementes ou grãos (Brasil, 1992). Em nível internacional, cada país tem seu método oficial, e dentro de cada país o binômio tempo x temperatura para o método de estufa, varia para determinadas culturas (Bowden, 1984; Stanwood & McDonald, 1989). Segundo Roberts e Ellis (1989), para os tecnólogos, o teor de água é geralmente expresso como uma porcentagem do peso de matéria seca, seguindo normal do ISTA (International Seed Testing Association).

Entretanto, apesar das muitas publicações comparativas acerca da eficiência dos diferentes métodos de determinação do teor de água, estes se referem às sementes de espécies cultivadas. Dessa forma, são praticamente inexistentes métodos específicos estabelecidos para sementes florestais.

Segundo Carneiro (1985), o teor de água da semente é função direta da umidade relativa do ar com o qual mantém estreito contato. Filho (2005) complementa descrevendo a semente e a atmosfera como dois sistemas permanentemente em troca de água com sentido de movimentação estabelecido pela diferença de potencial hídrico até que seja atingido o equilíbrio energético da água entre as sementes e o ar, chamado ponto de equilíbrio higroscópico.

Sabe-se que a umidade é o fator que mais influencia a taxa respiratória das sementes. A respiração das sementes, e conseqüente metabolismo das reservas, aumentam consideravelmente com o aumento da umidade. Isso concorre para aumento na taxa de deterioração resultando em menor vigor e viabilidade (Varela e Façanha, 1987; Bewley e Black, 1994; Andrade Júnior, 1998; Athié et al., 1998).

De acordo com o nível de tolerância das sementes à dessecação, elas podem ser classificadas como ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias. As sementes ortodoxas podem ser seguramente desidratadas a baixos níveis de umidade, geralmente, em média, a 5%. De maneira geral, a longevidade das sementes ortodoxas aumenta com a redução do teor de umidade (Kraak, 1993; Roberts, 1973).

Segundo Andrade Júnior (1998), o teor de água mais indicado para sementes ortodoxas está na faixa de 4 a 6%. Valores acima desta faixa resultariam na perda de atividade de várias enzimas e níveis mais baixos favoreceriam a oxidação lipídica.

Entretanto, o comportamento da relação água-semente é variável nas diferentes espécies. O teor de água observado tem variado entre 6,14% e 8,25%

para sementes de *Dipteryx alata* (Botezelli et al. 2000). Sementes de *Caesalpinia peltophoroides* mantidas a 20°C mostraram redução do teor de umidade de 8 para 5% ao longo do período de armazenamento (Pontes et al., 2006). Sementes de feijão, soja e sorgo apresentaram umidade de 12,8%, 10,7% e 13%, respectivamente, quando em equilíbrio higroscópico a 20°C (Marcos Filho, 2005).

VIGOR E DETERIORAÇÃO DE SEMENTES

A avaliação do vigor das sementes começou nos EUA na década de 40 e tem evoluído à medida que os testes vêm sendo aperfeiçoados, ganhando precisão e reprodutibilidade de seus resultados, o que é de fundamental importância nas decisões que devem ser tomadas nas fases de produção e comercialização dos lotes (Franco e Petrini, 2002).

Para estudo do potencial de armazenamento de sementes, faz-se necessário a compreensão dos conceitos de vigor e deterioração de sementes. Segundo Marcos Filho (2005), deterioração ou envelhecimento leva à queda gradativa da viabilidade e do vigor das sementes. A deterioração das sementes pode ser vista como um complexo de mudanças físicas, bioquímicas e fisiológicas que ocorrem com o passar do tempo, resultando na diminuição no grau de capacidade e desempenho da semente na produção de uma plântula normal (Krzyzanowski & França Neto, 2001). A dimensão das mudanças que ocorrem neste processo depende especialmente do período de tempo e condições de armazenamento (Bingham et al., 1994).

Segundo Delouche (1963), a deterioração começa a partir da maturidade fisiológica (deterioração zero) até a total perda da capacidade de germinar, tendo assim, papel determinante na qualidade da semente. A duração do processo de deterioração é determinada principalmente pela interação entre herança genética e fatores ambientais relacionados ao manejo pós-colheita das sementes (Delouche e Baskin, 1973).

Delouche (1963) caracteriza a deterioração como processo inexorável, irreversível, mínimo na maturidade fisiológica, cuja velocidade varia entre lotes de

sementes da mesma variedade, sendo variável entre sementes individuais dentro de um lote e com diferenças inerentes entre espécies quanto à longevidade.

A perda da germinação é o último efeito ou consequência da deterioração. Assim, a natureza progressiva da deterioração e seus efeitos iniciais não são levados em conta ao analisar-se apenas a germinação das sementes (Delouche, 1963; Marcos Filho, 2005).

A partir dessa premissa de que a perda da capacidade de germinar é a consequência final da deterioração da semente, pode-se considerar a existência de efeitos da deterioração antes mesmo que a porcentagem de germinação seja afetada. Esses efeitos afetam significativamente o valor das sementes para semeadura e, por isso, é questão de interesse o estudo dos processos fisiológicos da deterioração de sementes quando da armazenagem.

CAUSAS E EFEITOS DA DETERIORAÇÃO

Os efeitos da deterioração vêm sendo classificados em fisiológicos ou metabólicos/bioquímicos (Braccini, et al., 2001; Marcos Filho, 2005).

Os *efeitos fisiológicos* são mais evidentes, e destacam-se: redução na velocidade de emergência (primeiro sintoma da queda do vigor, geralmente determinada pela desorganização do sistema de membranas); redução do crescimento; menor resistência às condições desfavoráveis do ambiente durante germinação e emergência; decréscimo do potencial de armazenamento; menor resistência à ação de microorganismos; desuniformidade e aumento da anormalidade no desenvolvimento de plântulas, redução da porcentagem de germinação; e perda do poder germinativo.

Carvalho (1994), Marcos Filho (2005), entre outros autores, destacam como principais efeitos metabólicos e bioquímicos, a redução da respiração e síntese de ATP; alterações em sistemas enzimáticos; alterações no metabolismo de reservas; alterações nas taxas de síntese e alterações nos sistemas de membranas.

A deterioração pode ser explicada pelo fato do envelhecimento das sementes levar à peroxidação de lipídios que é subsequentemente a causa de

perturbações à membrana (Sung e Jeng, 1994; Chang e Sung, 1998). Tais mudanças nas membranas, com o envelhecimento das sementes, levam ao extravasamento de eletrólitos. Goel e Sheoran (2003) mostraram clara correlação entre a diminuição da germinabilidade com o aumento do extravasamento de eletrólitos, o que se reflete na perda da integridade das membranas.

Esse fenômeno pode ser um indicador da incapacidade das sementes de manter a coesão das membranas, resultando em redução da germinabilidade (Chang e Sung, 1998). Por meio da atividade metabólica celular, a causa da desestruturação das membranas seria a reação desses lipídios estruturais com o oxigênio molecular, resultando em radicais livres e peróxidos de ácidos graxos com relativa instabilidade, razão pela qual esse processo é chamado de “peroxidação de lipídios” (Carvalho, 1994).

Os radicais livres indutores de danos tem papel chave na deterioração de sementes durante o envelhecimento. O aumento da peroxidação de lipídios, mediado por radicais livres e peróxidos é uma das prováveis razões para a perda da viabilidade de sementes durante armazenamento (Hendry, 1993; Sung, 1996). Eles reagem com os ácidos graxos insaturados afetando estrutura e função das membranas celulares.

A influência da peroxidação dos lipídios sobre as mitocôndrias, é geralmente o primeiro passo em direção a morte da célula (McDonald, 1999). O problema da peroxidação dos lipídios não é apenas a destruição dos lipídios, mas a ocorrência de uma série de reações que originam produtos potencialmente tóxicos (Marcos Filho, 2005), como a liberação de radicais superóxido (Araújo, 1994) e hidroxila (Carvalho, 1994). O ataque desses radicais livres promove alterações nas membranas das cristas das mitocôndrias e conseqüente decréscimo da formação de ATP, forma de energia fundamental para os eventos metabólicos durante a germinação (Marcos Filho, 2005).

Além disso, o acúmulo de produtos tóxicos durante a deterioração inclui a formação de etanol e aldeídos (resultado da respiração anaeróbica e da peroxidação de lipídios), de ácidos graxos de cadeias curtas e de compostos fenólicos, também produtos da peroxidação de lipídios (Coolbear, 1995). Os lipídios das sementes estão sujeitos a constante ataque pelo oxigênio, formando hidroperóxidos, ácidos graxos oxigenados e radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas EROs são quimicamente instáveis e podem danificar

as moléculas mais próximas; se as sementes estiverem muito secas, os danos não serão reparados e os efeitos se acumulam durante o armazenamento e se manifestarão durante a germinação (Marcos Filho, 2005).

RADICAIS LIVRES OU ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Plantas consomem oxigênio, usando-o como acceptor final de elétrons e convertendo-o a água no final da cadeia respiratória. Todavia, o processo de utilização do oxigênio molecular pode ainda seguir uma rota alternativa – consecutivas transferências monoelétrônicas gerando intermediários de oxigênio parcialmente reduzidos e de alta reatividade, os quais podem causar danos ou mesmo efeito letal (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Os produtos altamente reativos originados da redução do O_2 são chamados intermediários reativos de oxigênio ou, mais frequentemente, espécies reativas de oxigênio (ERO), os quais incluem os radicais livres bem como as moléculas de alta reatividade, tais como H_2O_2 , oxigênio singleto (1O_2), O_3 , etc, os quais são facilmente interconvertidos entre si (Edreva, 2005). A conversão do H_2O_2 a OH^- é tida como um dos principais eventos causadores de danos em sistemas biológicos produzindo a maioria das injúrias conhecidas causadas por radicais livres (Grant e Loake, 2000).

Tradicionalmente, os estudos mostram a ação das EROs apenas como geradores de dano oxidativo. Entretanto, pesquisas recentes demonstram que diversas respostas celulares a estímulos fisiológicos normais ou a estresses são induzidas pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em compartimentos celulares específicos (Edreva, 2005; Kwak et al., 2006; Fedoroff, 2006) mostrando seu papel importante na sinalização celular. No entanto, esses autores, enfatizam como fundamental o balanço entre a produção e remoção das ERO no meio celular, pois o desequilíbrio, pelo aumento dos níveis de ERO, acarreta efeito deletério com conseqüente morte celular. Assim, pode-se afirmar que o efeito danoso das ERO depende de um delicado equilíbrio espacial e temporal entre a produção e remoção das mesmas.

Os danos às membranas podem ser resultantes, além da peroxidação dos lipídios, das mudanças na composição de ácidos graxos, perdas de fosfolipídios das membranas e mudanças estruturais (Coolbear, 1995). É relevante ressaltar ainda que os eventos deteriorativos não ocorrem isoladamente. Os danos às membranas mitocondriais tem efeito direto na respiração, enquanto que os danos às membranas do retículo endoplasmático e complexo de Golgi, podem ter maior impacto na síntese de proteínas, e danos no DNA terão conseqüências na atividade de transcrição (Braccini, et al., 2001).

Radicais livres de oxigênio podem atacar lipídios e DNA aumentando o número de subprodutos tóxicos (Imlay e Linn, 1988). A produção de radicais livres afeta a formação de varias enzimas, por promover modificação em suas estruturas (McDonald, 1999). O aumento na taxa de proteólise na célula ocorre à medida que aumenta o estresse oxidativo promovido por EROs, implicando na modificação de proteínas intracelulares. Essas proteínas modificadas são seletivamente reconhecidas e preferencialmente degradadas por enzimas proteolíticas intracelulares (Grune, et al., 1997; Solomon, et al., 1999).

O aumento da geração de espécies reativas de oxigênio *in vivo* pode ter efeito deletério, pois estão envolvidos em mutagênese, apoptose, envelhecimento e carcinogênese (Halliwell e Gutteridge, 1990).

INFLUÊNCIA DA DETERIORAÇÃO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O aumento na atividade celular ocorre às expensas das substâncias de reserva das sementes, que são transformadas em energia para a manutenção dos tecidos vivos das sementes e de novos compostos para o reparo de estruturas danificadas pela deterioração (Bewley & Black, 1994).

Observa-se, em geral, acúmulo de açúcares redutores e decréscimo nos níveis de açúcares solúveis, açúcares totais e de amido durante a deterioração (McDonald, 1999), acarretando em menor disponibilidade de substratos para a respiração, e provocando queda da germinação e vigor (Marcos Filho, 2005). Além disso, redução nos níveis de sacarose, rafinose e estaquiose podem afetar o grau de proteção proporcionado pelos açúcares à integridade das membranas

(Ferreira & Borguetti, 2004), e a presença de açúcares redutores pode induzir a deterioração dos componentes das proteínas (Marcos Filho, 2005). Zeleny (1954) observou o decréscimo de açúcares não redutores e aumento de açúcares redutores e ácidos graxos livres em cereais, associados com a perda do vigor.

Marcos Filho (2005) destaca os decréscimos do teor e da síntese de proteínas; no teor de aminoácidos; no conteúdo de proteínas solúveis e a desnaturação provocada por temperaturas elevadas determinando a perda da habilidade de desempenhar suas funções durante a deterioração. Zeleny (1954) já havia observado o decréscimo de proteínas em cereais, associados com a perda do vigor. Modificação nas proteínas causada pelo estresse oxidativo é caracterizado pela produção de grupos carbonil na molécula (Reinheckel et al., 1998). Níveis basais desses grupos carbonil em plantas são tidos como resultados de processos fisiológicos normais, mas, o aumento nos níveis tem sido correlacionado com o aumento do estresse oxidativo (Stieger and Feller, 1997).

A senescência em plantas é um processo natural caracterizado principalmente por intensa perda de proteínas, dentre outras alterações (Del Rio, et al., 1998). Senescência também tem sido relacionada ao aumento da atividade proteolítica (Desimone et al., 1996). Pesquisas mostram declínio no conteúdo de proteínas em embriões de sementes de trigo envelhecidas naturalmente (Grilli et al., 1995).

O dano celular causado pela peroxidação de lipídios pode ser reduzido ou prevenido por mecanismos de proteção envolvendo radicais livres e enzimas de remoção do peróxido, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) (Bowler et al., 1992).

ENZIMAS ANTIOXIDANTES

As enzimas desempenham um importante papel no processo de deterioração de sementes e sua menor atividade pode ser indicativa da perda de qualidade (Brandão Junior, 1996). A desestruturação de membranas sempre foi considerada como o primeiro evento degenerativo de sementes e, em função da desorganização das membranas celulares, as sementes tendem a reduzir o vigor,

o que pode ser verificado pelo aumento da quantidade de lixiviados durante o processo de embebição das sementes (Lin, 1988; Marcos Filho et al., 1990). Segundo Silva (2006), as avaliações de atividade enzimáticas são mais sensíveis que o teste de condutividade elétrica.

EROs (espécies reativas de oxigênio) são produzidas em células estressadas e não estressadas. As plantas tem sistemas de defesa contra EROs bem desenvolvidos, prevenindo tanto sua formação como também a remoção dos mesmos. Em condições normais a formação e a remoção ocorre de forma balanceada. Entretanto, em condições de estresse, pode haver aumento na formação de EROs associado à supressão dos sistemas de defesa (Alscher et al., 2002).

As plantas respondem ao aumento dos EROs com aumento dos processos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Alscher and Hess, 1993), mas os mecanismos desses processos ainda não são bem compreendidos.

Dentro da célula, as superóxido dismutases constituem a primeira linha de defesa contra EROs (Alscher et al., 2002). Como todos os compartimentos celulares são possíveis locais de formação de O_2^- , é fundamental que SODs estejam presentes para remove-los.

Baseado no metal co-fator usado pela enzima, as SODs são classificadas em 3 grupos: Fe SOD, Mn SOD, e Cu-Zn SOD, e essas coenzimas são localizadas em diferentes compartimentos da célula (Alscher et al., 2002). Segundo McDonald (1999), SODs são encontradas principalmente no citoplasma celular e na matriz mitocondrial e constituem primeiro grupo de enzimas que catalisa a reação de dismutação de radicais superóxido livres (O_2^-) para oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Senaratna et al. (1986), afirmaram que a SOD é o mais notável exemplo de neutralizador de radicais livres, pois é efetiva ao menor sinal de dano. Já Rosa et al. (2005) avaliando tolerância de sementes de *Zea mays* a altas temperaturas de secagem, não observaram diferença na atividade da SOD.

Segundo Alscher et al. (2002) e Taiz & Zaiger (2004), apesar de sua grande efetividade na neutralização do oxigênio reativo, a SOD produz H_2O_2 que, apesar de menos reativo, em altas concentrações torna-se tóxico. Assim, sua atividade isoladamente é pouco funcional na proteção da semente, sendo necessária a formação de um sistema removedor de radicais livres,

conjuntamente com catalase, peroxidase (Bowler et al., 1992; McDonald, 1999), e carotenóides, entre outros protegendo as membranas do dano peroxidativo (Fridovich, 1986)..

O H_2O_2 formado pode ser decomposto pela catalase, cujas subunidades são formadas no citoplasma, sendo a síntese completada no peroxissomo (McDonald, 1999). A H_2O_2 é parcialmente detoxificada pela CAT (ativa em altas concentrações de H_2O_2) nos peroxissomos, mas o H_2O_2 no citosol e cloroplastos é degradada pela peroxidase (Klapheck et al., 1990). Em outra rota, caso não seja detoxificada por essas enzimas, o H_2O_2 pode reagir formando radicais hidroxila (Bowler et al., 1992) que causam peroxidação de lipídios.

As perdas das atividades das enzimas CAT e POX podem ser responsáveis pelo acúmulo de H_2O_2 em sementes de *Zea mays* durante envelhecimento (Chang e Sung, 1998). Sung e Chiu (1995) mostraram aumento da peroxidação de lipídios associado à redução na atividade das enzimas de remoção de radicais livres em sementes de soja envelhecidas naturalmente.

Entretanto, a perda da atividade das enzimas pode ser devido a deterioração das proteínas solúveis pela reação de Amadori e Maillard, induzido pelo envelhecimento (Sung e Jeng, 1994; Machado Neto et al., 2001).

Observa-se intensa atividade da enzima SOD, durante os estádios de maturação e secagem de sementes de *Glycine max* (SILVA, 2006), entretanto, segundo Stewart e Bewley (1980) a atividade da SOD não foi detectada em sementes armazenadas. Nestas, a POX também foi detectada atuando no eixo e nos cotilédones de sementes armazenadas (Sung e Jeng, 1994). A germinação das sementes de *Gossypium hirsutum* diminuiu após tres meses de armazenamento enquanto a atividade da CAT, POX e SOD caíram progressivamente com o envelhecimento dessas sementes (Goel and Sheoran, 2003). CAT e SOD foram detectáveis em eixo e cotilédones de *Arachis hypogaea*, mas POX só teve atividade no eixo. Com aumento do envelhecimento houve concomitante redução da atividade de SOD e POX, mas a atividade da CAT não variou com o efeito do envelhecimento (Sung e Jeng, 1994).

A deterioração de sementes de *Helianthus annuus* durante envelhecimento artificial foi estritamente relacionada à redução da atividade das enzimas de detoxificação das EROs e aumento da peroxidação de lipídios (Bailly et al., 1996). Entretanto estes autores levantam a discussão de que é difícil distinguir se o dano

oxidativo e o decréscimo na atividade enzimática são causas ou conseqüências da perda da viabilidade das sementes. Um agravante do envelhecimento artificial em relação ao natural é que este pode atuar desnaturando as enzimas ou afetar sua síntese (Bailly et al., 1996).

Em embriões de *Triticum aestivum* a atividade da SOD decresceu durante a secagem no período de maturação das sementes e aumentou quando as sementes foram expostas à secagem artificial (Lehner et al., 2006). Em embriões de *Triticum aestivum*, observa-se queda na atividade da CAT e SOD durante a fase de secagem no final da maturação e aumento na atividade de ambas durante a secagem artificial pós-colheita (Lehner et al., 2006).

QUALIDADE DAS SEMENTES

Quando a conservação *ex-situ* é escolhida como estratégia para garantir a sobrevivência de uma espécie, torna-se necessário, inicialmente, conhecer o comportamento de armazenamento de sua semente. O comportamento das sementes durante armazenamento sofre influência de diversos fatores associados à qualidade inicial da semente (condições climáticas durante a maturação das sementes; grau de maturação no momento da colheita; ataque de pragas e doenças; grau de injúria mecânica), e às características do ambiente (umidade relativa do ar ou teor de água das sementes; temperatura do ar; ação de fungos e insetos de armazenamento; embalagem) (Carvalho & Nakagawa, 2000; Marcos Filho, 2005).

Entretanto, é importante observar que os princípios gerais do armazenamento indicam que: o armazenamento não melhora a qualidade do lote de sementes, apenas a mantém; temperatura e umidade são vitais para a atividade fisiológica da semente; as melhores condições de armazenamento para sementes ortodoxas são no geral temperatura e umidade baixas; sementes imaturas e danificadas apresenta, menor potencial de armazenamento e este varia com a espécie (Carvalho & Nakagawa, 2000; UFSM, 2006).

A germinação, a pureza e a sanidade são três critérios de qualidade aceitos e determinados por análise de rotina em laboratórios para análise de

sementes. Estes parâmetros são de grande importância para avaliar a qualidade das sementes no mercado. No entanto não são os mais eficientes. Os lotes de sementes aprovados pelas análises deveriam, além de apresentarem elevada qualidade, manifestar alta capacidade de emergência a campo, o que, entretanto, pode não ocorrer. O vigor da semente aparece como um quarto critério de qualidade, principalmente, no que se refere, ao comportamento no campo. A expressão vigor das sementes foi utilizada durante muitos anos, mas somente nas últimas duas décadas se reconheceu como um fator definível de qualidade e se compreendeu seus efeitos sobre o comportamento e emergência da semente a campo (Franco e Petrini, 2002).

TESTES DE ANÁLISE DO VIGOR DE SEMENTES

Segundo Carvalho (1986), existe diversos estudos que buscam a padronização dos testes de vigor que pode ser refletido através de várias características como velocidade de germinação, uniformidade de emergência, resistência ao frio, temperatura e umidade elevadas, substâncias tóxicas etc. Diante disto, deve-se ressaltar a importância da realização de um conjunto de testes que responda a estas características.

Os objetivos básicos dos testes de vigor consistem em avaliar ou detectar diferenças significativas na qualidade fisiológica de lotes com germinação semelhante, complementando as informações fornecidas pelo teste de germinação; distinguir, com segurança, lotes de alto dos de baixo vigor; separar (ou classificar) lotes em diferentes níveis de vigor, de maneira proporcional ao comportamento quanto à emergência das plântulas, resistência ao transporte e potencial de armazenamento (Popinigis, 1977; Marcos-Filho, 1999).

A aplicação dos testes de vigor em sementes de espécies florestais é uma prática que permite estimar e comparar lotes de sementes para diferentes objetivos. A simplicidade, inerente a vários desses testes, aliada aos bons resultados, tornam-os de utilização promissora em vários campos de pesquisa. Comparações de vigor de sementes entre matrizes, progênies e procedências, podem oferecer ao pesquisador dados adicionais em uma fase inicial de um

programa de melhoramento ou conservação genética (Valentini & Piña-Rodrigues, 1995).

TESTE DO TETRAZÓLIO

A avaliação da qualidade de sementes por meio de testes rápidos que proporcionem resultados reproduzíveis tem sido uma busca constante dos tecnologistas de sementes. Entre esses o teste do tetrazólio vem se destacando, pois além de avaliar viabilidade e vigor, permite a identificação dos fatores que influenciam a qualidade (Krzyzanowski et al., 1991; França-Neto, 1999; Bhering et al., 2005). Os dados obtidos através desse teste podem ser utilizados no estabelecimento de bases para a comercialização, determinação do ponto de colheita, e controle de qualidade durante o armazenamento (Marcos Filho, 2005).

O teste do tetrazólio se baseia na alteração da coloração dos tecidos vivos em presença de solução de tetrazólio. Essa alteração na coloração reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas na atividade respiratória. Estas enzimas, particularmente, a desidrogenase do ácido málico, catalizam a reação dos íons H⁺, liberados pelos tecidos vivos, que reduzem o sal (2,3,5 - trifenil cloreto de tetrazólio), formando substância de cor vermelha, estável e não difusível, denominada trifenilformazan. A pigmentação vermelha indica viabilidade celular e do tecido (Kryzanowski et al., 1999).

Considerando a estrutura morfológica da semente, sabe-se que há regiões específicas, mais sensíveis à deterioração do que outras (Das e Sem-Mandi, 1992; Marcos Filho, 2005). Sementes podem permanecer viáveis mesmo se os cotilédones são danificados, mas se o eixo embrionário morrer ou for severamente danificado nenhuma plântula será produzida (Sung e Jeng, 1994). Durante o envelhecimento o eixo embrionário tende a ter maior peroxidação de lipídios e subsequentemente maior acúmulo de peróxidos por unidade de peso seco do que os cotilédones. Isso pode se dar pela variável proteção contra os oxidantes ambientais provida pelas características morfológicas das sementes. Em geral, nas sementes, o acesso do oxigênio, pré-requisito para a peroxidação de lipídios, para tecidos mais profundos do cotilédone é restrito. Ao contrario, o eixo embrionário é mantido exposto em posições mais superficiais, na periferia da

semente, e então mais susceptível à peroxidação do que porções profundas dos tecidos do cotilédone (Priestley et al., 1986).

Por isso, parâmetros de avaliação da qualidade de sementes que qualifiquem eixo embrionário e cotilédones separadamente, tal como o teste do tetrazólio, contribuem com informações relevantes sobre o vigor das sementes.

Assim, diversos autores vêm padronizando metodologias do teste de tetrazólio para espécies florestais, como os trabalhos realizados para sementes de *Bactris gasipaes* (Ferreira e Sader, 1987), *Hevea brasiliensis* (Wetzel et al., 1992), *Platycyamus regnellii* (Davide et al., 1995), *Dipteryx alata* (Malavasi et al., 1996), *Kielmeyera coriacea* (Davide et al., 1997), *Genipa americana* (Nascimento e Carvalho, 1998), *Pterodon pubescens* (Ferreira et al., 2001), *Mauritia flexuosa* (Spera et al., 2001), *Albizia hasslerii* (Zucareli et al., 2001), *Jatropha elliptica* (Añez, 2003), *Senna macranthera* e *Senna multijuga* (Ferreira et al., 2004), *Eremanthus elaeagnus*, *E. glomerulatus* e *E. Incanus* (Velten e Garcia, 2005), *Peltophorum dubium* (Oliveira et al., 2005), *Tabebuia aurea* (Oliveira et al., 2006), *Lafoensia pacari* (Mendonça et al., 2006), *Gleditschia amorphoides* (Fogaça et al., 2006), *Enterolobium contortisiliquum* e *Schizolobium parahyba* (Cherobini, 2006), *Anadenanthera peregrina* (Pinho, 2007).

Tabela 1 – Revisão das recomendações disponíveis do teste do tetrazólio para sementes de espécies florestais.

Table 1 - Revision of the available recommendations of the tetrazolium test for seeds of forest species.

| Espécie | Recomendação do TTZ | Autor |
|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>Bactris gasipaes</i> | TTZ 0,1 a 1,0% por 4 horas | Ferreira e Sader, 1987 |
| <i>Hevea brasiliensis</i> | TTZ 0,5% por 2 horas | Wetzel et al., 1992 |
| <i>Platycyamus regnellii</i> | TTZ 0,1% por 2,5 horas | Davide et al., 1995 |
| <i>Dipteryx alata</i> | TTZ 0,1% por 5 horas | Malavasi et al., 1996 |
| <i>Kielmeyera coriacea</i> | TTZ 0,1% por 10 horas | Davide et al., 1997 |
| <i>Genipa americana</i> | TTZ 0,25% por 2 horas | Nascimento e Carvalho, 1998 |
| <i>Mauritia flexuosa</i> | TTZ 1,0% por 5 horas | Spera et al., 2001 |
| <i>Pterodon pubescens</i> | TTZ 0,075% por 6 horas | Ferreira et al., 2001 |

| | | |
|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| <i>Albizia hasslerii</i> | TTZ 0,1% por 5 horas | Zucareli et al., 2001 |
| <i>Jatropha elliptica</i> | TTZ 0,5% por 1,5 horas | Añez, 2003 |
| <i>Senna macranthera</i> | TTZ 0,075% por 7 horas | Ferreira et al., 2004 |
| <i>Senna multijuga</i> | TTZ 0,075% por 5 horas | Ferreira et al., 2004 |
| <i>Peltophorum dubium</i> | TTZ 0,1% por 2,5 horas | Oliveira et al., 2005 |
| <i>Tabebuia aurea</i> | TTZ 0,1% por 24 horas | Oliveira et al., 2006 |
| <i>Lafoensia pacari</i> | TTZ 0,075% por 1 a 2 horas | Mendonça et al., 2006 |
| <i>Gleditschia amorphoides</i> | TTZ 0,075% por 3 horas | Fogaça et al., 2006 |
| <i>Enterolobium contortisiliquum</i> | TTZ 0,1% por 3 horas | Cherobini, 2006 |
| <i>Schizolobium parahyba</i> | TTZ 0,2% por 2,5 horas | Cherobini, 2006 |
| <i>Anadenanthera peregrina</i> | TTZ 0,1% por 24 horas | Pinho, 2007 |

CONDUTIVIDADE ELÉTRICA

O primeiro evento no envelhecimento da semente é a perda da permeabilidade seletiva nas membranas, que são locais importantes para muitas reações. Conseqüentemente, as enzimas tornam-se menos eficientes em suas atividades catalíticas, cromossomos podem acumular mutações, as reservas são decompostas e há acúmulo de produtos tóxicos que prejudicam o desempenho das sementes (Priestley, 1986; Smith & Berjak, 1995; McDonald, 1999).

Apesar de o teste de germinação ser fundamental para a avaliação da viabilidade das sementes em bancos de germoplasma (Heywood, 1989; Brasil, 1992), o teste de condutividade elétrica, por ser rápido e prático, é utilizado para determinar o vigor de sementes, podendo ser utilizado em laboratórios de tecnologia de sementes sem maiores despesas (Kryzanowski et al. 1999).

A organização do sistema de membranas em sementes pode refletir o seu estágio de deterioração e, conseqüentemente, a qualidade fisiológica. Por isso os testes de vigor baseados na integridade dos sistemas de membranas da semente vêm merecendo especial atenção, por identificar o processo de deterioração na

sua fase inicial e permitir que medidas corretivas sejam tomadas para reduzir ou minimizar o seu efeito na qualidade fisiológica da semente. Dentre os métodos que se baseiam nesse princípio destacam-se os testes da condutividade elétrica, lixiviação de potássio e pH do exsudato.

A perda da integridade da membrana (Heydecker, 1972; Ferreira & Borguetti, 2004; Marcos Filho, 2005; Faria, 2006) acarreta a liberação para o meio de componentes celulares essenciais, favorecendo o aparecimento de microorganismos (Woodstock, 1973; Coolbear, 1995).

A medição da condutividade elétrica por meio da quantidade de eletrólitos liberados pela semente na água de embebição tem sido aplicada, de modo mais freqüente, em uma amostra de sementes representativa da população (método massal). No entanto, esse método apresenta a desvantagem de que os resultados expressam a condutividade média de um grupo de sementes, onde poucas sementes mortas podem afetar a condutividade de um lote com muitas sementes de alta qualidade. Para minimizar esse problema, recomenda-se escolher as sementes, excluindo-se aquelas danificadas.

Para espécies florestais vários autores vêm utilizando estes métodos para avaliar o vigor das sementes, entre os quais destacam-se Borges, et al. (1990) trabalhando com sementes de *Cedrela fissilis*, Barbedo & Cicero (1998) com sementes de *Inga uruguensis*, Marques et al. (2002) utilizando sementes de *Dalbergia nigra*, Pertel (2004) com sementes de *Coffea arabica* e Santos & Paula (2007) trabalhando com sementes de *Sebastiania commersoniana*.

ENVELHECIMENTO ACELERADO (ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL)

O teste de envelhecimento acelerado tem como base o fato de que a taxa de deterioração das sementes é aumentada consideravelmente através da exposição a níveis adversos de temperatura e umidade relativa, considerados os fatores ambientais mais relacionados à deterioração. Desse modo, lotes de sementes com alto vigor manterão ou perderão pouco de sua viabilidade (germinação e emergência de plântulas normais) quando submetidos ao estresse, enquanto as de baixo vigor terão sua viabilidade reduzida (AOSA, 1983; Marcos-Filho, 1994; Vieira & Carvalho, 1994).

O envelhecimento artificial é um teste amplamente utilizado nos Estados Unidos (Hampton, 1992) e no Brasil (Krzyzanowski et al., 1991). Tornou-se um dos testes mais utilizados para avaliação da qualidade fisiológica de sementes, principalmente para espécies cultivadas. Para sementes florestais, o teste de envelhecimento artificial é utilizado para avaliar o vigor de sementes de diversas espécies e está incluído em programas de controle de qualidade por empresas produtoras de sementes, pois em poucos dias, podem-se obter informações relativamente seguras sobre o potencial de armazenamento dos lotes processados e emergência das plântulas em campo (Marcos Filho, 1999).

Borges *et al.* (1990) submeteram sementes de *Cedrela fissilis* (cedro) ao envelhecimento a 40 e 50°C, por até 96 horas, e verificaram que a 40°C não houve grandes variações na germinação e nos níveis de carboidratos, lipídios e liberação de exsudados. Porém, a 50°C, estes componentes químicos foram significativamente alterados, a exceção do teor de lipídios. Também Borges *et al.* (1992) envelheceram sementes de *Piptadenia communis* (pau-jacaré) por 0, 16, 20, 24 e 48 horas, a 40°C, e verificaram que o envelhecimento resulta em decréscimo na viabilidade das sementes, sendo maior a utilização das reservas de lipídios e açúcares, contudo, sem alterações aparentes na permeabilidade da membrana celular.

Pizetta *et al.* (2001) submeteram sementes de *Poecilanthe parviflora* (coração-de-negro) a diferentes períodos de envelhecimento até um tempo máximo de 120 horas, a 42°C, e os resultados obtidos não foram suficientes para provocar alterações na germinação. Araújo Neto (2001), trabalhando com *Acacia polyphylla* (monjoleiro), verificou redução significativa da qualidade fisiológica das sementes com a sua exposição a 41°C por 48 horas e Gonçalves (2003), trabalhando com sementes escarificadas de *Guazuma ulmifolia* (mutamba) recomendou para o teste de envelhecimento artificial as temperaturas de 41 e 45°C, por 120 e 96 horas, respectivamente.

Além desses, podem ser citados também os trabalhos desenvolvidos por Ramos *et al.* (1992) com *Mimosa scabrella* (bracatinga), Perez & Fanti (1995) com *Pelthophorum dubium* (canafístula), Torres & Smiderle (1995) com *Prosopis juliflora* (algaroba) e Davide & Leite (1999) com *Anadenanthera peregrina* (angico-vermelho), Santos e Paula (2007) com *Sebastiania commersoniana* (sapicuxava).

Entretanto, Valentini & Piña-Rodrigues (1995) consideraram que poucos

são os testes de vigor com metodologia conhecida. A temperatura e o tempo de permanência das sementes na câmara ainda não estão estabelecidos para todas as espécies, não havendo consenso quanto a esses fatores. Diante do exposto, pode-se considerar que atualmente ainda é pequeno o número de trabalhos com o teste de envelhecimento artificial em função da diversidade das espécies florestais nativas.

APLICABILIDADE

Extração de antioxidantes naturais a partir de sementes tem demonstrado elevado potencial de atuação tanto em períodos iniciais quanto mais adiantados no processo oxidativo (Jardini e Mancini Filho, 2007), tendo seu uso indicando na prevenção da oxidação de alimentos, e como anti-envelhecimento em células humanas e animais (Yamasaki, et al., 2004).

O uso de extrato de sementes no tratamento de câncer em animais promoveu diminuição nos níveis de peroxidação de lipídios, e aumento da atividade de enzimas antioxidativas, e como consequência diminuição no volume e peso do tumor e aumento no tempo de sobrevivência do animal doente, exibindo assim significativo efeito antioxidante e atuação antitumoral (Rajeshwar, et al., 2005; Gutierrez-Urbe et al., 2007).

Este estudo tem por finalidade a pesquisa básica visando elucidar possíveis mecanismos envolvidos na perda da viabilidade e morte de sementes. Entretanto, o trabalho de base não se desvincula do potencial aplicável da pesquisa, mas sim a essa fornece subsídios essenciais.

3. Referências Bibliográficas

ALSCHER, RG; ERTURK, N; HEALTH, LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental Botany**. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue. v.53, n.372, p.1331-1341, 2002.

ALSCHER, RG; HESS, JL. **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

AÑEZ, L.M.M. **Germinação de sementes e propagação “in vitro” de *Jatropha elliptica* Muell ARG (Euphorbiaceae)**. 2003. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade Federal do Mato Grosso.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigour testing handbook**. AOSA, 1983. 88p. (Handbook on seed testing. Contribution, 32)

ARAUJO, J.M.A. **Oxidação de lipídios**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 22 p., 1994.

ARAÚJO NETO, J. C. **Aspectos fenológicos, caracterização, germinação e armazenamento de sementes de *Acacia polyphylla* DC**. 2001. 199 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

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

BARBEDO, C.J.; CÍCERO, S.M. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.2, p.249-259, 1998.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Editora UFV, Viçosa – MG, 443 p., 1999.

BHERING, M.C.; DIAS, D.C.F.S.; BARROS, D.I. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de melancia. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.176-182, 2005.

BINGHAM, S.A.; HARRIS, A. McDONALD, L.A. Comparative study of radicle and coleoptile extension extension in maize seedlings from age and unaged seed. **Seed Science and Technology**. Zürich, v.22, p. 127-139, 1994.

BORGES, E. E. L.; CASTRO, J. L. D; BORGES, R. C. G. Avaliação fisiológica de sementes de cedro submetidas ao envelhecimento precoce. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 12, n. 1, p. 56-62, 1990.

BORGES, E.E.L.; CASTRO, J.L.D.; BORGES, R.C.G. Alterações fisiológicas em sementes de jacaré (*Piptadenia communis*) submetidas ao envelhecimento precoce. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 9-12, 1992.

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

BRACCINI, A.L.; BRACCINI, M.C.L. SCAPIN, C.A. Mecanismos de deterioração de sementes. **Informativo Abrates**, v.11, n.1, p.10-15, 2001.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

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

CABRAL, E.L.; BARBOSA, D.C.A.; SIMABUKURO, E.A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth. & hook. f. ex. s. Moore. **Acta Botanica Brasilica** v.17, n.4, p. 609-617, 2003.

CARVALHO, N.M. Vigor de sementes. In: CÍCERO, S.M.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R. **Atualização em produção de sementes**. Campinas: Fundação Cargil, 1986, p. 207-23.

CARVALHO, N. M. O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Eds.). **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994a. 164p. p.1-30.

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

CHANG, S.M.; SUNG, J.M. Deteriorative changes in primed sweet corn seeds during storage. **Seed Science and Technology**, 26, p.613-626, 1998.

CHAVES, M.M. & USBERTI, R. Previsão da longevidade de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.4, p.557-564, out/dez. 2003.

CHEROBINI, E.A.L. **Avaliação da qualidade de sementes e mudas de espécies florestais nativas**. Dissertação de mestrado (Engenharia Florestal), 115p. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS, 2006.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A.S. (ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York, The Haworth Press Inc. p.223-277, 1995.

CORTE, V. B. **Estudos histoquímicos, bioquímicos e fisiológicos em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. durante a germinação e crescimento inicial das plântulas**. Dissertação de mestrado (Engenharia Florestal), 69p. Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa – MG, 2005.

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.A.; VENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A.A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, v.30, n.6, p.941-949, 2006.

DAS, G.; SEN-MANDI, S. Scutellar amylase activity in naturally aged and accelerated aging wheat seed. **Annals of Botany**, v.69, n.6, p.497-501, 1992.

DAVIDE, A. C.; BOTELHO, S. A.; MALAVASI, M. M.; OLIVEIRA, L. M. Avaliação da viabilidade de sementes de pau-pereira (*Platycyamus regnellii*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 5., 1995, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRATES, 1995. p. 178.

DAVIDE, A. C.; MALAVASI, M. M.; OLIVEIRA, L. M.; MACHADO, C. F.; TONETTI, O. A. O. Uso do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart. (pau-santo). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 10., 1997, Foz do Iguaçu. **Anais**. Foz do Iguaçu: ABRATES, 1997. v. 7, n. 1/2, p. 219.

DAVIDE, A. C.; LEITE, J. A. C. Efeito da temperatura e do envelhecimento acelerado na germinação e no vigor de sementes de angico vermelho (*Anadenanthera peregrina* Benth. - Fabaceae-Mimosoideae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 11., 1999, Foz do Iguaçu. Foz do Iguaçu: ABRATES, 1999. (**Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 9, n. 1/2, p. 174, 1999).

DAVIDE, A. C. ; CARVALHO, L. R. de ; CARVALHO, M. L. M. de; GUIMARÃES, R. M. . Classificação Fisiológica de Sementes de Espécies Florestais Pertencentes À Família Lauraceae Quanto À Capacidade de Armazenamento. **Cerne**, Lavras, v. 9, n. 01, p. 29-35, 2003.

DEL RIO, LA; PASTORI, GM; PALMA, JM; SANDALIO, LM; SEVILLA, F; CORPAS, FJ; JIMÉNEZ, A; LÓPEZ-HUERTAS, E; HERNÁNDEZ, JA. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiology** v.116, p.1195-1200, 1998.

DELOUCHE, J.C. **Seed deterioration**. Seed World, v.2, n.4, p.14-15, 1963.

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.

DESIMONE, M; HENKE, A; WAGNER, E. Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated oat chloroplasts. **Plant Physiology** v.111, p. 789-803, 1996.

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems & Environment** v.106, p. 119-133, 2005.

FARIA, J. M. R. **Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds**. 2006. 135 p. Tese (Doutorado) – Wageningen Universiteit, Wageningen.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. São Paulo: Artmed, 2004. 323 p.

FERREIRA, S.A.N.; SADER, R. Avaliação da viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 9, n. 2, p.109-114, 1987.

FERREIRA, R.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.V.R.; TONETTI, O.A.O. Morfologia da semente e das plântulas e avaliação da viabilidade da semente de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth. - Fabaceae) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p.108-115, 2001.

FERREIRA, R.A.; DAVIDE, A.C.; MOTTA, M.S. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. e *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn., num banco de sementes em solo de viveiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n.1, p.24-31, 2004.

FOGAÇA, C.A.; MALAVASI, M.M.; ZUCARELI, C.; MALAVASI, U.C. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. Caesalpinaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n.3, p.101-107, 2006.

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

FRANÇA NETO, J.B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, p.81-87, 1999.

FRANCO, D.F.; PETRINI, J.A. Testes de Vigor em Sementes de Arroz. **Comunicado Técnico 68. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento**. Pelotas, RS 2002.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Arch. Biochem. Biophys**, 247, p. 1-11, 1986.

GRILLI, I.; BACCI, E.; LOMBARDI, T.; SPANO, C.; FLORIS, C. Natural ageing: Poly (A) polimerase in germinating embryos of *Triticum durum* wheat. **Annals of Botany**, New York, v.76, p.15-21, 1995.

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

GONÇALVES, E. P. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.) por meio de diferentes testes de vigor**. 2003. 64 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GRANT, J.J.; LOAKE, G.J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, v.124, p. 21-29, 2000.

GRUNE, T; REINHECKEK, T; DAVIES, KJA. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. **FASEB J**. v.11, p.526-534, 1997.

GUTIERREZ-URIBE, J. SERNA-SALDIVAR, S.; MORENO-CUEVAS, J; HERNANDEZ-BRENES, C.; GUAJARDO-TOUCHE, E. Título da Patente: **Inibição do crescimento de células cancerígenas por extratos de feijão preto (*Phaseolus vulgaris*)**. República Federativa do Brasil, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Patente número PI0510967-1, 126 pág, 2007. Fonte: <http://www.patentesonline.com.br/> [acessado em 18/10/2008].

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and medicine**, thirth ed Oxford University Press, Oxford, 1999.

HAMPTON, J.G. Vigour testing within laboratories of the International Seed Testing Association: a survey. **Seed Science & Technology**, v.20, n. 1, p.199 - 203, 1992.

HENDRY, GAF. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**. 3, p.141-153, 1993.

HEYDECKER, W. Vigour. In: ROBERTS, E.H. **Viability of Seeds**, Syracuse University Press, p.209-52, 1972.

HEYWOOD, V.H. **Estratégias dos jardins botânicos para a conservação**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico RJ, 69p., 1989.

IBAMA – Lista oficial de Flora ameaçada de extinção – acesso em 18/10/2008. Site: [<http://www.ibama.gov.br/flora>].

IMLAY, J.A.; LINN, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. **Science**, v.240, p.640-642, 1988.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Handbook of vigour test methods**. 3. ed. ISTA, 1995. P. 97-103.

JARDINI, F.A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 43, n. 1, jan./mar., 2007.

KRYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J. B. & HENNING, A.A. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.1, n.2, p.15-50, 1991.

KRYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J. B. Vigor de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.11, n.3, p.81-84, 2001.

KRYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: Conceitos e testes**. Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, Comitê de Vigor de Sementes. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

KWAK, J.M., NGUYEN, V.; SCHROEDER, J.I. The Role of Reactive Oxygen Species in Hormonal Responses. **Plant Physiology**, Vol. 141, p. 323–329, 2006.

LEHNER, A.; BAILLY, C.; FLECHEL, B.; POELS, P.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Changes in wheat seed germination ability, soluble carbohydrate and antioxidant enzyme activities in the embryo during the desiccation phase of maturation. **Journal of Cereal Science**, 43, p. 175-182, 2006.

LIN, S. S. efeito do período de armazenamento na lixiviação eletrolítica dos solutos celulares e qualidade fisiológica de sementes de milho (*Zea mais* L) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 10, n.1, p.59-67, 1988.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MALAVASI, M. M.; DAVIDE, A. C.; OLIVEIRA, L. M.; BOTELHO, S. A.; TONETTI, O. A. Avaliação da viabilidade de sementes de *Dipteryx alata* Voq. - Fabaceae (baru) através do teste de tetrazólio. In: SEMINÁRIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 15.; WORKSHOP SOBRE MARKETING EM SEMENTES E MUDAS, 3., 1996, Gramado. **Anais...** Gramado: CESM/FELAS, 1996. p. 43.

MARQUES, M.A.; PAULA, R.C.; RODRIGUES, T.J.D. Adequação do teste de condutividade elétrica para determinar a qualidade fisiológica de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex. Benth). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.24, n.1, p.271-278, 2002.

MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R. da; NOVEMBRE, A. D. C.; CHAMMA, H. M. C. P. Estudo comparativo de métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, com ênfase ao teste de condutividade elétrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 12, p. 1805-1815, dez. 1990.

MARCOS-FILHO, J. Envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D. & CARVALHO, N.M. (eds.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal, FUNEP, 1994. p.133-150.

MARCOS-FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA-NETO, J.B. (eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES/Comitê de Vigor, 1999. p.1.1-1.21.

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

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1999.

MEDEIROS, A.C.S.; SMITH, R.; PROBERT, R.; SADER, R. Comportamento fisiológico de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.), em condições de armazenamento. **Boletim Pesquisa Florestal**, n.40, p.85-98, 2000.

MENDONÇA, E.A.F.; COELHO, M.F.B.; LUCHESE, M. Teste de tetrazólio em sementes de mangaba-brava (*Lafoensia pacari* St. Hil. – Lythraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.2, p.33-38, 2006.

NASCIMENTO, W.M.O.; CARVALHO, N.M. Determinação da viabilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) através do teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.2, p.470-4, 1998.

OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A.C. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert – Leguminosae Caesalpinioideae. **Revista Cerne**, v.11, n.2, p.159-166, 2005.

OLIVEIRA, A.K.M.; SCHLEDER, E.D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Revista Árvore**, v.30, n.1, p.25-32, 2006.

PEREZ, S. C. J. G. A; FANTI, S. Efeitos do armazenamento, envelhecimento, tratamentos pré-germinativos na porcentagem e velocidade de germinação de *Pelthophorum dubium* (Spreng.) Taubert. (canafístula). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9., 1995, Florianópolis. Florianópolis: ABRATES, 1995. (**Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 185, 1995).

PERTEL, J. **Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o envelhecimento natural e artificial de sementes de café (*Coffea arabica* L.)** Tese (Doutorado em Fitotecnia) -, Universidade Federal de Viçosa – UFV - 64 f. 2003.

PIZETTA, P. U. C.; FILHO, D. F. S.; PAULA, R. C. Efeito do envelhecimento acelerado sobre o comportamento germinativo de sementes de coração-de-negro (*Poecilanthe parviflora* Benth. – Fabaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. Curitiba:ABRATES, 2001. (**Informativo ABRATES**, Londrina, v. 11, n. 2, p. 165, 2001).

PRIESTLEY, D.A. **Seed aging: implications for seed storage and persistence in the soil.** Comstock, Ithaca London, 1986.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes.** Brasília: Agiplan, 301 p., 1977.

PINHO, D.S. **Testes de tereazólio, envelhecimento acelerado e osmocondicionamento aplicados em sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg.** 55 f. Dissertação (Mestrado Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.

RAMOS, A.; BIANCHETTI, A.; MARTINS, E. G. Viabilidade de lotes de sementes de bracatinga comum (*Mimosa scabrella* Benth) e de bracatinga argentina (*Mimosa scabrella* variedade *aspericarpa*) após o teste de envelhecimento precoce. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 24/25, p. 79-82,1992.

RAJESHWAR,Y.; GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K. *In Vitro* Lipid Peroxidation and Antimicrobial Activity of *Mucuna pruriens* Seeds. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**. 05/41, p.32-35, 2005.

REINHECKEL, T; NOACK, H; LORENZ S; WISWEDEL, I; AUGUSTIN, W. Comparasion of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria, **Free Radical Research**, 29, p.297-305, 1998.

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

ROSA, S. D. V. F.; VON PINHO, E. V. R.; VIEIRA, E. S. N.; VEIGA, R. D.; VEIGA, A. D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas *lea* associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.70-84, edição especial, 2000.

SANTOS, S.R.G.; PAULA, R.C. Teste de condutividade elétrica ára avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Bail) Smith & Downs – Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 27, nº 2, p.136-145, 2005.

SANTOS, S.R.G.; PAULA, R.C. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de lotes de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilho) – Euphorbiaceae. **Rev. Instituto Florestal**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2007.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: LEOPOLD, A. C. **Membranes, metabolism and dry organisms**. London, 1986. p. 85-101.

SILVA, P.A. **Estudo da qualidade fisiológica, bioquímica e ultraestrutural durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja**. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Lavras, 54 p., 2006.

SMITH, M.T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with loss of viability of stored of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: KIEGEL, J.; GALILI, G. (ed). **Seed development and germination**. New York, Marcel Dekker Inc. p.701-746, 1995.

SPERA, M. R.N.; CUNHA, R.; TEIXEIRA, J.B. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n. 12, p. 1567-1572, 2001.

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

STIEGER, PA; FELLER, U. Degradation of stromal proteins in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts under oxidising conditions. **Journal Plant Physiology** 151, p.556-562, 1997.

SUNG, JM. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. **Physiology Plant**, v. 97, p. 85–89, 1996.

SUNG, J.M.; CHIU, K.Y. Hydration effect on seedling emergence strength of watermelon seeds differing in ploidy. **Plant Science**, 110, p.21-26, 1995.

SUNG, JM; JENG, TL. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, v.91, p.51-55, 1994.

SOLOMON, M; BELENGHI, B; DELLEDONNE, M; MENACHEM, E; LEVINE A. The involvement of cysteine protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, 11, p.431-443, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Califórnia: Cummings, 565 p. 2004.

TORRES, S.B.; SMIDERLE, O. J. Qualidade fisiológica de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) DC) submetidas ao envelhecimento acelerado. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9., 1995, Florianópolis. Florianópolis. Florianópolis:ABRATES, 1995. (**Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 201, 1995).

UFSM. Armazenamento de sementes. **Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, Disponível em: <<http://www.ufsm.br/sementes>>. Acesso em: 31 mar. 2006.

VALENTINI, S. R. T.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Aplicação do teste de vigor em sementes. **IF Série Registros**, São Paulo, n. 14, p. 75-84, 1995.

VARELA, V. P.; FAÇANHA, J. G. V. Secagem de sementes de Cumaru (*Dipteryx odorata* Aubl. Willd.): Influência sobre a germinação e vigor. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 9/10, p. 959-963, 1987.

VELTEN, S.B. & GARCIA, Q.S. Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** v.19, n.4, p. 753-761, 2005.

VIEIRA, R.D.D. & CARVALHO, N.M. **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

WETZEL, M.M.V.S.; CÍCERO, S.M.; FERREIRA, B.C.S. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de seringueira. **Revista Brasileira de Sementes**, v.14, n.1, p.83-88, 1992.

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

WOODSTOCK, L.W. Physiological and biochemical test for seed vigor. **Seed Science and Technology**, v.1, p. 127-57, 1973.

YAMASAKI, K.; HAYASHI, M.; NAGAMINE, K. Título da Patente: **Preparação antioxidante para a pele para uso externo, cosméticos e alimentos**. República

Federativa do Brasil, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Patente número: PI0316537-0, 2004. Fonte: <http://www.patentesonline.com.br/> [acessado em 18/10/2008].

ZELNY, L. Chemical physical and nutritive changes during storage. In: Anderson, J.A.; Alcock, A.W. **Storage of cereal grains and their products**. St Paul, Amer. Assoc. Cereal Chemists, p.46-76, 1954.

ZUCARELI, C. et al. Preparo e coloração de sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii* (Chodat) Burr.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.186-91, 2001.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Este trabalho objetiva avançar e aprofundar o conhecimento acerca do comportamento fisiológico e bioquímico, além do tecnológico, de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. (Leguminosae - Caesalpinoideae) quando submetidas ao envelhecimento natural (armazenamento) e artificial (acelerado), visando contribuir para um melhor manejo e conservação das espécies nos bancos de germoplasma.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Estabelecer metodologia adequada para o teste de tetrazólio em sementes de *Melanoxylon brauna*;
- ✓ Avaliar os efeitos fisiológicos da deterioração das sementes imposta pelo envelhecimento natural e artificial;
- ✓ Avaliar os efeitos bioquímicos da deterioração das sementes imposta pelo envelhecimento natural e artificial;
- ✓ Avaliar os efeitos da deterioração das sementes imposta pelo envelhecimento natural e artificial através da análise de enzimas antioxidantes;

Capítulo I

**Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para
avaliação da viabilidade de sementes de *Melanoxylon
brauna***

**Adjustment methodology of the tetrazolium test for viability
evaluation of *Melanoxylon brauna* seeds**

Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de *Melanoxylon brauna*

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi adequar a metodologia do teste de tetrazólio para sementes de *Melanoxylon brauna*. As sementes foram pré-condicionadas por imersão em água destilada a 25°C, por 14 horas. O tegumento foi retirado e os embriões colocados submersos em solução de tetrazólio (pH 6,5) nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,3%, sendo mantidos no escuro à temperatura de 25°C por 10 e 24 horas. Os embriões foram avaliados quanto à intensidade da coloração, presença de áreas leitosas, aspectos dos tecidos e localização da coloração. Os embriões foram classificados individualmente em 9 classes de viabilidade. As sementes também foram submetidas aos testes de germinação e emergência de plântulas. Os tratamentos que mais se aproximaram do teste padrão de germinação de sementes de *M. brauna* foram as concentrações de 0,05 e 0,1% por 24 e 10 horas, respectivamente. A viabilidade é representada pelas classes 1, 2 e 3, caracterizadas pela coloração rósea do embrião.

Palavras chave - teste tetrazólio, sementes florestais, vigor.

Adjustment methodology of the tetrazolium test for viability evaluation of *Melanoxylon brauna* seeds

ABSTRACT - The objective of this work was to adjust the tetrazolium test methodology to *Melanoxylon brauna* seeds. The seeds were pre-conditioned by immersion in distilled water at 25°C for 24 hours. The tegument of the seed was removed and the embryos were submerged in the tetrazolium solution (pH 6,5) at concentration of 0,05, 0,1 and 0,3%, and were kept in the dark at 25°C temperature for 10 and 24 hours. The embryos were evaluated for the intensity of color, presence of milky areas, aspect of the tissues, and location of the color. The embryos were individually classified into nine viability classes. They were also submitted to the germination and seedling emergence testes. The best correlations between the standard test of seed germination of *Melanoxylon brauna* were those with 0,05 and 0,1% concentration for 24 and 10 hours, respectively. The viability is represented by classes 1, 2 and 3.

Key-words – tetrazolium test, forest seeds, vigor.

1. Introdução

A produção e utilização de sementes de alta qualidade são fatores básicos da maior importância para o sucesso na produção de mudas e implantação de povoamentos florestais com espécies nativas.

Para isso, o sistema de controle de qualidade na indústria de sementes deve ser ágil, versátil e confiável, fornecendo resultados precisos e rápidos, sendo os resultados que avaliem a qualidade fisiológica das sementes por períodos mais curtos são de extrema importância (França Neto et al., 1998).

O teste do tetrazólio tem por objetivo determinar rapidamente a viabilidade das sementes, particularmente daquelas que possuem germinação lenta ou que não germinam após o teste de germinação por estarem dormentes (Brasil, 1992). Esse teste tem assumido posição de destaque para algumas culturas, devido ao grande número de informações fornecidas, e por ser uma técnica rápida e barata (Kryzanowski et al., 1999), entretanto requer treinamento especial sobre as técnicas de interpretação.

O teste do tetrazólio se baseia na alteração da coloração dos tecidos vivos em presença de solução de tetrazólio. Essa alteração na coloração reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas na atividade respiratória. Estas enzimas, particularmente, a desidrogenase do ácido málico, catalizam a reação dos íons H⁺, liberados pelos tecidos vivos, que reduzem o sal (2,3,5 - trifênil cloreto de tetrazólio), formando uma substância de cor vermelha, estável e não difusível, denominada trifênilformazan. A pigmentação vermelha indica viabilidade celular e do tecido (Kryzanowski et al., 1999).

Sabe-se que o tempo de incubação, a concentração da solução e a avaliação adequada do teste são fundamentais para que se obtenham resultados confiáveis da viabilidade e vigor (Oliveira et al., 2005). A metodologia do teste vem sendo aprimorada, principalmente para sementes cultivadas (Kryzanowski et al., 1999). Entretanto, para espécies florestais, estudos e padronizações do método ainda são escassos.

Braúna preta (*Melanoxylon brauna* - Leguminosae-Caesalpinoideae) é uma árvore nativa da floresta atlântica muito conhecida pela qualidade e durabilidade de sua madeira (Lorenzi, 1992), e a exploração descontrolada que fez com que

hoje ela seja raramente encontrada nas matas. Devido à exploração de sua madeira e a falta de replantios a espécie está classificada como vulnerável, conforme a “lista oficial de flora ameaçada de extinção” (IBAMA, 2008).

Sementes de *Melanoxylon brauna* não possuem dormência e iniciam a germinação em torno do quarto dia, entretanto, suas sementes são muito procuradas por insetos, e há alguns anos tem sido difícil encontrar sementes viáveis para germinação e produção de mudas.

Dessa forma, pela importância da espécie e as vantagens apresentadas pelo teste de tetrazólio, este trabalho teve como objetivo adequar a metodologia do teste de tetrazólio para sementes de *M. brauna*.

2. Material e Métodos

Foram utilizadas sementes de *Melanoxylon brauna* colhidas na região de Viçosa - Minas Gerais, obtidas de aproximadamente 15 árvores. Durante o beneficiamento foram eliminadas sementes imaturas, deterioradas ou danificadas. As sementes foram armazenadas no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em embalagens plásticas colocadas dentro de tubos de papelão, em câmara fria a, aproximadamente, 5°C e 60% de umidade relativa durante o período das análises.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) realizando-se análise de variância (ANOVA). As médias dos trabalhos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância e 95% de probabilidade.

2.1. Teste de Tetrazólio

Para a definição da metodologia mais adequada para a condução do teste de tetrazólio foram realizados testes preliminares visando determinar o período de tempo necessário para se obter a coloração requerida para a avaliação das sementes de *Melanoxylon brauna*. Inicialmente, as sementes foram pré-condicionadas por imersão em água destilada a 25°C por 12 horas. Posteriormente, retirado o tegumento das sementes, os embriões foram submersos em solução de tetrazólio (pH 6,5) nas concentrações de 0,05, 0,1 e

0,3%, sendo mantidos no escuro à temperatura de 25°C, por 10 e 24 horas para coloração. Após estes períodos, as sementes foram lavadas em água corrente e deixadas submersas em água até o momento da avaliação. Cada embrião foi cortado longitudinalmente avaliando-se a intensidade da coloração, presença de áreas leitosas, aspectos dos tecidos e localização da coloração em relação aos cotilédones e ao eixo embrionário. Os embriões foram classificados em categorias de viáveis e inviáveis de acordo com os padrões propostos por Grabe (1976), ISTA (1993) e Moore (1972) e estabelecidas 9 classes de viabilidade.

Os resultados do teste de tetrazólio foram comparados com os do teste de germinação e emergência das plântulas.

2.2. Teste de germinação

As sementes foram desinfestadas em solução de captan 0,5% por 60 segundos. Em seguida, colocadas para germinar em caixas tipo “gerbox” forradas com papel de filtro umedecido com água destilada até o ponto de saturação. Foram postas para germinar 100 sementes, distribuídas em cinco repetições de 20 sementes cada. O teste foi conduzido em temperatura constante de 25°C e luz constante com quatro lâmpadas fluorescentes (20W) em BOD e as avaliações feitas a cada 24 horas até o décimo dia, sendo consideradas germinadas as sementes com protrusão da radícula.

2.3. Emergência de plântulas

As sementes foram desinfestadas em solução de captan 0,5% por 60 segundos. Em seguida, colocadas para germinar 200 sementes em 10 sub-amostras de 20 sementes cada em areia. A contagem foi efetuada aos vinte dias após a semeadura determinando a porcentagem de plântulas normais emergidas.

3. Resultados

Sementes beneficiadas de *Melanoxylon brauna* recém colhidas apresentaram 97% de germinação em condições ótimas de temperatura e umidade e 93% de plântulas normais emergidas em sementeira contendo areia.

Os valores dos resultados do teste de tetrazólio são apresentados na Tabela 1 e comparados à porcentagem de germinação e emergência de plântulas.

A concentração de solução que diferiu ($p \leq 0,05$) do teste de germinação deveu-se à não coloração do eixo embrionário e cotilédones ou por aparecimento de coloração intensa, o que indica deterioração dos tecidos.

Verifica-se que as concentrações de tetrazólio 0,05% incubado por 24 horas e 0,1 e 0,3% incubado por 10 e 24 horas não diferiram ($p > 0,05$) dos resultados dos testes de germinação das sementes e emergência de plântulas e a concentração de 0,05%, incubado por 10 horas subestimou a qualidade do lote de sementes (Tabela 1).

Seguindo-se esses preceitos, os embriões foram classificados individualmente em categorias de viáveis e inviáveis com base nas observações de intensidade da coloração, localização e firmeza dos tecidos, sendo estabelecidas nove categorias de viabilidade, descritas na Figura 1, como se segue:

Categoria 1 (viável): eixo embrionário róseo com coloração rósea e cotilédones apenas levemente corados. Tecidos com aspecto normal e firme.

Categoria 2 (viável): cotilédones pouco ou nada corados e eixo embrionário com coloração rósea. Tecidos com aspecto normal e firme.

Categoria 3 (viável): cotilédones e eixo embrionário com coloração rósea. Tecidos com aspecto normal e firme.

Categoria 4 (inviável): 50% dos cotilédones não corados ou com coloração vermelho-intenso, afetando o eixo embrionário.

Categoria 5 (inviável): mais de 50% dos cotilédones com coloração vermelho-intenso afetando a região vascular. Eixo embrionário também apresenta coloração

vermelho intenso afetando o cilindro central. Tecidos com menor turgescência que os anteriores e aspecto deteriorado.

Categoria 6 (inviável): cotilédones não corados ou com coloração vermelho-intenso afetando o eixo embrionário. Tecidos com aspecto flácido e apodrecido afetando a região vascular e cilindro central. Em alguns casos, semente associada a fungo.

Categoria 7 (inviável): cotilédones com coloração vermelho-intenso à marrom e eixo embrionário vermelho-intenso.

Categoria 8 (inviável): cotilédones com coloração vermelho-intenso à marrom e eixo embrionário não corado.

Categoria 9 (inviável): cotilédones e eixo embrionário completamente descoloridos. Tecidos com textura flácida.

Para uma fiel identificação dos critérios adotados para a classificação das sementes inviáveis, foram avaliadas sementes de baixa qualidade e sementes mortas por exposição à água a 100°C e submetidas à solução de tetrazólio. A viabilidade das sementes é representada pelas categorias 1, 2 e 3 e as sementes inviáveis apresentaram aspectos enquadrados nas categorias 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

4. Discussão

Segundo Kryzanowski et al. (1999), a escolha da concentração e do tempo de incubação das sementes no teste de tetrazólio deve se basear na facilidade de diferenciação das sementes viáveis e inviáveis.

Se o sal de tetrazólio é reduzido, formando o composto vermelho, houve atividade respiratória nas mitocôndrias, significando que há viabilidade celular no tecido. Os tecidos não viáveis não reagem e, conseqüentemente, não são coloridos. A formação de um vermelho ou rosa claro indica tecido vigoroso e um vermelho mais intenso é observado nos tecidos em deterioração (França Neto et al., 1998; Kryzanowski et al., 1999).

Com relação aos métodos de preparo das sementes, observou-se que a presença do tegumento, devido sua dureza ou impermeabilidade, dificultou a

penetração da solução de tetrazólio, conferindo às sementes coloração desuniforme ou ausência de coloração, indicando a necessidade da retirada do tegumento para coloração das estruturas viáveis. De forma semelhante, a retirada do tegumento vem sendo indicada para várias outras espécies, tais como *Styphnodendron adstringens* (Silva et al., 1997), *Albizia hasslerii* (Zucareli et al., 1999), *Gleditschia amorphoides* (Fogaça et al., 2006), *Copaifera langsdorffii* (Fogaça et al., 2006), *Bauhinia forficata* (Krohn et al., 2001), *Peltophorum dubium* (Oliveira et al., 2005), *Tabebuia serratifolia* (Oliveira et al., 2001), *Schizolobium parahyba* (Paula et al., 2001).

Verifica-se que a viabilidade de sementes obtida nas concentrações de 0,05% incubado por 24 horas e 0,1 e 0,3%, incubada por 10 e 24 horas não diferiram ($p > 0,05$) do resultado do teste de germinação e emergência. Esse resultado permite recomendar o método do teste de tetrazólio como substituto confiável do teste de germinação para avaliação da viabilidade de sementes de *Melanoxylon brauna*.

Segundo Ferreira et al. (2004), os resultados dos testes de germinação e de tetrazólio devem ser semelhantes, com margem de 5% de diferença entre eles. Essa afirmação confirma-se para a espécie estudada, bem como para outras espécies florestais, cuja metodologia para o teste foi estabelecida e os resultados permitem recomendá-los (Tabela 2).

A obtenção de coloração uniforme e adequada para a interpretação segura e eficiente é fator importante para o sucesso do uso do teste (Bhering et al., 2005). Para a espécie estudada, deve-se levar em consideração a típica coloração verde dos cotilédones, cuja pigmentação irá se somar à pigmentação do reagente tetrazólio (Figura 1).

As sementes classificadas nas categorias 1, 2 e 3 apresentaram coloração rósea uniforme típica de tecidos vivos e vigorosos (Figura 1). De acordo com Moore (1985), tecidos vigorosos tendem a colorir gradual e uniformemente e, quando embebidos, apresentam-se túrgidos. A ocorrência de vermelho intenso é característica de tecidos em deterioração, que permitem uma maior difusão da solução de tetrazólio através de suas membranas celulares comprometidas (França Neto, 1998).

As sementes das categorias 5 e 6 apresentaram coloração vermelho intenso com grande desuniformidade, afetando em ambos casos a região

vascular e o cilindro central, regiões críticas na semente. Na região vascular localizam-se os vasos que conectam o eixo embrionário aos cotilédones, sendo de grande importância para o transporte de substâncias de reserva dos cotilédones à plântula nas fases iniciais da germinação e emergência. Sendo assim, o cilindro central é a região mais crítica do eixo radícula-hipocótilo, pois caso algum dano o atinja, a semente será considerada inviável (França Neto, 1998). Manchas avermelhadas na categoria 6 podem ser causadas por atividades de certos fungos ou bactérias.

Nas sementes enquadradas nas categorias 7, 8 e 9 não foram observadas necroses e nem flacidez excessiva dos tecidos, entretanto, a coloração mais intensa ou a ausência total de coloração indicam sementes inviáveis ou mortas.

Coloração branca, como nas categorias 4, 8 e 9 indica tecidos mortos, que não apresenta atividade enzimática necessária à produção do trifenílformazan (França Neto, 1998).

Dentre os tratamentos cujos resultados de viabilidade das sementes melhor se correlacionaram ao resultado do teste de germinação, sugere-se como mais promissor a imersão em solução de tetrazólio 0,05% por 24 horas, pois nesse tempo de incubação tem-se um resultado equivalente ao teste de germinação associado a menor concentração de solução, ou o tratamento de 0,1% por 10 horas, tendo também um resultado equivalente ao teste de germinação associado a um menor tempo de incubação. Dessa maneira, pode-se aliar características fundamentais atribuídas a um teste de excelência, tais como economia e rapidez. Essas são duas características relevantes no estabelecimento da metodologia mais adequada do teste, pois tanto a economia de reagentes em laboratório quanto a economia de tempo gasto (de aproximadamente 96 horas necessário para o início da germinação para apenas 10 horas no teste de tetrazólio) na obtenção do resultado podem favorecer a pesquisa em questão.

Segundo Marcos Filho (1994), dentre os critérios para avaliar a confiabilidade de um determinado teste para avaliação da qualidade de diferentes lotes, a correlação dos resultados desse teste com os resultados de emergência em campo é um dos parâmetros mais adotados. Por outro lado, deve-se ter em mente que a emergência em campo e os testes diretos de avaliação da qualidade das sementes são afetados por fatores muitas vezes não observados durante a condução de testes indiretos, como o tetrazólio, de modo que os resultados

precisam ser interpretados com a devida cautela e a recomendação do teste acompanhada de devido treinamento. A presença de fungo ou outro microorganismo, por exemplo, cujo aparecimento é comum em sementes, pode causar a baixa germinação e emergência do lote e, no entanto, superestimar sua viabilidade ao teste de tetrazólio.

5. Conclusão

O teste do tetrazólio mostrou-se bastante promissor para sementes de *Melanoxylon brauna*, podendo ser recomendado como alternativa ao teste de germinação.

A metodologia mais indicada como substituta do teste de germinação para sementes de *M. brauna* é a imersão em solução de tetrazólio 0,05% por 24 horas ou a 0,1% por 10 horas.

Estabeleceu-se nove classes de viabilidade para as sementes de *M. brauna* pelo teste do tetrazólio, sendo a viabilidade representada pelas classes 1, 2 e 3.

6. Referências Bibliográficas

BHERING, M.C.; DIAS, D.C.F.S.; BARROS, D.I. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de melancia. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.176-182, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 365 p., 1992.

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

FERREIRA, R.A.; DAVIDE, A.C.; MOTTA, M.S. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. e *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn., num banco de sementes em solo de viveiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n.1, p.24-31, 2004.

FOGAÇA, C.A.; MALAVASI, M.M.; ZUCARELI, C.; MALAVASI, U.C. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. Caesalpinaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n.3, p.101-107, 2006.

GRABE, D. F. **Manual do teste de tetrazólio**. Brasília: AGIPLAN, 85 p. 1976.

IBAMA – Lista oficial de Flora ameaçada de extinção – acesso em 18/10/2008. Site: [<http://www.ibama.gov.br/flora>].

ISTA. International Rules for Seed Testing. **Seed Science and Technology**. Zurich, 363 p. Supplement. 1993.

KRYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: Conceitos e testes**. Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, Comitê de Vigor de Sementes. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

KROHN, N.G.; FOGAÇA, C.A.; SOUZA, M.A.; PAULA, R.C. Preparação e coloração de sementes de *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpinaceae) para avaliação da viabilidade através do teste de tetrazólio. In: Congresso brasileiro de sementes, v.12, Curitiba: **Informativo ABRATES**. Londrina: ABRATES, p.278, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MARCOS FILHO, J. Utilização de testes de vigor em programas de controle de qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 4, n. 2, p. 33-35, 1994.

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

MOORE, R. P. Interpretation of color differences in tetrazolium testing. **Seed Technologist News**, [S.l.], v. 44, n.3, p. 22-24, 1972.

MOORE, R.P. **Handbook on tetrazolium testing**. Zurich: International Seed Testing Association, 99p., 1985.

NASCIMENTO, W.M.O.; CARVALHO, N.M. Determinação da viabilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) através do teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.2, p.470-4, 1998.

OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; VON PINHO E.V.R.; GUIMARÃES R.M.; VIEIRA M.G.G.C. Avaliação de metodologias para o pré-condicionamento e tempo de incubação de sementes de ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia*) submetidas ao teste do tetrazólio. In: Congresso Brasileiro de sementes,12, Foz do Iguaçu: **Informativo ABRATES**, Curitiba, p.257, 2001.

OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A.C. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert – Leguminosae Caesalpinioideae. **Revista Cerne**, v.11, n.2, p.159-166, 2005.

PAULA, R.C.; SOUZA, M.A.; KROHN, N.G.; FOGAÇA, C.A. Padronização do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Schizolobium parahyba* Vell. Blake – Caesalpinaceae. In: Congresso brasileiro de sementes, v.12, Curitiba: **Informativo ABRATES**. Londrina: ABRATES, p.278, 2001.

PINHO, D.S. **Testes de tetrazólio, envelhecimento acelerado e osmocondicionamento aplicados em sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg.** 55 f. Dissertação (Mestrado Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.

SILVA, C.; SANTOS, D.S.B.; SANTOS FILHO, D.B. Avaliação da qualidade física e fisiológica de sementes de barbatimão (*Styphnodendron adstringens* (Mart.) Coville – Fabaceae – Mimosoideae) submetidas ao armazenamento. In: Congresso brasileiro de sementes, v.10, Foz do Iguaçu: **Informativo ABRATES**, Curitiba, p.207, 1997.

ZUCARELI, C. et al. Preparo e coloração de sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii* (Chodat) Burr.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.186-91, 2001.

Tabela 1 – Resultados dos testes de tetrazólio e germinação em sementes e emergência de plântulas de *Melanoxylon brauna*

Table 1 - Results of tetrazolium test and germination test in seeds and seedling growth Melanoxylon brauna.

| Tetrazólio | | |
|---------------------------|---------------|----------------------|
| Concentração (%) | Tempo (horas) | Sementes viáveis (%) |
| 0,05 | 10 | 83,0 B |
| | 24 | 90,0 A |
| 0,1 | 10 | 90,0 A |
| | 24 | 94,0 A |
| 0,3 | 10 | 95,0 A |
| | 24 | 95,0 A |
| Teste de germinação | | 97,0 A |
| Porcentagem de emergência | | 93,0 A |

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).



Figura 1. Classes para a determinação da viabilidade de sementes de *Melanoxylon brauna* pelo teste do tetrazólio.

Figure 1- Viability determination categories of *Melanoxylon brauna* seeds submitted to tetrazolium test.

Capítulo II

**QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *MELANOXYLON*
BRAUNA ENVELHECIDAS NATURAL E ARTIFICIALMENTE**

***PHYSIOLOGICAL QUALITY OF *MELANOXYLON BRAUNA* SEEDS NATURAL AND
ARTIFICIALLY AGED***

QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *MELANOXYLON* *BRAUNA* ENVELHECIDAS NATURAL E ARTIFICIALMENTE

Resumo – Os testes de avaliação de qualidade de sementes tem por objetivo conhecer o grau de deterioração de maneira rápida e segura. Entretanto, as sementes das diferentes espécies não respondem sempre igualmente a cada um deles, o que obriga a procura do teste que melhor avalie as suas condições fisiológicas. O presente artigo teve por objetivo avaliar o comportamento das sementes de *Melanoxylon brauna* - Leguminosae-Caesalpinoideae (brauna) no processo de deterioração em relação a diferentes métodos de envelhecimento (natural e artificial). As sementes foram envelhecidas naturalmente durante 0, 3, 6, 9 e 12 meses em câmara fria e artificialmente durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas em câmara de envelhecimento acelerado, com objetivo de avaliar as possíveis mudanças na qualidade fisiológica. Para isso, foram avaliados o índice de velocidade de germinação, a porcentagem de germinação, o tempo médio de germinação, a emergência de plântulas normais, a condutividade elétrica, além do teste do tetrazólio. O envelhecimento natural e artificial afetaram de forma semelhante a qualidade fisiológica de sementes de brauna, promovendo redução da viabilidade e do vigor.

Palavras chave – vigor, viabilidade, deterioração, armazenamento, sementes florestais.

PHYSIOLOGICAL QUALITY OF *MELANOXYLON BRAUNA* SEEDS NATURAL AND ARTIFICIALLY AGED

ABSTRACT - The objective of the quality evaluation tests is to establishing the decay degree using a fast and safe method. However, the seeds of different species do not always respond equal to each of them, so it si necessary to search for the best tests to evaluate their physiologic conditions. The objective of the present work was to evaluate the behavior of the seeds of *Melanoxyton brauna* – Leguminosae-Caesalpinodeae (*brauna*) in relation to different aging methods (natural and artificial) during decay. The seeds were naturally aged during 0, 3,6, 9 and 12 months in cold chamber and artificially in a fast aging chamber during 0, 24, 48, 72, and 96 hours to evaluate possible changes in the physiologic quality. Therefore, the germination speed index, the germination percentage, the germination average time, the emergence of normal seedlings, the electric conductivity, as well as the tetrazolium test were evaluated. The natural and artificial aging affected in a similar manner the physiologic quality of the seeds causing reduction of the viability and vigour of the seeds.

Key Words – vigor, viability, deterioration, storage, forest seeds.

1. Introdução

O conhecimento básico acerca do processo de deterioração permite melhores bases para a conservação de sementes *ex-situ*, técnica de baixo custo e que proporciona garantia de conservação de sementes viáveis a longo prazo (Roberts, 1973; FAO, 1983; Carneiro, 1985, Carvalho & Nakagawa, 1988), possibilitando sua utilização para a produção de mudas, especialmente nos casos em que a semeadura não ocorre imediatamente após a colheita.

Altas temperatura e umidade durante o armazenamento das sementes contribuem para o aumento da deterioração (McDONALD, 1999). Entretanto, o efeito de ambos na longevidade de diferentes espécies pode variar com as características estruturais e bioquímicas das sementes.

A utilização da técnica de envelhecimento artificial, na qual se utiliza altas temperatura e umidade relativa do ar, promove rápida deterioração das sementes, permitindo a avaliação da qualidade fisiológica de sementes em poucos dias. O teste tem como princípio promover a rápida deterioração de sementes, quando expostas as condições adversas de temperatura e umidade relativa do ar, que são os fatores ambientais mais relacionados à deterioração (Marcos-Filho, 1999). De modo geral, as sementes de baixo vigor apresentam acentuada queda na sua viabilidade, enquanto as sementes de vigor mais elevado mantém a capacidade de produzir plântulas normais e maior percentual de viabilidade.

O comportamento das sementes florestais armazenadas é amplamente variável e as informações sobre fisiologia dessas sementes são ainda escassas e dispersas, sendo raros os estudos disponíveis sobre os padrões de longevidade no armazenamento ou em campo. Além disso, os resultados na literatura referentes ao tipo de envelhecimento usado em testes que visam estudar o vigor e deterioração das sementes são bastante contraditórios. Alguns autores afirmam haver boa correlação entre envelhecimento natural e acelerado, sendo os mecanismos promotores da deterioração os mesmos em ambas as situações, somente variando a velocidade em que ocorrem (Delouche e Baskin, 1973; Marcos-Filho, 1994; Santos e Paula, 2007), ao passo que outros autores afirmam que o envelhecimento artificial não reproduz de forma confiável os eventos metabólicos que acontecem durante o armazenamento, portanto não sendo

recomendado como simulador do processo de envelhecimento natural (Bailly et al., 1996, Fanan et al., 2006).

Vários outros métodos de avaliação da qualidade de sementes vem sendo empregados no estudo da viabilidade de lotes de sementes armazenados, como o teste do tetrazólio e da condutividade elétrica, este um dos mais usados (Loeffler et al. 1988; Marcos Filho et al. 1990; Bruggink et al. 1991; Bonner, 1991; Santos, 1993; Borges et al., 1990; Corvello et al., 1999; Santos e Paula, 2000; Cherobini et al., 2008). Paula (1997) correlacionou o aumento na condutividade elétrica das sementes de *Hevea brasiliensis* com o aumento da deterioração, que foi proporcional ao aumento da temperatura de armazenamento das sementes. Além da condutividade, o índice de velocidade de germinação (IVG), a emergência de plântulas e o estresse hídrico são bons parâmetros fisiológicos empregados no estudo da deterioração de sementes (Marcos Filho, 2005).

Estas informações, além de relevantes para a pesquisa básica, são essenciais para melhor entendimento dos processos ecológicos de estabelecimento de plantas, sucessão e regeneração dentro das comunidades e constituem ferramenta básica na conservação nos bancos de germoplasma, seja para cultivos comerciais, ou para reflorestamento e preservação da espécie.

Braúna preta (*Melanoxylon brauna* - Leguminosae-Caesalpinioideae) é árvore nativa muito conhecida pela qualidade e durabilidade de sua madeira. Sua ocorrência está descrita para a floresta atlântica, desde o sul da Bahia até São Paulo, Minas Gerais (LORENZI, 1992), Goiás, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Maranhão e Piauí (IBAMA, 2008). Entretanto, devido à exploração excessiva e falta de replantios, a espécie está classificada como vulnerável, conforme a “lista oficial de flora ameaçada de extinção” (IBAMA, 2008).

Face à relevância de tais estudos e à escassez de informações com espécies florestais, este trabalho teve como objetivo avaliar as mudanças na qualidade fisiológica de sementes de brauna submetidas ao envelhecimento natural e artificial.

2. Material e Métodos

Foram utilizadas sementes de *Melanoxylon brauna* colhidas na região de Viçosa - Minas Gerais, obtidas de aproximadamente 15 árvores. Durante o beneficiamento foram eliminadas sementes imaturas, deterioradas ou danificadas. Após as primeiras análises, as sementes foram armazenadas no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em embalagens plásticas colocadas dentro de tubos de papelão (25 x 22, 5 cm), em câmara fria a, aproximadamente, 5°C e 60% de umidade relativa durante o período das análises.

Antes de cada experimento as sementes foram tratadas com solução de Captan 0,5% por 60 segundos.

No envelhecimento natural, todas as análises foram realizadas em sementes recém colhidas (sem armazenamento – tempo zero), usadas como controle, e a cada três meses durante 12 meses de armazenamento em câmara fria. Para o envelhecimento artificial foram utilizadas caixas gerbox, contendo 40mL de água destilada, as quais foram colocadas em câmara de envelhecimento artificial nas temperaturas aproximadas de 40, 45 e 50°C e 100% de umidade relativa do ar. Os tempos de envelhecimento foram de 0, 24, 48, 72 e 96 horas, As sementes foram mantidas separadas da água por telas de nylon.

2.1. Germinação

Foi determinada pela contagem das sementes germinadas no período de 10 dias. As sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel de filtro tipo germitest umedecidas com água, em placas de Petri e mantidas em germinador a 25°C e luz constantes, proporcionada por quatro lâmpadas de 20W, tipo Luz do dia. Foram consideradas germinadas as sementes que emitiram radícula. O reumedecimento foi feito sempre que julgado necessário. Os resultados foram expressos em porcentagem média. Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes cada.

Para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), foi utilizada a fórmula de Maguire, citada por Silva e Nakagawa (1995).

Fórmula de Maguire (1962)

$$IVG = \sum \left(\frac{n_i}{t_i} \right)$$

IVG – Índice de velocidade de germinação

n_i – n° de sementes/tempo (dias)

t_i – tempo

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições e os resultados submetidos à análise de variância e regressão, utilizando-se o programa Statistica 8.0. Para a comparação das médias, adotou-se o teste F e o teste Tukey, a 5% de probabilidade. Para os gráficos de germinação e emergência ajustou-se um modelo de regressão não linear (modelo logístico), cujas equações se encontram em anexo e para condutividade e teste do tetrazólio ajustou-se modelos de equação linear. Usou-se para todas as equações o R_2 ajustado.

2.2. Estresse hídrico

A determinação da resistência ao estresse hídrico foi estabelecida usando-se solução de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). Baseado em experimento prévio em que foram testados diferentes potenciais osmóticos (-0,1, -0,2, -0,3, -0,4 e -0,5 MPa) para o estabelecimento do limiar de tolerância da espécie e determinação do melhor potencial a ser usado durante os testes, foi utilizado o potencial de -0,1MPa nos tempos de zero (testemunha), 24, 48 e 72 horas. Foram utilizados cinco repetições de 20 sementes cada.

2.3. Emergência de plântulas

As sementes foram colocadas para germinar em sementeiras contendo areia lavada. Realizou-se a contagem do número de plântulas 20 dias após a semeadura e avaliadas quanto: (1) sanidade - as plântulas que apresentaram sintomas de doenças, lesões de tecido na região do colo, murcha e seca; (2) Número final de plantas - foi avaliada pela porcentagem de plântulas normais até os 20 dias. Foram utilizadas cinco repetições de 20 plântulas cada.

2.4. Condutividade elétrica

Sementes não danificadas foram colocadas em erlenmeyers com 75 mL de água deionizada a 25°C, por 24 horas. A condutividade elétrica do lixiviado foi determinada utilizando-se condutivímetro MICRONAL, modelo B 330, eletrodo com constante 0,7, conforme procedimento descrito por Woodstock (1973). O resultado obtido foi expresso em $\text{mS cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes.

2.5. Teste de Tetrazólio

As sementes foram pré-condicionadas por imersão em água destilada a 25°C por 12 horas. Posteriormente, retirado o tegumento das sementes, os embriões foram submersos em solução de tetrazólio (pH 6,5) 0,05% e mantidas no escuro à temperatura de 25°C por 24 horas, para coloração. Após este período, as sementes foram lavadas em água corrente e deixadas submersas em água até o momento da avaliação. Cada embrião foi cortado longitudinalmente avaliando-se a intensidade da coloração, presença de áreas leitosas, aspectos dos tecidos e localização da coloração em relação aos cotilédones e ao eixo embrionário. Os embriões foram classificados em categorias de viáveis e inviáveis de acordo com os padrões propostos por Grabe (1976), ISTA (1993) e Moore (1972).

3. Resultados e Discussão

O envelhecimento natural no decorrer de 12 meses de armazenamento das sementes de *Melanoxylon brauna* acarretou progressiva redução na capacidade germinativa das sementes e do índice de velocidade de germinação (IVG), além de aumento no tempo médio de germinação (TMG) (Tabela 1).

A porcentagem de germinação e o IVG das sementes de *Melanoxylon brauna* reduziram gradativamente com o envelhecimento artificial (Tabela 2). Ambos os parâmetros não apresentaram reduções significativas a 40°C até 72 horas de envelhecimento o que ocorreu apenas a 96 horas, quando detectaram-se os menores valores de viabilidade e vigor, respectivamente. O fato de as

sementes já estarem pré-embebidas, pela exposição à alta umidade durante o período de envelhecimento artificial, ao serem colocadas para germinar, pode explicar o fato de não haver diminuição na porcentagem de germinação e IVG. Entretanto, a 45°C, houve redução na porcentagem de germinação já nas primeiras 24 horas de envelhecimento, queda esta que aumentou gradativamente com o aumento do tempo de envelhecimento. Quanto ao IVG, percebe-se que a redução nos valores não foi significativa nas primeiras 24 horas, mas passando a haver diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à testemunha a partir de 48 horas. De novo, possivelmente as altas temperaturas e umidades na câmara de envelhecimento resultaram em maior velocidade de germinação de algumas sementes mais vigorosas. Houve também diferença significativa entre os valores de porcentagem de germinação e do IVG a partir de 24 horas de envelhecimento entre as temperaturas de 40 e 45°C (Tabela 2).

As sementes envelhecidas à 40°C por 96 horas tiveram sua capacidade germinativa reduzida significativamente para 55% em relação aos demais tempos, o mesmo ocorrendo a 45°C, pelo mesmo tempo, quando alcançaram 29% de germinação (Tabela 2). O envelhecimento artificial a 40°C por 96 horas simulou, de forma bastante aproximada, o comportamento germinativo das sementes armazenadas por 12 meses em câmara fria a 20°C, ao passo que a temperatura de 45°C teve influência negativa mais drástica sobre a germinação das sementes.

Diferente do observado nas sementes armazenadas, o TMG não mudou significativamente ($p > 0,05$) com o aumento do envelhecimento artificial, provavelmente pelo mesmo motivo que favoreceu a estabilização do IVG, retardando seu decréscimo. A variação no TMG não foi significativa ($p > 0,05$) para ambas as temperaturas de exposição ao envelhecimento artificial (Tabela 2).

O limiar da tolerância à temperatura dessas sementes está estabelecido entre 45 e 50°C, pois a segunda provocou a morte das sementes (dado não mostrado). Semente de *Dalbergia nigra* mostram-se muito mais sensíveis, sendo a temperatura de 40°C por 48 horas suficiente para provocar a morte das sementes (Borges et al., 2000).

O teste padrão de germinação é comumente utilizado como indicador da viabilidade e para prever a emergência em campo quando a semeadura é realizada em condições ideais de solo (Marcos Filho, 2005). Entretanto, tais condições raramente ocorrem e esse parâmetro de avaliação da viabilidade

sobreestima a emergência no campo. Para Delouche (1974), o teste de germinação é um parâmetro pouco sensível do vigor das sementes, porque enfoca a consequência final da deterioração e não considera as perdas que ocorrem antes que a capacidade germinativa diminua.

O padrão de redução na emergência das plântulas durante o armazenamento natural (Figura 1a) é semelhante àquele obtido na germinação das sementes (Tabela 1), entretanto com quedas mais acentuadas no primeiro. Houve redução progressiva de emergência de plântulas de 93%, no tempo zero (sem armazenamento) para 86%, 78%, 55% e 25% aos três, seis, nove e 12 meses de armazenamento, respectivamente (Figura 1a). Entre zero e três meses de armazenamento, apesar do decréscimo na porcentagem de emergência das plântulas, o tempo médio de iniciação na emergência das plântulas ainda não é afetado (Figura 1b), havendo, entretanto, considerável atraso e desuniformidade da emergência de plântulas das sementes armazenadas nos demais tempos (Figura 1b).

O número de plântulas emergidas também foi reduzido progressivamente no envelhecimento artificial a 40°C e 45°C (Figuras 1c e 1e, respectivamente), observando-se perda completa da capacidade de emergência a partir das 96 horas quando expostas ao envelhecimento artificial a 45°C (limite máximo de tolerância). Entretanto, nessa mesma condição, as sementes ainda mantinham capacidade de germinação. Nota-se que o envelhecimento artificial a 45°C por 72 horas teve efeito mais acentuado na emergência das plântulas do que o apresentado por aquelas mantidas por 12 meses em câmara fria, mostrando causar maior deterioração das sementes. Esses resultados confirmam a afirmativa de Delouche (1974) e Rao et al (2006) demonstrando que o teste de germinação está sobre-estimando a viabilidade do lote de sementes, e o sucesso de suas mudas em campo. O mesmo comportamento foi observado para as sementes de *M. brauna* tanto envelhecidas natural quanto para as sementes envelhecidas artificialmente.

Resultados obtidos por Rao et al. (2006) reforçam o conceito de que o envelhecimento das sementes afeta o desenvolvimento das plântulas antes da perda da capacidade de germinar. Confirmando a afirmação de Rao et al (2006), resultados do presente estudo foram semelhantes em ambos os tipos de envelhecimento (natural e artificial), em afetarem o desempenho na emergência

das plântulas pela deterioração antes dos efeitos aparecerem na germinação das sementes. Nota-se que a semente é capaz, inicialmente, de germinar (emitir radícula), no entanto é incapaz de crescer e desenvolver em plântula normal.

Sementes de *Melanoxylon brauna* parecem bastante sensíveis ao envelhecimento artificial quando comparadas às sementes de *Peltophorum dubium*, que mostraram redução significativa do número de plântulas emergidas apenas a partir de 144 horas de envelhecimento a 45°C (Perez, et al 1999) e *Cedrella fissilis* cuja viabilidade é comprometida após 24 horas de exposição a 50°C (Borges et al., 1991). Entretanto, outras espécies mostraram-se mais sensíveis que *Melanoxylon brauna*, tais, como *Pinus elliottii* e *Anadenanthera colubrina*, que expostas a 24 horas a 40°C, tiveram redução drástica na viabilidade das sementes, e formação de mudas comprometida (Kageyama et al., 1980; Garcia et al., 2004, respectivamente).

A uniformidade na emergência das plântulas é perdida à medida que se aumenta o envelhecimento, seja natural ou artificial. Entretanto, as sementes envelhecidas à 40 e 45°C apresentaram menor desuniformidade na emergência do que das plântulas oriundas de sementes armazenadas (Figuras 1b, 1d e 1f).

Foram conduzidos experimentos preliminares com sementes recém colhidas, para avaliar a amplitude de tolerância das sementes de *M. brauna* à restrição hídrica, submetendo-as aos potenciais de -0,1 a -0,5 MPa. As sementes foram capazes de germinar até o potencial de -0,3 MPa e não há germinação a partir de -0,4 MPa. Houve 77% de germinação no potencial de -0,1 Mpa, enquanto nos demais casos a porcentagem foi reduzida a 15 e 10% nos potenciais de -0,2 e -0,3MPa, respectivamente (Figura 2a). Por essa razão, o potencial de -0,1 MPa foi adotado como um dos parâmetros avaliadores do vigor do lote de sementes

O potencial hídrico de -0,1MPa reduziu a germinação de 97%, no controle (sementes recém colhidas germinadas em água), para 77%, 26%, 13%, 10% e 8% de germinação nas sementes aos zero, três, seis, nove e 12 meses de armazenamento, respectivamente (Figura 2c). Observa-se também atraso no início da germinação, em aproximadamente quatro dias no controle (Figura 2b), para sete dias no potencial hídrico de -0,1MPa (Figura 2d).

As sementes expostas ao envelhecimento artificial quando germinadas no potencial de -0,1MPa, tiveram sua germinação reduzida de 77%, obtido nas

sementes não envelhecidas (tempo zero), para 50, 13 e 3% à temperatura de 40°C (Figura 2e), e 46, 2 e 0% à temperatura de 45°C, por 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 2g).

As sementes envelhecidas a 40°C por 24 horas (Figura 2f) tiveram a germinação acelerada. O aumento da temperatura e umidade relativa a que as sementes são submetidas na câmara de envelhecimento conferem maior tolerância ao estresse hídrico em virtude dessas sementes já estarem pré-embecidas quando postas em contato com a solução -0,1MPa. Ao contrário, as sementes envelhecidas naturalmente (armazenadas) foram mais influenciadas pelo estresse hídrico, pois foram colocadas secas em contato com a solução osmótica (Figura 2c).

As sementes foram mais sensíveis ao estresse hídrico quando foram submetidas ao envelhecimento artificial em relação ao envelhecimento natural. Em situação de restrição hídrica, as sementes envelhecidas a 40 e 45°C por 72 e 48 horas tiveram seu limiar máximo de tolerância, respectivamente, não havendo germinação após esse período. As sementes envelhecidas naturalmente foram capazes de germinar até os 12 meses. Percebe-se que as sementes sob envelhecimento artificial a 40°C por 72 horas apresentam comportamento próximo àqueles das envelhecidas naturalmente, podendo também ser utilizado como indicador.

A deterioração das sementes armazenadas, avaliada pela condutividade elétrica, mostrou aumento, variando de cerca de 0,44 ms cm⁻¹ g⁻¹ nas sementes recém colhidas para 1,95, 3,15, 3,83 e 4,63 ms cm⁻¹ g⁻¹ aos três, seis, nove e 12 meses de armazenamento, respectivamente (Figura 3a). Os lixiviados celulares liberados das sementes podem ser correlacionados com a degradação das membranas e redução do vigor. De forma inversa, a porcentagem de sementes viáveis avaliadas pelo teste do tetrazólio, diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) passando de 94% nas sementes recém colhidas para 87%, 83%, 72% e 53% aos três, seis, nove e 12 meses de armazenamento, respectivamente (Figura 3b).

A deterioração provocada pelo envelhecimento artificial também foi de aumento da condutividade elétrica nas temperaturas de 40 e 45°C (Figuras 3c e 3e), o que é confirmado, de forma inversamente proporcional, pela redução na porcentagem de sementes viáveis analisadas pelo teste do tetrazólio (Figuras 3d e 3f). Esses dois testes de análise do vigor foram aplicados nas sementes

envelhecidas até 72 horas em ambas temperaturas, pois as sementes envelhecidas por 96 horas apresentaram elevado grau de apodrecimento.

Considerando-se a perda da capacidade de germinar como o último evento que acontece no processo de deterioração (Delouche, 1974; Marcos Filho, 2005), sugere-se que uma seqüência de eventos ocorra nas sementes após a maturidade fisiológica e antes da perda completa da sua viabilidade. Segundo Delouche e Baskin (1973) e Carvalho (1994), essa seqüência provável de alterações na semente se inicia com a desorganização de membranas e perda do controle de sua permeabilidade. De acordo com Vieira *et al.* (1994), as alterações degenerativas, que ocorrem nas estruturas internas da semente durante o envelhecimento, promovem descontrole no metabolismo e nas trocas de água e de solutos entre as células e o meio exterior, determinando a queda da viabilidade e vigor da semente, e isso é verificado pelo aumento na quantidade de lixiviados durante o processo de embebição (Lin, 1988; Marcos Filho *et al.*, 1990).

Os testes de vigor baseados na integridade dos sistemas de membranas da semente vêm merecendo especial atenção, por identificar o processo de deterioração na sua fase inicial e permitir que medidas corretivas sejam tomadas para reduzir ou minimizar o seu efeito na qualidade fisiológica da semente (Dias e Marcos Filho, 1996).

O aumento da condutividade de lixiviados foi um dos primeiros sintomas da deterioração observados em soja (Ferguson *et al.*, 1990). Sementes deterioradas de cevada, exudaram de 20 a 30% do total de açúcares (Abdul-Baki & Anderson, 1972), e sementes de *Trifolium incarnatum* exudaram 60 a 70% do total de aminoácidos (40% a mais que as sementes viáveis) (Ching & Schoolcraft, 1968). É ampla a literatura disponível acerca do uso da condutividade elétrica no estudo da deterioração de sementes cultivadas (Ching & Schoolcraft, 1968; Abdul-Baki & Anderson, 1972; Ferguson *et al.*, 1973; Woodstock *et al.* 1985; Loeffler *et al.* 1988; Marcos Filho *et al.* 1990; Bruggink *et al.* 1991; Santos, 1993), e, mais recentemente, estudos vem sendo realizados visando verificar sua aplicabilidade em sementes florestais (Santos e Paula, 2005), podendo-se citar algumas espécies de *Pinus* (Bonner, 1991), *Inga uruguensis* (Barbedo e Cícero, 1998), *Cedrela fissillis* (Borges *et al.*, 1990; Corvello *et al.*, 1999; Cherobini *et al.*, 2008), *Piptadenia cummunis* (Borges *et al.*, 1992), *Dalbergia nigra* (Marques *et al.*, 2002a; Marques *et al.*, 2002b), *Guazuma ulmifolia* (Gonçalves, 2003), *Copaifera*

langsdorffii (Ferreira et al., 2004), *Tabebuia Chrysotricha* (Fonseca et al., 2005), *Sebastiania commersoniana* (Santos e Paula, 2005) e *Caesalpinia peltophoroides* (Pontes et al., 2006), tendo sido um dos primeiros sintomas da deterioração observados nessas sementes.

Sementes de *M. brauna* tiveram o teor de água variando de 12% a 14% durante o período de armazenamento. Valores estes considerados altos quando comparados ao teor de água observado para outras espécies florestais armazenadas, o que pode ter contribuído para aceleração da atividade celular e conseqüente deterioração.

Tais resultados poderiam ser esperados, pois diversos autores relatam como aspecto bioquímico determinante na deterioração a perda da integridade da membrana (Heydecker, 1972; Ferreira & Borguetti, 2004; Marcos Filho, 2005; Faria, 2006) por meio da ação de radicais livres, (Koostra e Harrington, 1973) com conseqüente aumento na condutividade dos lixiviados celulares (Woodstock, 1973; Coolbear, 1995). A lixiviação metabólica está associada ao vigor, uma vez que a perda da integridade das membranas acarreta em perda de elementos essenciais e de constituintes celulares, favorecendo o aparecimento de microorganismos (Woodstock, 1973).

4. Conclusão

Comportamento germinativo é bastante semelhante entre as sementes submetidas ao envelhecimento natural por 12 meses e as submetidas ao envelhecimento artificial a 40°C por 96 horas, podendo-se, nesse caso, sugerir o envelhecimento artificial como substituto confiável para estimar o potencial de armazenamento.

Entretanto, quando analisadas emergência de plântulas e estresse hídrico, as observações permitem concluir, de modo geral, que o envelhecimento artificial, em qualquer temperatura, impõe uma deterioração mais drástica do que a natural até os 12 meses de armazenamento.

5. Referências Bibliográficas

ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seed. In: KOSLOWSKI, T.T. **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972, v.1, 416p.

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

BARBEDO, C.J.; CÍCERO, S.M. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.2, p.249-259, 1998.

BONNER, F.T. Leachate conductivity: a rapid nondestructive test for pine seed quality. **Tree Planter's Notes**, v.42, n.2, p.41-44, 1991.

BORGES, E. E. L.; CASTRO, J. L. D; BORGES, R. C. G. Avaliação fisiológica de sementes de cedro submetidas ao envelhecimento precoce. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 12, n. 1, p. 56-62, 1990.

BORGES, E.E.L.; CASTRO, J.L.D.; BORGES, R.C.G. Avaliação fisiológica de sementes de cedro submetidas ao envelhecimento precoce. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA DE SEMENTES FLORESTAIS, 2., 1989, São Paulo. **Anais...** Instituto Florestal de São Paulo, 1991. p. 28.

BORGES, E.E.L.; CASTRO, J.L.D.; BORGES, R.C.G. Alterações fisiológicas em sementes de jacaré (*Piptadenia communis*) submetidas ao envelhecimento precoce. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 9-12, 1992.

BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G.; BUCKERIDGE, M.S. Alterações nas composições de carboidratos e de ácidos graxos em sementes de jacarandá-da-

bahia osmocondicionadas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12 (1), p. 10-16, 2000.

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**, v.1, n.1, p.15-20, 1991.

CARNEIRO, J.G.A. **Armazenamento de sementes florestais**. Curitiba: FUPEF série técnica, n.14,1985. 35p.

CARVALHO, N. M. O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Eds.). **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994a. 164p. p.1-30.

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

CHEROBINI, E.A.I.; MUNIZ, M.F.B.; BLUME, E. Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 65-73, jan.-mar., 2008.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A.S. (ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York, The Haworth Press Inc. p.223-277, 1995.

CORVELLO, W.B.V.; VILLELA, F.A.; NEDEL, J.L.; PESKE, S.T. Maturação fisiológica de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 21, nº 2, p.23-27, 1999.

CHING, T.M.; SCHOOLCRAFT, I. Physiological and Biochemical differences in aged seeds. **Crop Science**, n.8, p. 407-409, 1968.

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.

DELOUCHE, J.C. Maintaining soybean seed quality. Proc. TVA SYMP. ON Soybean Prod., Marketing and Use. TVA Bull. Y69, Muscle Shoals, Ala.: 40-63 USA. 1974.

DIAS, D.C.F.S.; MARCOS FILHO, J. Teste de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.53, n.1, p.31-42, 1996.

FANAN, S. ; P.F. Medina ; T. C Lima ; J.M.Filho . Avaliação do vigor de sementes de trigo pelos testes de envelhecimento acelerado e de frio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, p. 152/2-158, 2006.

FAO, Roma, Itália. **Simple technologies for charcoal making**. Rome, 1983. 154p. (FAO Forestry Paper, 41).

FARIA, J. M. R. **Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds**. 2006. 135 p. Tese (Doutorado) – Wageningen Universiteit, Wageningen.

FERGUSON, J.M.; TEKRONY, D.M.; EGLY, D.B. Changes during early soybean seed axes deterioration. I. Seed quality and mitochondrial respiration. **Crop Science**, Madison, v.30, n.1, p.175-179, 1990.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. São Paulo: Artmed, 2004. 323 p.

FERREIRA, R. A.; OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO; OLIVEIRA, A. F.; GEMAQUE, R. C. R. Qualidade fisiológica de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae Caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente. **Revista Ciência Agronômica**, Vol. 35, nº1, pág. 82 – 86, 2004.

FONSECA, R.L.; MENEGARIO, C.; MORI, E.S.; NAKAGAWA, J. Maturidade fisiológica das sementes do ipê amarelo, *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex DC.) Standl. **Scientia Forestalis** n. 69, p.136-141, dez. 2005.

GARCIA, L. C. A.; NOGUEIRA, C.; ABREU, D.C.A. Influencia do envelhecimento acelerado no vigor de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan – Mimosaceae. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 85-90, 2004.

GONÇALVES, E. P. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.) por meio de diferentes testes de vigor.** 2003. 64 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

HEYDECKER, W. Vigour. In: ROBERTS, E.H. **Viability of Seeds**, Syracuse University Press, p.209-52, 1972.

GRABE, D. F. **Manual do teste de tetrazólio.** Brasília: AGIPLAN, 1976. 85 p.

IBAMA – Lista oficial de Flora ameaçada de extinção – acesso em 18/10/2008. Site: [<http://www.ibama.gov.br/flora>].

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Handboor of vigour test methods.** 3. Ed. ISTA, 1995. P. 97-103.

ISTA. International Rules for Seed Testing. **Seed Science and Technology.** Zurich, 1993. 363 p. Supplement.

KAGEYAMA, P.Y.; BALISTIERO, M.; MÁRQUEZ, F.C.M. Utilização do teste de envelhecimento para avaliar o vigor de lotes de sementes com diferentes idades e estágios de maturação. **Boletim Informativo PPT**, Piracicaba , ESALQ/USP, v. 1, n. 8, p. 15-38, 1980.

KOOSTRA, P.; HARRINGTON, J.; Biochemical effects of age on membranal lipids of *Cucumis sativus* L. seed. **Proceedings International Seed Testing Association**, v.34, p.329-340, 1973.

LIN, S. S. efeito do período de armazenamento na lixiviação eletrolítica dos solutos celulares e qualidade fisiológica de sementes de milho (*Zea mais* L) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, v. 10, n.1, p.59-67, 1988.

LOEFFLER, T.M.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. The bulk conductivity test as an indicator of soybean seed quality. **Journal of Seed Technology**, Springfield, v.12, n.1, p.37-53, 1988.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R. da; NOVEMBRE, A. D. C.; CHAMMA, H. M. C. P. Estudo comparativo de métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, com ênfase ao teste de condutividade elétrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 12, p. 1805-1815, dez. 1990.

MARCOS-FILHO, J. Envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D. & CARVALHO, N.M. (eds.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal, FUNEP, p.133-150, 1994.

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

MARQUES, M.A.; PAULA, R.C.; RODRIGUES, T.J.D. Adequação do teste de condutividade elétrica para determinar a qualidade fisiológica de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex. Benth). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.24, n.1, p.271-278, 2002a.

MARQUES, M.A.; PAULA, R.C.; RODRIGUES, T.J.D. Efeito do número de sementes e do volume de água na condutividade elétrica de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex. Benth. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.24, n.1, p.254-262, 2002b.

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1999.

MOORE, R. P. Interpretation of color differences in tetrazolium testing. **Seed Technologist News**, [S.l.], v. 44, n.3, p. 22-24, 1972.

PAULA, N.F. de **Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento**. Viçosa: UFV, 1997, 52p. (Dissertação de Mestrado).

PEREZ, S.C.J.G.; FANTI; S.C.; CASALI, C.A. Influencia do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. **Bragantia**. Campinas, v.58, n.1, p.57-68, 1999.

RAO, R.G.S.; SINGH, P.M.; RAI, M. Storability of onion seeds and effects of packaging and storage conditions on viability and vigour. **Scientia Horticulturae**. 110, p.1–6; 2006.

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

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.)**. Viçosa, 1993. 184p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

SANTOS, S.R.G.; PAULA, R.C. Teste de condutividade elétrica ára avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Bail) Smith & Downs – Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 27, nº 2, p.136-145, 2005.

SANTOS, S.R.G.; PAULA, R.C. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de lotes de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilho) – Euphorbiaceae. **Rev. Instituto Florestal**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2007.

SILVA, J.B.; NAKAGAWA, J. Estudo de fórmulas para cálculos da velocidade de germinação. **Informativo ABRATES**, v.5, n. 1, p. 62-73, 1995.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M.; SADER, R. Testes de vigor e suas possibilidades de uso. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.31-47.

WOODSTOCK, L.W. Physiological and biochemical test for seed vigor. **Seed Science and Technology**, v.1, p. 127-57, 1973.

WOODSTOCK, L.W.; FURMAN, K.; LEFFLER, H.R. Relationship between weathering deterioration and germination, respiratory metabolism, and mineral leaching from cottonseeds. **Crop Science**, v.25, n.3, p.459-466, 1985.

Tabela 1 – Porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) de sementes de *Melanoxylon brauna* para o envelhecimento natural (0, 3, 6, 9 e 12 meses).

Table 1 - Percentage of germination, index of germination speed (IVG) and average time of germination (TMG) of Melanoxylon brauna seeds to natural aging (0, 3, 6, 9 e 12 meses).

| Armazenamento (meses) | Germinação Acumulada (%) | IVG | TMG (dias) |
|--------------------------|-----------------------------|--------|------------|
| 0 | 97,0 A | 4,65 A | 4,33 B |
| 3 | 85,0 AB | 3,74 B | 4,75 B |
| 6 | 80,0 B | 3,00 B | 5,66 B |
| 9 | 75,0 B | 2,86 B | 5,53 B |
| 12 | 57,0 C | 1,57 C | 7,38 A |

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 2 – Porcentagem de germinação, Índice de velocidade de Germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento artificial à 40°C e 45°C por 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

Table 2 – - Percentage of germination, index of germination speed (IVG) and average time of germination (TMG) of Melanoxylon brauna seeds during accelerated aging to 40°C and 45°C for 0, 24, 48, 72 e 96 hours.

| Tempo (horas)/ temperatura | Germinação (%) | | IVG | | TMG (dias) | |
|----------------------------------|----------------|-------|---------|----------|------------|---------|
| | 40°C | 45°C | 40°C | 45°C | 40°C | 45°C |
| 0 | 97 aA | 97 aA | 4,86 aA | 4,86 aA | 4,27 aA | 4,27 aA |
| 24 | 95 aA | 71 bB | 5,44 aA | 3,27 bAB | 3,86 aA | 4,82 aA |
| 48 | 88 aA | 68 bB | 5,05 aA | 2,93 bB | 3,88 aA | 4,98 aA |
| 72 | 82 aA | 65 bB | 4,35 aA | 2,55 bB | 4,30 aA | 5,53 aA |
| 96 | 55 aB | 29 bC | 2,43 aB | 1,14 bC | 5,54 aA | 5,45 aA |

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, e minúscula na linha, não diferem entre si, pelos Testes F e Tukey ($p > 0,05$).

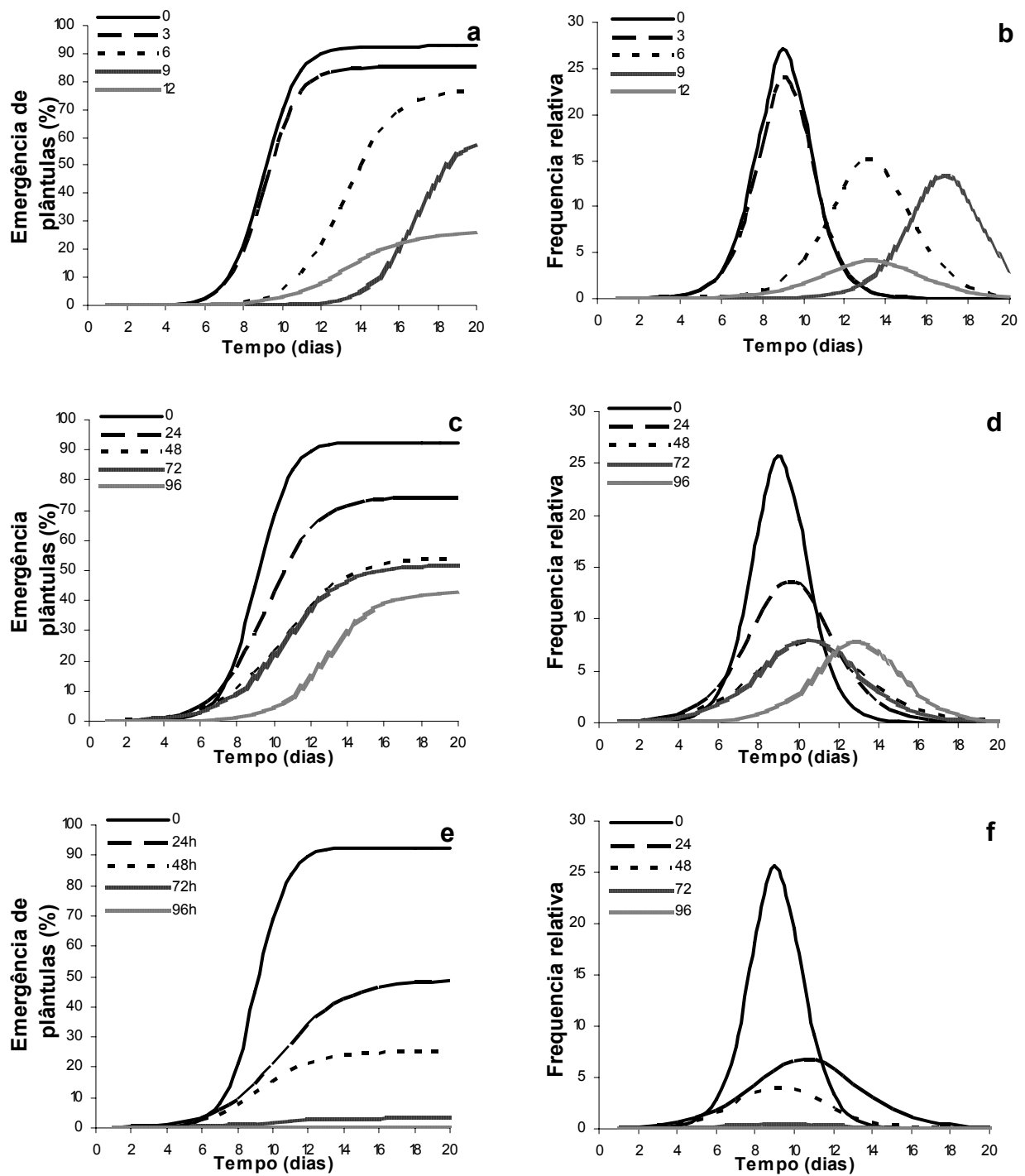
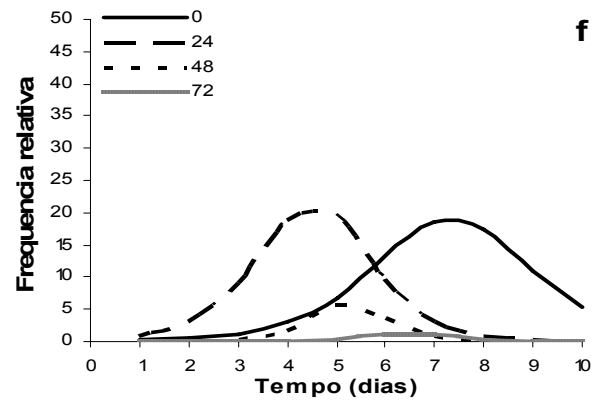
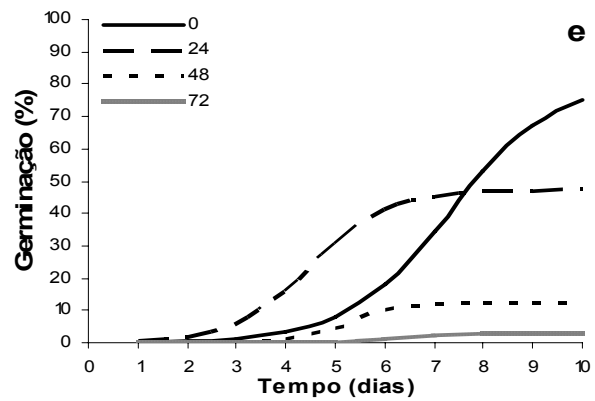
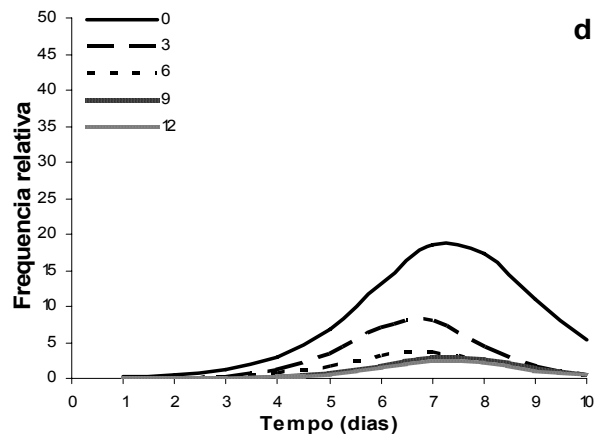
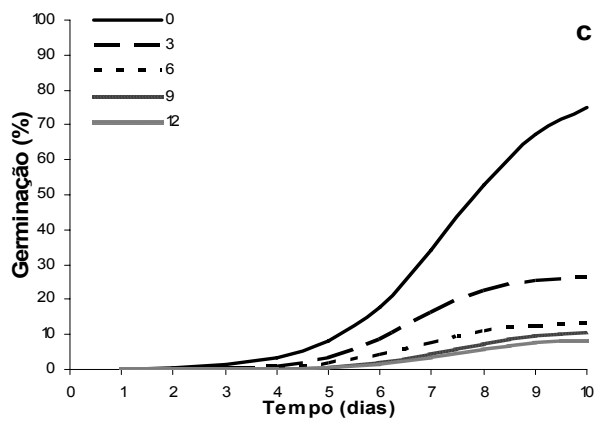
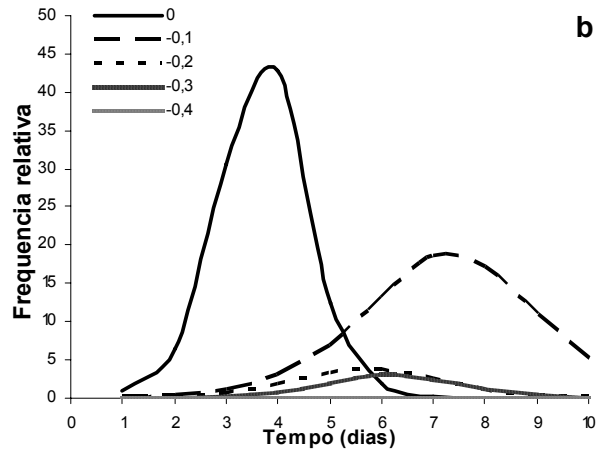
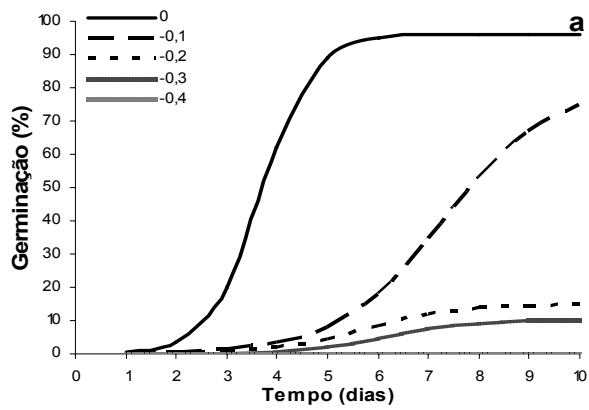


FIGURA 1 – Porcentagem e freqüências relativas de emergência de plântulas normais de *Melanoxylon brauna* em função do envelhecimento natural (a – b) e artificial a 40°C (c - d) e 45°C (e - f).

Figure 1 – Percentage and relative frequency of emergence of normal seedling of seeds of *Melanoxylon brauna* during the natural ageing (a – b) and accelerated ageing 40°C (c - d) and 45°C (e - f).



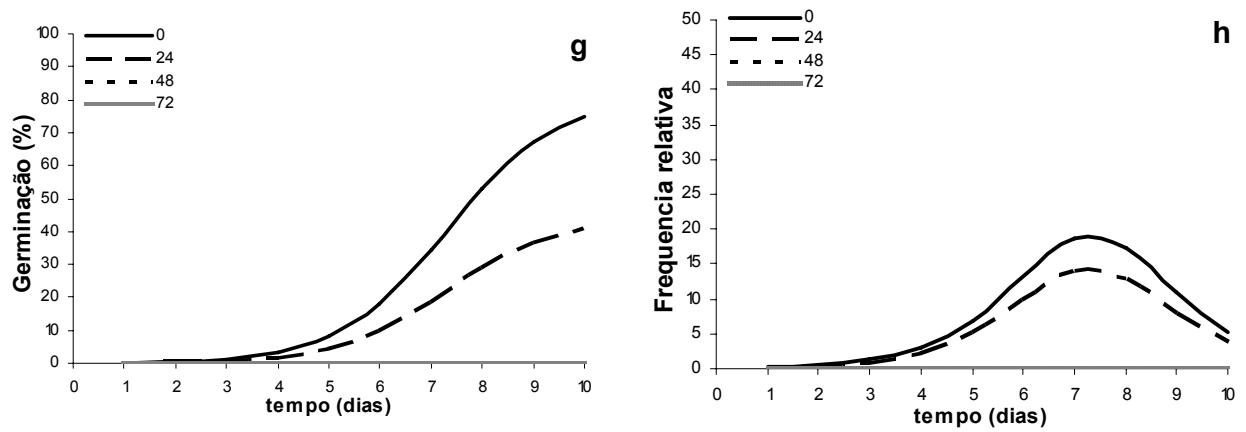


FIGURA 2 – Porcentagem e freqüências relativas de germinação das sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas a diferentes potenciais hídricos (a - b); ao potencial hídrico de -0,1MPa em função do envelhecimento natural (c - d) e artificial a 40°C (e - f) e 45°C (g - h).

Figure 2 – Percentage and relative frequency of germination of seeds of seeds of *Melanoxylon brauna* submitted the different water potentials (a – b); -0,1MPa water potentials in function of natural (c - d) and artificial ageing at 40°C (e – f) and 45°C (g - h).

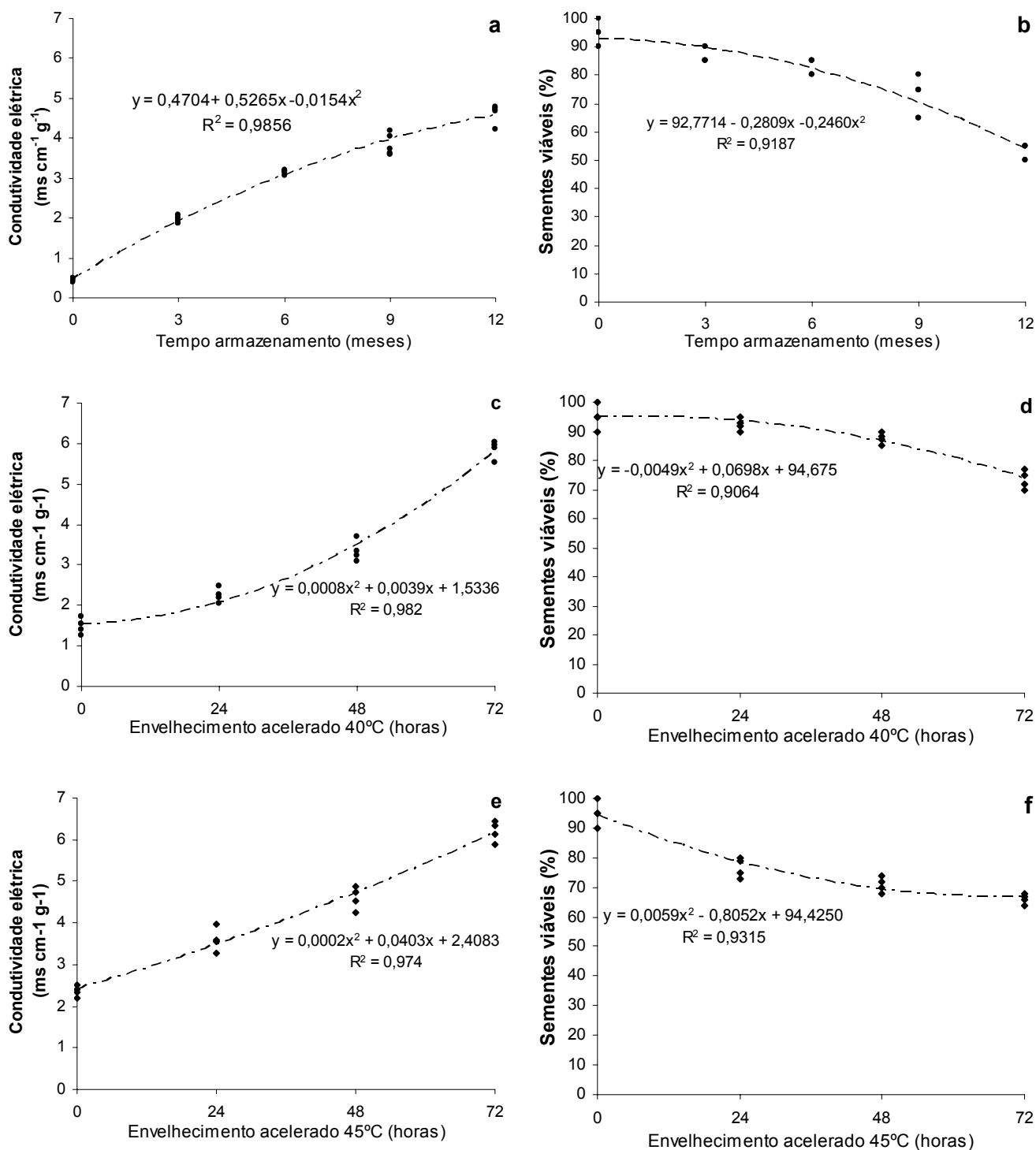


FIGURA 3 – Condutividade elétrica e porcentagem de sementes viáveis pelo teste do tetrazólio a 0,1% por 10 horas de sementes de *Melanoxyton brauna*, em função do envelhecimento natural (a - b) e artificial a 40°C (c - d) e 45°C (e - f).

Figure 3 – Electrical conductivity and percentage of viable seeds by tetrazolium test at 0,1% for 10 hours of seeds of *Melanoxyton brauna* under natural (a - b) and artificial ageing at 40°C (c - d) and 45°C (e - f).

ANEXO I

Equações de regressão não linear (modelo logístico) - Figura 1.

| | Tratamento | Equação |
|--------------------------------|-------------------|--|
| Emergência de plântulas | Tempo zero (T0) | $Y = 92,61 \left(1 + 39120,21 e^{-1,17x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9990; S = 2,0314$ |
| | 3 meses | $Y = 85,08 \left(1 + 32242,04 e^{-1,14x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9989; S = 1,9585$ |
| | 6 meses | $Y = 76,9 \left(1 + 34455,74 e^{-0,79x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9990; S = 1,5104$ |
| | 9 meses | $Y = 61,41 \left(1 + 2361667,6 e^{-0,87x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9952; S = 2,0127$ |
| | 12 meses | $Y = 26,15 \left(1 + 4513,26 e^{-0,63x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9969; S = 0,8637$ |
| | 24 horas 40°C | $Y = 74,28 \left(1 + 1198,42 e^{-0,74x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9973; S = 2,5769$ |
| | 48 horas 40°C | $Y = 54,54 \left(1 + 406,59 e^{-0,57x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9972; S = 1,8126$ |
| | 72 horas 40°C | $Y = 51,77 \left(1 + 680,35 e^{-0,62x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9978; S = 1,5618$ |
| | 96 horas 40°C | $Y = 42,91 \left(1 + 12720,62 e^{-0,73x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9986; S = 1,0274$ |
| | 24 horas 45°C | $Y = 48,75 \left(1 + 370,33 e^{-1,14x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9977; S = 1,4787$ |
| | 48 horas 45°C | $Y = 25,10 \left(1 + 453,49 e^{-0,66x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9938; S = 1,2943$ |
| | 72 horas 45°C | $Y = 3,06 \left(1 + 281,12 e^{-0,59x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9861; S = 0,2299$ |
| | 96 horas 45°C | --- |

ANEXO II

Equações de regressão não linear (modelo logístico) - Figura 2.

| | Tratamento | Equação |
|--------------------------------|-------------------|---|
| Germinação T0 | Ψ 0 MPa | $Y = 96,10 \left(1 + 1332,60 e^{-1,95x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9992; S = 1,8959$ |
| | Ψ -0,1 MPa | $Y = 81,21 \left(1 + 987,69 e^{-0,94x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9974; S = 2,4106$ |
| | Ψ -0,2 MPa | $Y = 15,22 \left(1 + 405,71 e^{-1,04x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9973; S = 0,5349$ |
| | Ψ -0,3 MPa | $Y = 10,07 \left(1 + 2001,09 e^{-1,23x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9973; S = 0,3669$ |
| | Ψ -0,4 MPa | --- |
| Germinação (Ψ -0,1 MPa) | Tempo zero (T0) | $Y = 81,21 \left(1 + 987,69 e^{-0,94x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9974; S = 2,4106$ |
| | 3 meses | $Y = 26,99 \left(1 + 3740,79 e^{-1,24x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9968; S = 1,0442$ |
| | 6 meses | $Y = 13,74 \left(1 + 1267,86 e^{-1,06x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9964; S = 0,5364$ |
| | 9 meses | $Y = 10,92 \left(1 + 4592,98 e^{-1,14x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9974; S = 0,3413$ |
| | 12 meses | $Y = 8,46 \left(1 + 10219,41 e^{-1,25x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9914; S = 0,5017$ |
| | 24 horas 40°C | $Y = 47,23 \left(1 + 341,6 e^{-1,29x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9947; S = 2,4309$ |
| | 48 horas 40°C | $Y = 12,39 \left(1 + 34012,54 e^{-1,98x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9954; S = 0,6463$ |
| | 72 horas 40°C | $Y = 3,06 \left(1 + 122516,98 e^{-1,79x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9971; S = 0,1199$ |
| | 96 horas 40°C | --- |
| | 24 horas 45°C | $Y = 44,12 \left(1 + 347,59 e^{-1,29x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9940; S = 2,4068$ |
| | 48 horas 45°C | $Y = 0,05 \left(1 + 1,38 e^{-2,39x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9851; S = 0,1791$ |
| | 72 horas 45°C | --- |
| | 96 horas 45°C | --- |

Capítulo III

**ESTUDO ENZIMÁTICO DA DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE
Melanoxylon brauna ENVELHECIDAS NATURAL E
ARTIFICIALMENTE**

***ENZIMATIC STUDY OF DETERIORATION OF MELANOXYLON BRAUNA SEEDS
NATURAL AND ARTIFICIALLY AGED***

ESTUDO ENZIMÁTICO DA DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE *Melanoxylon brauna* ENVELHECIDAS NATURAL E ARTIFICIALMENTE

Resumo – A deterioração de sementes é fato irreversível, podendo, no máximo, ser retardada com aplicação de técnicas que reduzam a velocidade das reações metabólicas envolvidas. Não há conhecimento específico para sementes florestais quanto aos processos metabólicos envolvidos durante o armazenamento, o que dificulta o estabelecimento de técnicas para a sua conservação adequada. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar a participação de enzimas do estresse oxidativo e metabolismo de lipídios reconhecidamente como processos envolvidos na deterioração de sementes durante o armazenamento. Sementes de brauna (*Melanoxylon brauna* - Leguminosae-Caesalpinoideae) foram envelhecidas naturalmente durante o armazenamento por 0, 3, 6, 9 e 12 meses em câmara fria e artificialmente (envelhecimento acelerado) durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas, com objetivo de avaliar alterações na atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase. Para isso, foram realizados testes de germinação, atividade enzimática e teor de lipídios no eixo embrionário e cotilédones. Os envelhecimentos natural e artificial afetaram de forma semelhante o comportamento bioquímico de sementes de brauna, promovendo redução da viabilidade e do vigor. O envelhecimento artificial das sementes por 72 horas a 45°C parece simular bem o comportamento enzimático manifestado pelas sementes armazenadas por 12 meses em câmara fria. Houve redução gradativa das reservas de lipídios em ambos os sistemas de envelhecimento.

Palavras chave – deterioração de sementes, envelhecimento acelerado, armazenamento, sementes florestais. enzimas.

ENZIMATIC STUDY OF DETERIOATION OF *MELANOXYLON BRAUNA* SEEDS NATURAL AND ARTIFICIALLY AGED

ABSTRACT - The decay of seeds is a irreversible fact, and can only be delay with the application of techniques that reduce the speed of the metabolic reactions involved. There is no specific knowledge regarding forest tree seeds as to the metabolic processes involved during storage, which difficulties the establishment for techniques for their suitable conservation. Thus, the objective of the present work was to study the relation of the oxidative stress enzymes and of the fat metabolism on the decay of seeds, during storage. Seeds of *Melanoxyton brauna* – Leguminosae-Caesalpinodeae (brauna) were naturally aged during storage for 0, 3, 6, 9 and, 12 months in cold chamber, and artificially (fast aging) during 0, 24, 48, 72, and 96 hours, to evaluate the changes in the activity of the enzymes dismutase superoxide, catalase and peroxidase. Thus, germination, enzymatic activity and fat content test were done in the embryonary axis and cotyledons. The natural and artificial aging affected in a similar manner the biochemical behavior of the seeds, causing redction of the viability and vigour. The artificial aging of the seeds for 72 hours at 45°C simulates well the enzymatic behavior as shown in the seeds stored for 12 months n cold chamber. There was a steady reduction on the fat reserves in both aging systems, but there was no correlation between these reserves and viability or vigour.

Key Words - seed deterioration, accelerated aging, storage, forest seeds, enzymes.

1. Introdução

A senescência em plantas é um processo natural caracterizado principalmente pelo grande aumento da peroxidação de lipídios e permeabilidade das membranas devido ao notável aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Del Rio, et al., 1998).

Altas temperatura e umidade durante o armazenamento das sementes contribuem para a sua deterioração (McDonald, 1999), por promoverem alterações degenerativas no metabolismo das sementes, dentre outras a desestabilização nas atividades de enzimas e a desestruturação e perda de integridade do sistema de membranas celulares, causada, principalmente, pela peroxidação de lipídios (Vieira et al, 1994). Entretanto, o efeito desses fatores na longevidade de diferentes espécies pode variar com as características estruturais e bioquímicas das sementes.

O envelhecimento das sementes leva à deterioração progressiva de suas estruturas celulares, culminando na morte. Entretanto, sabe-se que as células são dotadas de mecanismos protetores de defesa contra EROs, prevenindo tanto sua formação como também a remoção das formas reativas formadas (Alscher et al., 2002). Entre os diversos mecanismos existentes, é bem conhecido o papel dos sistemas antioxidantes enzimáticos na prevenção do dano durante o desenvolvimento e a germinação de sementes (Arrigoni et al., 1992; Chaitanya et al., 2000; Tommasi et al., 2001; Bailly, 2004), além de outras situações de estresse em tecidos vegetais (Smirnoff, 1998; Mittler, 2002) pela remoção das espécies reativas de oxigênio geradas nessas condições.

Merritt et al. (2003) mostram ser vários os mecanismos antioxidantes em sementes armazenadas. Dentre eles tem-se as enzimas catalase (CAT), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD), cujas atividades caíram progressivamente durante o armazenamento em câmara fria de sementes de algodão (Goel and Sheoran, 2003) e soja (Sung e Chiu, 1995). Chang e Sung (1998) observaram redução na atividade de CAT e POX em sementes de milho durante envelhecimento. CAT e SOD atuam em eixo e cotilédones de amendoim, mas POX só teve atividade no eixo. Com o envelhecimento artificial nessas sementes houve redução da atividade da SOD e POX. Entretanto a atividade da

CAT não variou (Sung e Jeng, 1994). Em sementes armazenadas de soja (Stewart e Bewley, 1980) e amendoim (Sung e Jeng, 1994) a atividade da SOD não foi detectada, enquanto CAT e POX tiveram atividades detectadas em eixo e cotilédones.

Vários trabalhos têm sido realizados na tentativa de explicar a relação entre o envelhecimento de sementes durante o armazenamento com a peroxidação de lipídios (Wilson Jr. & McDonald Jr. 1986; Kapana & Madhava Rao, 1996, Camargo et al., 2000), com respostas variáveis, de acordo com a espécie.

Além de escassas, as informações a respeito do comportamento das sementes florestais no processo de envelhecimento, são ainda bastante contraditórias no que refere à metodologia de envelhecimento usada em testes que visam estudar o vigor e a deterioração das sementes. Alguns autores afirmam haver correlação entre envelhecimento natural e artificial, sendo os mecanismos promotores da deterioração os mesmos em ambas as situações, somente variando a velocidade em que ocorrem (Delouche & Baskin, 1973; Marcos-Filho, 1994; Santos e Paula, 2007), ao passo que outros autores afirmam que o envelhecimento artificial não reproduz de forma confiável os eventos metabólicos que acontecem durante o armazenamento, portanto não sendo recomendado como simulador do processo de envelhecimento natural (Bailly et al., 1996, Fanan et al., 2006). Segundo Bailly et al. (1996), um agravante do envelhecimento artificial em relação ao natural é que este pode atuar desnaturando as enzimas ou afetar sua síntese.

Braúna preta (*Melanoxylon brauna* - Leguminosae-Caesalpinoideae) é árvore nativa conhecida pela qualidade e durabilidade de sua madeira. Sua ocorrência está descrita para a floresta atlântica, desde o sul da Bahia até São Paulo, Minas Gerais (Lorenzi, 1992), Goiás, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Maranhão e Piauí (IBAMA, 1992). Entretanto, devido à exploração excessiva e falta de replantios, a espécie está classificada como vulnerável, conforme a “lista oficial de flora ameaçada de extinção” (IBAMA, 1992).

Por isso, diante da escassez de estudos acerca do processo de deterioração e perda do vigor dessa espécie, este trabalho objetivou estudar a atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em sementes de *Melanoxylon brauna* durante o envelhecimento natural e artificial.

2. Material e métodos

Foram utilizadas sementes de *Melanoxylon brauna* colhidas na região de Viçosa, Minas Gerais. Os trabalhos foram conduzidos junto ao Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Durante o beneficiamento foram eliminadas as sementes imaturas, deterioradas ou danificadas. As sementes, contendo aproximadamente 10% de umidade relativa, foram armazenadas em embalagens plásticas dentro de tubos de papelão (25 x 22,5 cm), a 20°C e 60% de umidade relativa.

As análises bioquímicas e enzimáticas foram realizadas separadamente no eixo embrionário e nos cotilédones. Para o armazenamento, as análises foram realizadas em sementes recém colhidas (sem armazenamento) usadas como controle, e a cada três meses durante 12 meses. Para o envelhecimento artificial, as sementes foram colocadas em caixas gerbox, contendo 40mL de água destilada, as quais foram colocadas em câmara de envelhecimento acelerado a 40, 45°C e aproximadamente 100% de umidade relativa do ar. Os tempos de envelhecimento foram de 0, 24, 48 e 72 horas (conforme metodologia estabelecida no *Capítulo anterior*). As sementes foram mantidas separadas da água com tela de nylon (5mm), onde as sementes foram dispostas uniformemente.

Germinação

Foi determinada pela contagem das sementes germinadas no período de 10 dias. As sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel de filtro tipo germitest umedecidas com água, em placas de Petri e mantidas em germinador a 25°C e luz constantes, proporcionada por quatro lâmpadas de 20W, tipo Luz do dia. Foram consideradas germinadas as sementes que emitiram radícula. O reumedecimento foi feito sempre que julgado necessário. Os resultados foram expressos em porcentagem média. Foram utilizados cinco repetições de 20 sementes cada.

2.2. Teor de lipídios

A determinação do teor de lipídios foi realizada pelo método de Soxhlet de extração a frio com éter de petróleo como solvente, conforme Silva (1990). Foram utilizadas três repetições de 1,0 g.

2.3. Extração das enzimas Catalase, Peroxidase e Superóxido dismutase

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações das atividades da catalase (CAT), da peroxidase (POX) e da superóxido dismutase (SOD) foram obtidos pela maceração de 0,2 g de tecido vegetal de cotilédone e eixo embrionário em N₂ líquido, seguido da adição de 2,0 mL do seguinte meio de homogeneização: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Seguiu-se centrifugação a 12.000 *xg* por 15 minutos, a 4°C, obtendo-se um extrato enzimático bruto. A reação mede produto consumido (H₂O₂).

2.4. Determinação da atividade enzimática

2.4.1. Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir & McHale, 1987). O decréscimo na absorbância a 240 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade da CAT determinada com base na inclinação da reta após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e o resultado expresso em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína. Foram utilizados quatro repetições com duplicatas.

2.4.2. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada pelo método de Kar & Mishra (1976). Alíquotas de 100 µL do extrato enzimático foram adicionados a 2,9 mL de uma mistura de reação constituída de tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM. O acréscimo na absorbância a 420 nm, à

temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação pela produção de purpurogalina, sendo, a atividade da POX determinada com base na inclinação da reta, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM cm⁻¹ (Chance & Maehley, 1955) e o resultado expresso em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína. Foram utilizados quatro repetições com duplicatas. O pirogalol incolor age como doador de elétrons para reduzir o H₂O₂ a H₂O e forma um composto oxidado colorido (purpurogalina). A reação mede quantidade de produto formado.

2.4.3. Determinação da atividade das superóxido dismutase (SODs, EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela adição de 30 µL do extrato enzimático bruto de cotilédone e eixo embrionário a 2,97 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25°C numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa fechada. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm (Giannopolitis & Ries, 1977). A absorbância a 560 nm, de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro, por igual tempo, serviu de “branco” e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971). Foram utilizados quatro repetições com duplicatas.

2.5. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com três a quatro repetições conforme o teste. Os resultados foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o programa Statistica 8.0. Para a comparação das médias, adotou-se o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3. Resultados e discussão

A porcentagem de germinação das sementes de *Melanoxylon brauna* reduziu gradativamente com o aumento do tempo de armazenamento (envelhecimento natural), (Figura 1a). A freqüência relativa evidencia o atraso de germinação com o deslocamento para a direita, com ênfase a partir dos seis meses de armazenamento (Figura 1b).

Ao contrario, sementes envelhecidas artificialmente a 40°C mantiveram a germinação final até 72 horas de envelhecimento, com a freqüência deslocada para a esquerda, indicando maior velocidade de germinação. As sementes envelhecidas por 96 horas mantiveram a mesma freqüência, mas com valores menores, quando comparadas ao envelhecimento natural (Figuras 1c e 1d). Esses resultados demonstram claramente que a temperatura de 40°C não foi eficiente para simular a aceleração do envelhecimento em sementes de *Melanoxylon brauna*, nas primeiras 72 horas. Nesse tempo de exposição, as sementes já estavam pré-embebidas. O avanço no processo de embebição somado à elevação da temperatura promoveu aceleração no metabolismo germinativo das sementes. Entretanto, com 96 horas, os efeitos negativos da deterioração começam a se manifestar com redução significativa na porcentagem de germinação e maior desuniformidade de germinação (Figuras 1c e 1d).

O envelhecimento artificial a 45°C afetou a capacidade germinativa das sementes já nas primeiras 24 horas de exposição, tendo maior redução com 96 horas de envelhecimento (Figura 1e). Entretanto, as variações nos efeitos dessa temperatura entre os tempos de exposição de 24, 48 e 72 horas são pequenas, observando-se deslocamento das curvas de freqüência para a esquerda, com menor intensidade em relação à temperatura de 40°C (Figuras 1d e 1f). Esse resultado evidencia que, ao contrário do envelhecimento natural, no artificial, a 45°C, a deterioração não se processa de forma gradativa com o aumento do envelhecimento. Evidencia ainda os efeitos da temperatura e da umidade que impulsionam a germinação das sementes mais vigorosas, já em menor número, resultando no deslocamento da curva para posição intermediária entre aquela de 40°C e a testemunha (figuras 1b, 1d e 1f).

Segundo Marcos Filho (2005), a deterioração é o processo que resulta no envelhecimento e culmina na morte da semente, enquanto vigor é o principal componente da qualidade afetado pela deterioração. Diversos autores relatam que a perda da capacidade de germinar constitui consequência ou o efeito final da deterioração, sendo o último evento que acontece no processo de deterioração (Delouche, 1974; Marcos Filho, 2005). Entre tais alterações, segundo McDonald (1999), está a produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO) que promovem modificação na estrutura das enzimas, além da degradação do sistema de síntese de novas enzimas. Por isso, o aumento da geração de EROs *in vivo* pode ter efeito deletério, pois estão envolvidos em mutagênese, apoptose e envelhecimento (Halliwell e Gutteridge, 1990). Também sob condições de estresse pode haver aumento na formação de EROs associado à supressão dos sistemas de defesa (Chang e Sung, 1998; Alscher et al., 2002). Nesse caso, está estabelecido o dano oxidativo, quando vários autores relacionam a perda da capacidade germinativa de sementes com a essa diminuição da eficiência dos sistemas antioxidantes (Hendry et al., 1992; Hendry, 1993; Sung, 1996; Chaitanya et al. 2000). A deterioração de sementes de girassol durante envelhecimento artificial foi estritamente relacionado a redução da atividade das enzimas de detoxificação das EROs e aumento da peroxidação de lipídios (Bailly et al., 1996).

Considerando a estrutura da semente, sabe-se que há regiões específicas, mais sensíveis à deterioração do que outras (Das e Sem-Mandi, 1992; Marcos Filho, 2005). Por isso, foram estudados separadamente os compartimentos do embrião (eixo embrionário e cotilédones). Com base nos resultados de germinação elegeu-se a temperatura de 45°C de envelhecimento artificial como mais indicada aos testes enzimáticos.

A enzima SOD apresentou, estatisticamente, o mesmo nível de atividade no eixo embrionário e nos cotilédones nas sementes recém colhidas (tempo zero), com posterior aumento apenas nos cotilédones após 12 meses de armazenamento. No eixo embrionário, a atividade foi mantida inalterada (Figura 2a), mesmo com a germinação em baixa. A atividade da SOD no eixo embrionário aumentou nas primeiras 24 horas de envelhecimento artificial, mantendo-se estável até 48 horas e decrescendo em 72 horas. Resultado este equivalente ao observado nas sementes armazenadas (0 e 12 meses), demonstrando a constância na manutenção da atividade. Entretanto, percebe-se que em 96 horas

de envelhecimento não se detecta atividade da SOD, muito embora ainda haja germinação. Provavelmente as poucas sementes vigorosas não foram em número suficiente para se ter volume do extrato adequado para a detecção. O nível na atividade da SOD no envelhecimento artificial entre 24 e 72 horas sugere tendência de aumento e ou na proteção contra danos celulares.

O aumento significativo na atividade da SOD no envelhecimento natural sugere maior atividade metabólica nos cotilédones. Muito embora a germinação decresça, há ainda mobilização de reservas para manter a atividade de respiração e produção de estrutura de carbono no eixo, como a de lipídios, por exemplo, predominantes nos cotilédones. A atividade da enzima SOD mantém-se estatisticamente estável até 48 horas e tende a aumentar entre 48 e 72 horas de exposição ao envelhecimento artificial (Figura 2b), tal como o aumento observado aos 12 meses de armazenamento, em que houve aumento na atividade da enzima (Figura 2a). Dessa forma, supõe-se tratar de isoenzima diferente daquela do embrião. Supõe-se também que a manutenção da atividade implica que o metabolismo é mais devagar do que no eixo nos tempos de 24 e 48 horas. Em 72 horas, há aumento significando aumento no metabolismo ou mudança do substrato sendo utilizado, com predominância daqueles que produzem EROs mais intensamente.

Segundo diversos autores, é necessária a formação de um sistema removedor de radicais livres, em que atuem conjuntamente e em seqüência as enzimas SOD, CAT e POX, para que haja uma eficiente proteção celular contra os danos degenerativos provocados pelas EROs (Fridovich, 1986; Klapheck et al., 1990; Bowler et al., 1992; McDonald, 1999; Alscher et al., 2002). As SOD são um grupo de enzimas encontradas no citoplasma celular e matriz mitocondrial, que catalisam reação de dismutação de radicais superóxido livres (O_2^-) convertendo-os a oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (McDonald, 1999), constituindo a primeira linha de defesa contra EROs (Alscher et al., 2002). Assim, as SODs estão entre os mais importantes sistemas de defesa, quando acopladas a rotas de eventos necessários à completa detoxificação das EROs (Alscher et al., 2002). O H_2O_2 , formado como subproduto da atividade da SOD, apesar de menos reativo, em altas concentrações torna-se tóxico, pois pode reagir formando radicais hidroxila (Bowler et al., 1992) que causam peroxidação de lipídios.

A atividade da POX no envelhecimento natural é alta inicialmente no eixo, levando a suposição de que o acúmulo de EROs produzidos durante o desenvolvimento é acumulado nas células. Com o tempo de armazenamento e a viabilidade decrescendo a atividade decresce. Assim, o sistema de desintoxicação fica deficiente no eixo. No envelhecimento artificial, a atividade decresce independente da velocidade de decréscimo da viabilidade, perdendo o embrião a capacidade de proteção contra os EROs formados durante a atividade da SOD.

Nos cotilédones a perda de atividade no envelhecimento natural também ocorre de maneira significativa, acompanhando a redução da viabilidade. O nível de atividade é menor do que no embrião, sugerindo menor atividade metabólica ligada á desintoxicação, significativamente diferente do eixo embrionário. Quando no envelhecimento artificial a velocidade de decréscimo é contínua, com tendência à estabilização em 72 horas de envelhecimento. Tal comportamento pode indicar falhas no sistema vez que a atividade da SOD aumentará neste compartimento, com provável aumento no teor de H_2O_2 ou outros radicais que não serão eliminados com eficiência.

Como os níveis da atividade em ambos os compartimentos se igualam em 72 horas, com valores relativamente baixos, mesmo com germinabilidade próxima em 24 e 48 horas, é de se supor que a atuação desta enzima não relaciona em intensidade com a redução na velocidade de deterioração.

A CAT no envelhecimento natural comportou-se à semelhança da POX, com decréscimos significativos tanto no eixo, quanto nos cotilédones. Tais comportamentos reforçam a suposição de eliminação de EROs formados durante o desenvolvimento, especialmente pela alta atividade de ambas as enzimas em ambos os compartimentos, no tempo zero e significativo decréscimo 12 meses posteriores, quando provavelmente já haviam sido eliminados e o fato de as sementes estarem secas, a baixa temperatura, com metabolismo bastante reduzido e não iriam produzir mais sub-produtos.

No envelhecimento artificial a POX do eixo teve sua atividade aumentada em 24 horas e queda acentuada logo em seguida. Supõe-se que a aceleração da germinação das sementes vigorosas também produziu os EROs, resultando no grande aumento na atividade da peroxidase no tempo de 24 horas. A atividade da enzima nos cotilédones foi aproximadamente 1/3 mais baixa, confirmando a baixa

atividade metabólica ou o substrato utilizado não ser produtor de EROs em maiores concentrações.

Assim, percebe-se que há similaridades nos comportamentos das três enzimas, tanto no envelhecimento natural, quanto no artificial em ambos os compartimentos permitindo afirmar que no aspecto de processo de desintoxicação, o envelhecimento artificial possui mecanismo similar àquele do envelhecimento natural, da mesma forma que a utilização de reservas de lipídios.

Senaratna et al. (1986) afirmaram que a SOD é o mais notável exemplo de neutralizador de radicais livres, pois é efetiva ao menor sinal de dano. Entretanto, a atividade da SOD observada nos cotilédones de *M. brauna*, atuando isoladamente, é, possivelmente, pouco funcional na proteção da semente, pois não encontra sincronia nas atividades da CAT e POX, que teriam papel importante no processo de remoção dessas EROs uma vez que houve redução na atividade de ambas as enzimas no eixo embrionário e nos cotilédones durante o período (Figura 2c e 2e). Elas tiveram atividades estatisticamente mais pronunciadas no eixo embrionário em relação aos cotilédones nas sementes recém colhidas indicando haver, inicialmente, maior proteção nesses tecidos. As atividades da CAT e da POX no eixo embrionário e cotilédones apresentaram o mesmo comportamento quando envelhecidas natural ou artificialmente (Figuras 2d e 2f).

É relevante ressaltar a atuação da POX como defesa antioxidativa predominante para sementes de *M. brauna*, sugerida por seu maior nível inicial de atividade no eixo em ambos os sistemas de envelhecimento (Figuras 2e e 2f). Em sementes de *Ginkgo biloba* armazenadas a 4°C a atividade da catalase manteve-se estável no embrião e endosperma, reduzindo significativamente sua atividade apenas aos 12 meses, ao passo que quando expostas a 25°C essa queda na atividade foi antecipada para os 6 meses de armazenamento (Tommasi et al., 2006).

CAT e POX atuam na remoção do H₂O₂ (Fridovich, 1986; McDonald, 1999), protegendo as membranas do dano peroxidativo. O H₂O₂ é detoxificado pela CAT (ativa em altas concentrações de H₂O₂) nos peroxissomos e pela peroxidase no citosol e cloroplastos (Klapheck et al., 1990).

Houve redução progressiva no teor de lipídios no eixo embrionário e cotilédones de sementes de *M. brauna* com o aumento da deterioração de

sementes armazenadas. Resultados semelhantes foram observados tanto no armazenamento por 12 meses (Figura 3a) quanto no envelhecimento artificial por 72 horas (Figura 3b). Neste, estabilizou a partir daí, em ambos os compartimentos. O aumento da peroxidação de lipídios, mediado por radicais livres e peróxidos é uma das prováveis razões para a perda da viabilidade de sementes durante o armazenamento. Eles reagem com os ácidos graxos insaturados afetando estrutura e função das membranas celulares (Wilson and McDonald, 1986; Hendry, 1993; Sung, 1996).

4. Conclusões

Há equivalência de resultados entre ambos os métodos de envelhecimentos natural e artificial.

O método de envelhecimento artificial a 45°C por 72 horas simula os resultados bioquímicos da deterioração impostos ao longo de 12 meses de armazenamento em câmara fria, em sementes de brauna.

5. Referências bibliográficas

ALSCHER, RG; HESS, JL. **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

ALSCHER, RG; ERTURK, N; HEALTH, LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental Botany**. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue. v.53, n.372, p.1331-1341, 2002.

ARRIGONI, O.; DE GARA, L.; TOMMASI, F.; LISO, R. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L., **Plant Physiology**, v. 99, p. 235-238, 1992.

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

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

BEAUCHAMP C., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase improved as says and as say ap pli ca ble to acrylamide gels. **Anal. Biochemistry**. v. 44, p. 276-287, 1971.

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

CAMARGO, M.L.P.; MORI, E.S.; MELLO, E.J.; ODA, S.; LIMA, G.P. Atividade enzimática em plântulas de *Eucalyptus grandis* provenientes de sementes envelhecidas artificialmente e naturalmente. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 113-122, 2000.

CHAITANYA, K.S.K.; NAITHANI, T. Role of superoxid, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss os viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn. F. **New Phytology**, v. 126, p.623-627, 1994.

CHAITANYA, K.S.K.; NAITHANI, T.; NAITHANI, S.C. Ascorbic acid metabolism in ageing recalcitrant sal (*Shorea robusta* Gaertn. F.) seeds. **Indian Journal Experimental Botany**, v. 38, p. 1031-1035, 2000.

CHANG, S.M.; SUNG, J.M. Deteriorative changes in primed sweet corn seeds during storage. **Seed Science and Technology**, v. 26, p.613-626, 1998.

DAS, G.; SEM-MANDI, S. Scutellar amylase activity in naturally aged and accelerated aged wheat seeds. **Annals of Botany**, Oxford, v.69, p.479-501,1992.

DEL RIO, LA; PASTORI, GM; PALMA, JM; SANDALIO, LM; SEVILLA, F; CORPAS, FJ; JIMÉNEZ, A; LÓPEZ-HUERTAS, E; HERNÁNDEZ, JA. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiol.** v.116, p.1195-1200, 1998.

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.

DELOUCHE, J.C. **Maintaining soybean seed quality**. Proc. TVA SYMP. ON Soybean Prod., Marketing and Use. TVA Bull. Y69, Muscle Shoals, 40-63 USA. 1974.

FANAN, S.; P.F. MEDINA ; T. C. LIMA ; J.M. FILHO . Avaliação do vigor de sementes de trigo pelos testes de envelhecimento acelerado e de frio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, p. 152/2-158, 2006.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 247, p. 1-11, 1986.

GIANNOPOLITIS, C.N.; REIS, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, p.309-314, 1977.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and medicine**, thirth ed Oxford University Press, 1999.

HENDRY, G.A.F.; FINCH-DAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; BUCKLAND, S.M.; NILSSON, K.A.; SEEL, W.E. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytology**, v.122, p.273-279, 1992.

HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**. V.3, p.141-153, 1993.

IBAMA – Lista oficial de Flora ameaçada de extinção – acesso em 5/02/2008. Site: [<http://www.ibama.gov.br/flora>].

LEHNER, A.; BAILLY, C.; FLECHEL, B.; POELS, P.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Changes in wheat seed germination ability, soluble carbohydrate and antioxidant enzyme activities in the embryo during the desiccation phase of maturation. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 175-182, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

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

Mc DONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1999.

MERRIT, D.J.; SENARATNA, T.; TOUCHELL, D.H.; DIXON, K.W.; SIVASITHAMPARAM, K. Seed ageing of four Western Australian species in relation to storage environmental and seed antioxidant activity. **Seed Science Research**, v. 13, p.155-165, 2003.

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

SANTOS, S.R.G.; PAULA, R.C. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de lotes de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilho) – Euphorbiaceae. **Rev. Instituto Florestal**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2007.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: LEOPOLD, A. C. **Membranes, metabolism and dry organisms**. London, p. 85-101, 1986.

SILVA, D.J.; **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: Imprensa Universitária, 165 p., 1990.

SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology**, 9, p. 214-219, 1998.

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

SUNG, J.M.; CHIU, K.Y. Hydration effect on seedling emergence strength of watermelon seeds differing in ploidy. **Plant Science**, v. 110, p.21-26, 1995.

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

SUNG, JM. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. **Physiol Plant** v. 97, p. 85–89, 1996.

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; PINTO, M.C.; GARA, L.D. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p.1647-1654, 2001.

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; PINTO, M.C.; GARA, L.D. Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p.359-368, 2006.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M.; SADER, R. Testes de vigor e suas possibilidades de uso. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, p.31-47, 1994.

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

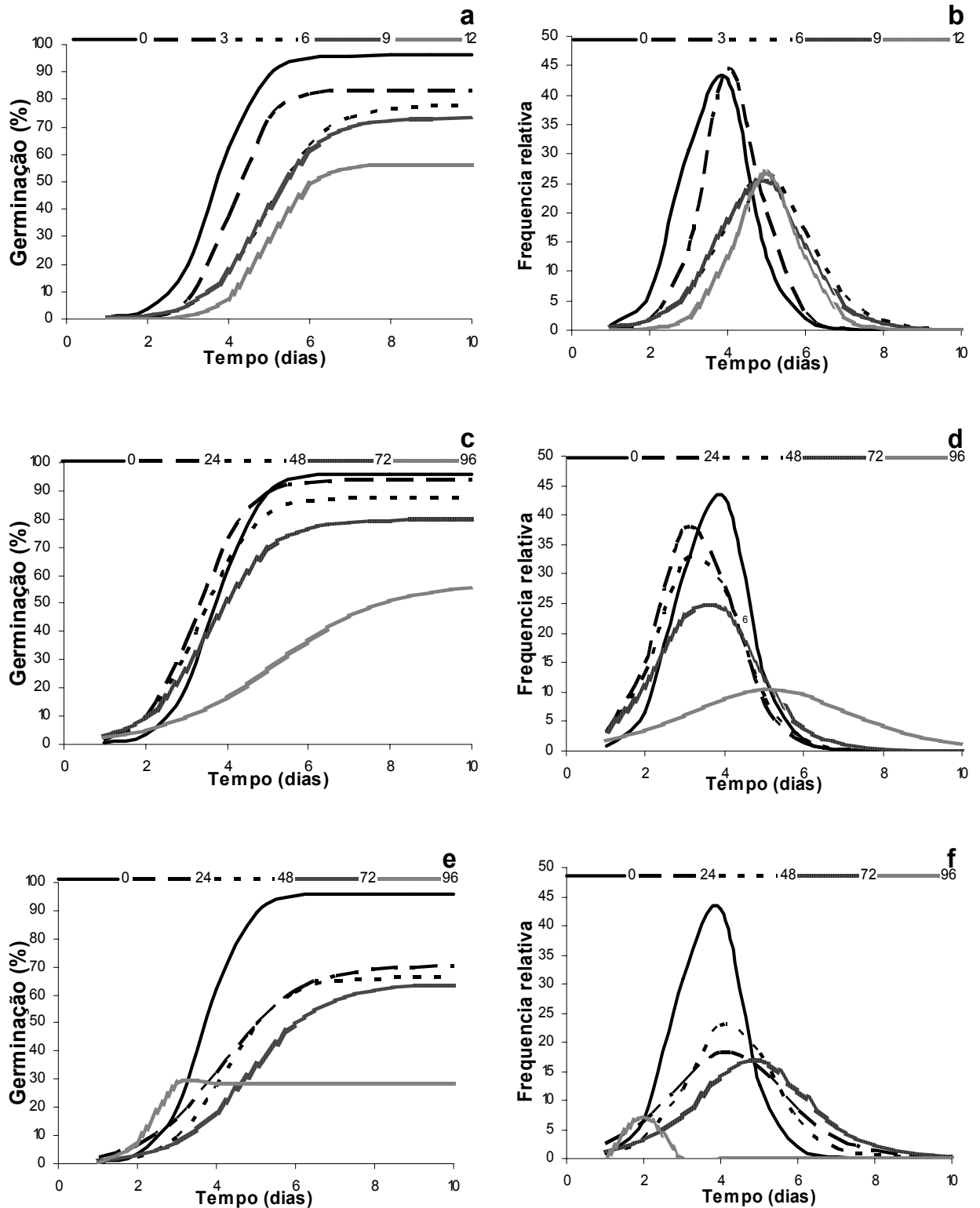


FIGURA 1 – Porcentagem e freqüência relativa de germinação das sementes de *Melanoxylon brauna* em função do tempo de envelhecimento natural (a - b) e artificial a 40°C (c - d) e 45°C (e - f).

Figure 1 – Percentage and relative frequency of germination of seeds of seeds of *Melanoxylon brauna* on function of natural (a - b) and artificial ageing 40°C (c - d) and 45°C (e - f).

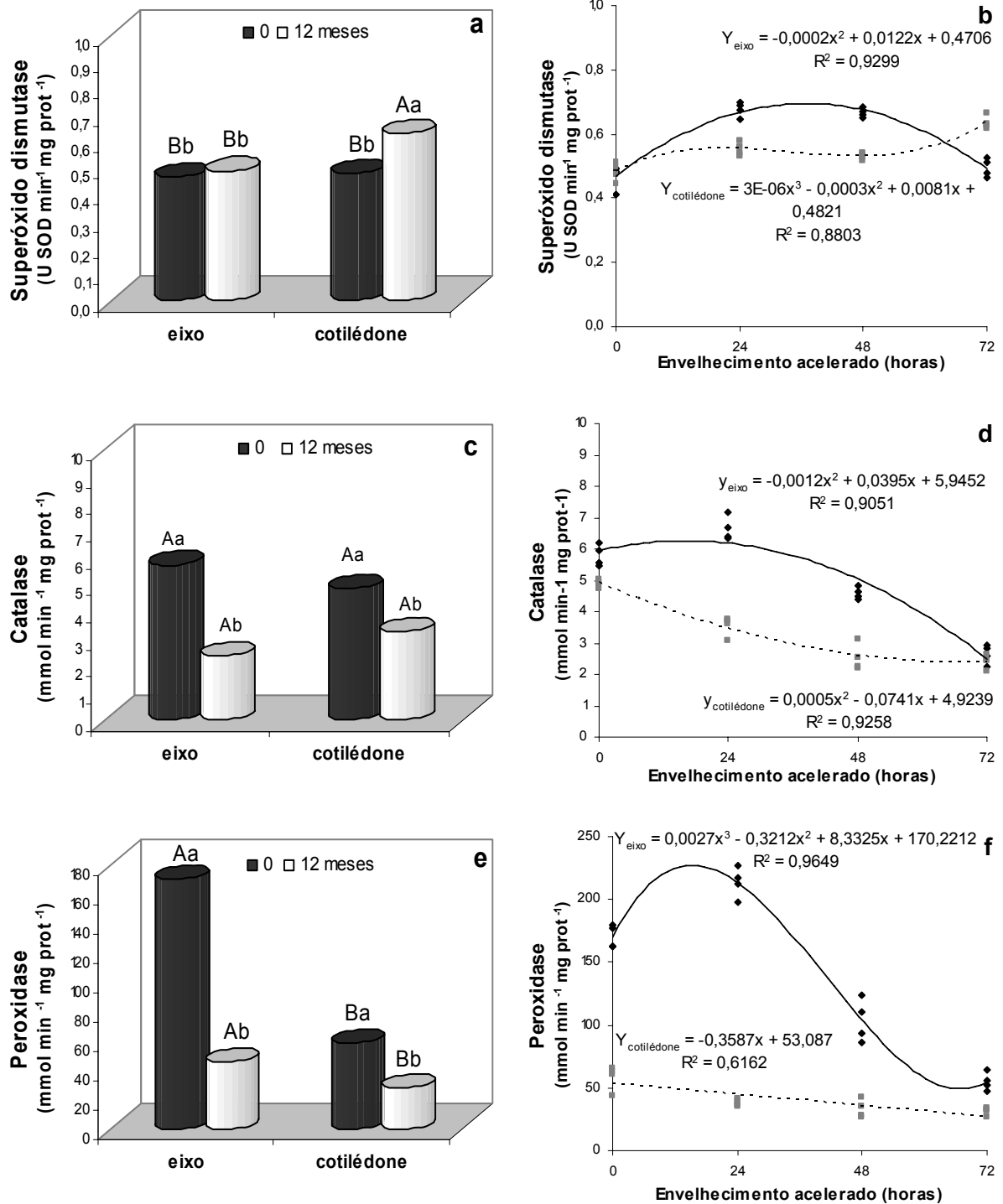


FIGURA 2 – Atividade das enzimas superóxido dismutase (a - b) catalase (c - d) e peroxidase (e - f) em sementes de *Melanoxylyon brauna*, em função do envelhecimento natural e artificial. —■ eixo embrionário; —□ cotilédone. Letras maiúsculas comparam médias entre compartimentos, e letras minúsculas comparam tempos inicial e final pelo Teste F.

Figure 2 - Enzymes activity: superoxide dismutase (a - b), catalase (c - d) and peroxidase (e - f) of seeds of *Melanoxylyon brauna*, on function of natural ageing (a - b) and artificial ageing 40°C (c - d) and 45°C (e - f). —■ embryonic axis; —□ cotyledon. Capital letters compare averages between different compartments, and small letters inside compare initial and final times for the F Test.

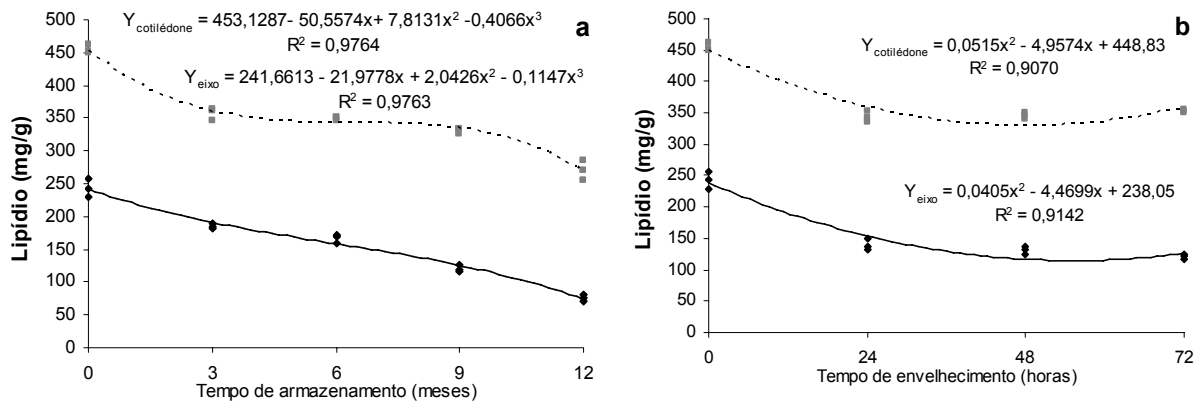


FIGURA 3 – Teor de lipídios de sementes de *Melanoxylon brauna*, em função do envelhecimento natural (a) e artificial (b). —■ eixo embrionário; ----■ cotilédone.
 Figure 3 – Lipid content seeds of *Melanoxylon brauna*, on function of natural (a - b) and artificial ageing 40°C (c - d) and 45°C (e - f). —■ embryonic axis; ----■ cotyledon.

ANEXO I

Equações de regressão não linear (modelo logístico) - Figura 1.

| | Tratamento | Equação |
|-------------------|-----------------|--|
| Germinação | Tempo zero (T0) | $Y = 96,10 \left(1 + 1332,60 e^{-1,95x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9992; S = 1,8959$ |
| | 3 meses | $Y = 83,45 \left(1 + 7137,42 e^{-2,16x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9991; S = 1,8309$ |
| | 6 meses | $Y = 77,82 \left(1 + 891,63 e^{-1,37x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9958; S = 3,6578$ |
| | 9 meses | $Y = 73,24 \left(1 + 915,31 e^{-1,41x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9933; S = 4,3697$ |
| | 12 meses | $Y = 56,36 \left(1 + 403291,75 e^{-1,89x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9998; S = 0,5502$ |
| | 24 horas 40°C | $Y = 94,02 \left(1 + 253,64 e^{-1,69x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9980; S = 2,7067$ |
| | 48 horas 40°C | $Y = 87,72 \left(1 + 214,0 e^{-1,60x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9984; S = 2,2055$ |
| | 72 horas 40°C | $Y = 79,78 \left(1 + 98,87 e^{-1,29x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9918; S = 4,6529$ |
| | 96 horas 40°C | $Y = 57,19 \left(1 + 46,37 e^{-0,74x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9970; S = 1,8582$ |
| | 24 horas 45°C | $Y = 70,45 \left(1 + 76,70 e^{-1,04x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9932; S = 3,8070$ |
| | 48 horas 45°C | $Y = 66,16 \left(1 + 420,30 e^{-1,42x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9962; S = 2,8907$ |
| | 72 horas 45°C | $Y = 63,83 \left(1 + 175,51 e^{-1,07x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9944; S = 3,2829$ |
| | 96 horas 45°C | $Y = 28,43 \left(1 + 442,60 e^{-1,28x}\right)^{-1} R_{y\hat{y}} = 0,9965; S = 1,1821$ |

Capítulo IV

**Estudo bioquímico da deterioração de sementes de
Melanoxylon brauna no envelhecimento natural e
artificial**

***BIOCHEMICAL STUDY OF DETERIORATION OF MELANOXYLON BRAUNA SEEDS
IN NATURAL AND ARTIFICIAL AGED***

Estudo bioquímico da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* no envelhecimento natural e artificial

Resumo – A deterioração de sementes é fato irreversível, podendo, no máximo, ser retardada com aplicação de técnicas que reduzam a velocidade das reações metabólicas envolvidas. Informações bioquímicas sobre sementes florestais tropicais relacionadas a sua armazenabilidade são escassas. O objetivo do presente trabalho foi pesquisar a influência da composição de lipídios e de açúcares solúveis do eixo embrionário e dos cotilédones de sementes de brauna (*Melanoxylon brauna* - Leguminosae-Caesalpinoideae) armazenadas por 0, 3, 6, 9 e 12 meses em câmara fria a 20°C (envelhecimento natural) e no envelhecimento artificial durante 0, 24, 48 e 72 horas. Os envelhecimentos natural e artificial afetaram de forma semelhante o comportamento bioquímico das sementes em relação ao teor de oligossacarídeos, promovendo redução da viabilidade e do vigor. Os monossacarídeos tiveram maior tendência a decréscimo no envelhecimento natural e aumento no envelhecimento artificial. Os ácidos graxos tiveram tendência geral de queda em ambos os métodos de envelhecimento das sementes.

Palavras chave – floresta, armazenamento, carboidratos, lipídios, espécies nativas.

**BIOCHEMICAL STUDY OF DETERIORATION OF *MELANOXYLON BRAUNA* SEEDS
IN NATURAL AND ARTIFICIAL AGED**

ABSTRACT - The decay of seeds is an irreversible fact, and can only be delayed with the application of a technique that reduces the speed of the metabolic reactions involved. There is a lack of biochemical information on the tropical forest tree related with their storability. The objective of the present work was to investigate the influence of the composition of fats and soluble sugars of the embryonary axis and cotyledons of *Melanoxylon brauna* – Leguminosae Caesalpinioideae (*brauna*) seeds, stored for 0, 3, 6, 9, and 12 months in cold chamber at 20°C (natural aging) and on the artificial aging during 0, 24, 48, 72, and 96 hours. The natural and artificial agings affected in a similar manner the biochemical behavior of the seeds in relation to the oligosaccharides contents, causing a reduction in the viability and vigour. The monosaccharide had a greater tendency to decrease in the natural aging and to increase in the artificial aging. The fat acids had a general tendency to drop in both aging methods.

Key Words - forest, storage, carbohydrates, lipids, native species.

1. Introdução

Altas temperatura e umidade durante o armazenamento das sementes contribuem para acelerar a deterioração (McDonald, 1999), por promoverem reações degenerativas no metabolismo. Macromoléculas essenciais à germinação são degradadas durante o envelhecimento, prejudicando seu aproveitamento em processos de síntese e liberação de energia (Marcos Filho, 2005) com conseqüentes prejuízos à germinação e sobrevivência das plântulas. Entre essas estão alterações no teor de ácidos graxos livres e de açúcares redutores (Vieira et al., 1994). Entretanto, o efeito desses fatores na longevidade de diferentes espécies pode variar com as características estruturais e bioquímicas das sementes (Wilson & McDonald, 1986; Kapana e Rao, 1996; Camargo et al., 2000).

Além de amplamente variáveis e escassas as informações sobre o comportamento das sementes florestais no processo de envelhecimento, são ainda bastante contraditórios os resultados de diferentes metodologias de envelhecimento usadas em testes que visam estudar o vigor e deterioração das sementes. Alguns autores afirmam haver alta correlação entre envelhecimento natural e artificial, sendo os mecanismos promotores da deterioração os mesmos em ambas as situações, somente variando a velocidade em que ocorrem (Delouche & Baskin, 1973; Marcos-Filho, 1994; Santos e Paula, 2007). Outros autores afirmam que o envelhecimento artificial não reproduz de forma confiável os eventos metabólicos que acontecem durante o armazenamento, sendo diferentes os mecanismos que levam ao envelhecimento, portanto não sendo recomendado como simulador do processo de envelhecimento natural (Bailly et al., 1996, Borges et al., 2000; Fanan et al., 2006).

Braúna preta (*Melanoxylon brauna* – Leguminosae - Caesalpinoideae) é árvore nativa muito conhecida pela qualidade e durabilidade de sua madeira. Sua ocorrência está descrita para a floresta atlântica como o sul da Bahia, São Paulo, Minas Gerais (Lorenzi, 1992), Goiás, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Maranhão e Piauí (IBAMA, 2008). Entretanto, devido à exploração excessiva e falta de replantios, a espécie está classificada como vulnerável, conforme a “lista oficial de flora ameaçada de extinção” (IBAMA, 2008).

Sementes utilizadas para a produção de mudas devem ser mantidas íntegras e viáveis, sobretudo quando a semeadura não ocorre imediatamente após a maturação e colheita. Por isso, diante da escassez de estudos acerca do processo de deterioração e perda do vigor de sementes dessa espécie, este trabalho objetivou estudar o metabolismo de lipídios e carboidratos das sementes de *Melanoxylon brauna* durante o envelhecimento natural e artificial. Estas informações, além de relevantes para a pesquisa básica, são essenciais para melhor entendimento dos processos ecológicos do estabelecimento de plantas, sucessão e regeneração dentro das comunidades e constituem ferramenta básica na conservação sob armazenagem nos bancos de germoplasma, seja para cultivos comerciais, ou para medidas de reflorestamento e preservação da espécie.

2. Material e Métodos

Foram utilizadas sementes de *Melanoxylon brauna* colhidas na região de Viçosa, Minas Gerais. Os trabalhos foram conduzidos junto ao Laboratório Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Durante o beneficiamento foram eliminados os frutos e sementes imaturos, deteriorados ou danificados. Antes de cada experimento as sementes foram tratadas com solução de Captan 0,5% por 60 segundos.

Todas as análises foram realizadas em sementes recém colhidas (sem armazenamento – tempo zero), usadas como controle. No envelhecimento natural as análises foram feitas a cada três meses durante 12 meses de armazenamento. As sementes foram armazenadas em embalagens plásticas e colocadas dentro de tubos de papelão em câmara fria a 20°C com 60% de umidade relativa.

Para o envelhecimento artificial foram utilizadas caixas gerbox, contendo 40mL de água destilada, as quais foram colocadas em câmara de envelhecimento artificial à temperatura de 45°C e 100% de umidade relativa do ar. Os tempos de envelhecimento foram de 0, 24, 48 e 72 horas. As sementes foram mantidas separadas da água por telas de nylon.

2.1. Teor de ácidos graxos

Utilizou-se a metodologia descrita por Silva (1990) para extração de lipídios. As amostras de cotilédones e do eixo embrionário foram secas e maceradas em almofariz de porcelana e colocadas em cartuchos de papel-filtro. O óleo foi extraído a frio com éter de petróleo, em extrator Soxhlet, num período de 24 horas, após o qual, as amostras foram mantidas sob nitrogênio em ultra freezer (-20°C), até a data das quantificações.

Os ácidos graxos foram analisados por meio de seus respectivos ésteres metílicos, conforme metodologia descrita por Passos (1989). Foram pesados 20 mg da amostra de óleo dos cotilédones e do eixo embrionário que foram dissolvidos em 0,5 mL de tetrahidrofurano (THF), adicionando-se 1.000 µL de solução de metóxido de sódio 0,5 M, preparada com metanol anidro. Os tubos foram colocados em banho maria a 50°C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µL de ácido acético glacial e 3.000 µL de água destilada. A amostra foi transferida para balão de separação e os ésteres metílicos extraídos por duas vezes com 5000 µL de hexano. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, contendo 10% de K₂CO₃ sólido. O solvente foi removido em rota evaporador e os ésteres metílicos ressuspensos em 1.000 µL de hexano.

Foi injetado 1 µL das amostras em cromatógrafo e os cromatogramas para foram obtidos com o uso do cromatógrafo a gás Shimadzu CG14-A, equipado com detector de ionização de chama (FID), acoplado a um registrador e integrador C-R6A Chromatopac. Para quantificar os ácidos graxos, utilizou-se coluna capilar da Shimadzu, de 50m X 0,2mm (di) de sílica fundida. O fluxo de gás de arraste (H₂) foi de 30 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220° e 230°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada para 190°C isotérmica durante 60 segundos, seguida de elevação na razão de 2°C min⁻¹, até atingir a temperatura máxima de 200°C, permanecendo isotérmica durante 20 min.

2.2. Teores de monossacarídeos e oligossacarídeos

As extrações de monossacarídeos e oligossacarídeos do embrião e dos cotilédones foram feitas conforme metodologia descrita por Black et al. (1996), com modificações: o material seco e moído foi homogeneizado com etanol e,

após a centrifugação, separado o sobrenadante. Esse processo foi repetido por três vezes. Os sobrenadantes contendo os carboidratos solúveis foram secos e ressuspensos com água ultra-pura.

Foram retiradas amostras de 500µL para preparo do alditol acetato e quantificação dos monossacarídeos, conforme Englyst e Cummings (1984). Os cromatogramas para foram obtidos com o uso do cromatógrafo a gás Shimadzu CG14-A, equipado com detector de ionização de chama (FID), acoplado a um registrador e integrador C-R6A Chromatopac. Utilizou-se coluna moderadamente polar, 50% de cianopropil fenil dimetil siloxane. O fluxo de gás foi de 15 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor, do detector e da coluna foram de 250°, 220° e 275°C, respectivamente. Volume de injeção para CG foi de 1 microlitro.

Amostras de 100µL de foram concentradas até secura total da amostra em liofilizador, ressuspensas em metanol, filtradas para retirar resíduos de proteínas e pigmentos da amostra e novamente concentradas em liofilizador. Posteriormente a amostra foi diluída em 500µL água ultra pura e 20µL de amostra utilizados para quantificação dos oligossacarídeos, separados por meio da técnica da cromatografia líquida de alta performance (HPLC, marca Shimadzu). Utilizou-se coluna HPX-42C Aminex 300 x 7.8mm, temperatura do forno 40° C. Detector índice de refração RID-10^a, análise isocrática, fase móvel é água e o tempo de análise foi de 20 min.

2.3. Análise estatística

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado. Foram utilizadas três repetições feitas em triplicatas. Os dados obtidos para as variáveis foram submetidas à análise de variância seguidas de regressão e todas as análises foram feitas a 5% de significância. Utilizou-se o programa Statistica versão 6 (SratSoft, 2001).

3. Resultados e discussão

Susko e Lovett-Doust (2000) afirmam que a disponibilidade de reservas da semente irá influenciar o estabelecimento da plântula e Marcos Filho (2005) relata como comum a ocorrência de alterações na composição química das sementes

que se dá, de forma gradativa e em intensidade e velocidade variáveis, à medida que progride a deterioração. Esse processo envolve alterações nas substâncias de reserva e na síntese e atividade de enzimas, todas com influência direta na composição química das sementes, culminando na perda da viabilidade em face da queda da atividade vital, devido ao consumo gradativo do material de reserva pela respiração.

Considerando a estrutura da semente, sabe-se que há regiões específicas, mais sensíveis à deterioração do que outras (Das e Sem-Mandi, 1992; Marcos Filho, 2005).

Durante o período de armazenamento, observou-se tendência inicial de aumento do teor do ácido capróico no eixo embrionário até o terceiro mês, mantendo-se sem maiores variações até o 12º mês (Figura 1a). O teor do ácido capróico nos cotilédones aumentou continuamente até o nono mês, estabilizando-se no 12º (Figura 1a). Houve aumento significativo no teor de ácido mirístico tanto no eixo embrionário quanto nos cotilédones, com valores e comportamento próximos entre si (Figura 1b). O ácido palmítico apresentou pequeno decréscimo no eixo embrionário até o terceiro mês, estabilizando-se até o 12º mês (Figura 1c). Nos cotilédones os teores decresceram até o sexto mês, com subsequente tendência de aumento até o final do armazenamento (Figura 1c). Diferente dos anteriores, os teores do ácido esteárico no eixo embrionário e nos cotilédones tiveram comportamentos opostos (Figura 1d). Enquanto no primeiro houve pequena variação durante o armazenamento, no segundo os valores decresceram significativamente até o sexto mês, com subsequente aumento até o final do armazenamento (Figura 1d). Os ácidos oléico e linolêico (Figuras 1e e 1f) apresentaram tendências semelhantes à do esteárico (Figura 1d). O conteúdo de ácido oléico nos cotilédones decresceu até o nono mês, com pequena elevação no último mês. No eixo embrionário, os teores se mantiveram aproximadamente constantes até o sexto mês, com decréscimo a seguir até o 12º mês (Figura 1e). Quanto ao ácido linolêico (Figura 1f), os valores nos cotilédones comportaram-se à semelhança do esteárico. No eixo embrionário os valores variaram pouco ao longo do armazenamento.

Sementes de *Hevea brasiliensis* apresentaram tendência de redução no conteúdo dos ácidos oléico, linolêico e linolênico quando armazenadas nas

mesmas condições estabelecidas para a análise das sementes de *Melanoxylon brauna* nesse trabalho (Paula, 1997).

No envelhecimento artificial o ácido capróico manteve-se praticamente inalterado tanto no eixo embrionário, quanto nos cotilédones, com valores praticamente iguais (Figura 2a). O ácido mirístico no eixo embrionário teve seu teor minimamente reduzido, enquanto nos cotilédones o decréscimo foi expressivo, alcançando valor semelhante ao do eixo em 72 horas de envelhecimento (Figura 2b). O teor de ácido palmítico nos cotilédones aumentou nas primeiras 24 horas e reduziu-se a partir daí até as 72 horas (Figura 2c). No eixo embrionário o teor permaneceu estável inicialmente, decrescendo até o final do envelhecimento. Percebe-se que ambos os compartimentos tiveram comportamento bastante semelhante. O teor de ácido esteárico apresentou pequena redução nos cotilédones ao longo do período de envelhecimento. Por outro lado, no eixo embrionário observou-se estabilidade nas 24 horas, seguido de decréscimo nos tempos seguintes (Figura 2d). O teor de ácido oléico reduziu significativamente no eixo embrionário, enquanto nos cotilédones a variação não foi estatisticamente significativa (Figura 2e). O teor de ácido linolêico não apresentou grande variação no eixo embrionário e cotilédones, apenas teve os valores ligeiramente elevados em 24 horas, mantendo-se próximos nos demais tempos (Figura 2f). Thapliyal & Connor (1997) em seus experimentos também observaram pequena variação na porcentagem total de ácidos graxos durante o período de envelhecimento artificial.

É interessante notar que os teores de todos os ácidos graxos nos cotilédones, com exceção do capróico, apresentaram-se mais altos do que no eixo embrionário em ambos os tipos de envelhecimento. O capróico comportou-se de maneira semelhante às sementes mantidas em armazenamento. Neste mesmo ambiente, o mirístico teve seus valores próximos, em ambos os compartimentos. Observa-se também que as variações nos teores dos ácidos graxos durante o envelhecimento natural, em cada compartimento, comportam-se de maneira independente, com exceção do oléico, cujos teores no eixo embrionário decrescem à medida que os dos cotilédones aumentam na mesma proporção. Durante o envelhecimento artificial a utilização dos ácidos em um compartimento não mostra qualquer tendência em relação ao outro. É possível verificar que, de modo geral, a tendência dos ácidos graxos no eixo embrionário é

terem seus teores reduzidos ou ficarem estáveis. Somente os teores do ácido oléico nos dois tipos de envelhecimento e o palmítico no envelhecimento artificial decresceram.

Diversos autores têm buscado correlacionar o avanço do processo de deterioração das sementes com mudanças no teor de ácidos graxos. Zeleny (1954) observou aumento de ácidos graxos livres em cereais, associados com a perda do vigor. Entretanto, no presente trabalho, nas sementes de *Melanoxylon brauna*, houve, de modo geral, maior tendência de queda do que de aumento no teor de ácidos graxos. Pesquisas de Trawatha et al. (1995), Basavarajappa et al. (1991) e Halder et al. (1983) também mostram redução no conteúdo de ácidos graxos em sementes de soja no envelhecimento natural e milho e girassol no envelhecimento artificial, respectivamente.

Dentro da fração lipídica das membranas, os ácidos graxos poliinsaturados, tais como linolêico e linolênico, são suscetíveis à degradação oxidativa (Bewley e Black, 1994). Os danos nas membranas podem ser resultantes, entre outros fatores, da ocorrência de mudanças na composição dos ácidos graxos, que levam às mudanças ultra estruturais e conseqüentemente aumento na condutividade dos lixiviados (Coolbear, 1995) e esses fatores são considerados conseqüência direta do envelhecimento (Wilson Jr. e McDonald Jr., 1986), e uma das principais razões da perda da armazenabilidade (Chiu et al., 1995; Bailly et al., 1996).

Os teores dos monossacarídeos xilose, manose e galactose apresentaram queda significativa no eixo embrionário das sementes armazenadas (Figuras 3a, 3b e 3c). De forma contrária, os teores de glicose, em ambos os compartimentos das sementes, bem como a xilose nos cotilédones, aumentaram ao longo do período de armazenamento (Figuras 3d e 3a respectivamente). A galactose, nos cotilédones, apresentou significativo aumento no teor até o terceiro mês e pequena redução, com estabilização do terceiro ao 12º mês de armazenamento (Figura 3c).

Somente a xilose mostrou correlação positiva na comparação entre os dois compartimentos, com variações opostas durante o período de envelhecimento natural, sugerindo transferência desse açúcar entre os compartimentos. Nos demais açúcares o comportamento foi claramente local entre os cotilédones e o eixo embrionário, muito embora o segundo tivesse os menores valores dos açúcares ao final do período de armazenamento, com exceção da glicose. No

geral, observa-se que a xilose, a manose e a galactose foram, provavelmente, utilizadas pelo eixo durante o período de armazenamento. A possibilidade da lixiviação dos monossacarídeos do eixo para o meio fica descartada tendo em vista o aumento ou estabilidade dos teores nos cotilédones e o baixo teor de água das sementes (variou de 11 a 13% no tempo zero e 12 meses, respectivamente), o que impossibilitaria a remoção dos mesmos de ambos os compartimentos.

Durante o envelhecimento artificial observou-se que o teor de xilose aumentou até 48 horas de envelhecimento, permanecendo aproximadamente estável nas 24 horas seguintes (Figura 4a). Nos cotilédones o teor de xilose permaneceu constante por 48 horas, aumentando em seguida. Os teores de manose do eixo e dos cotilédones (Figura 4b) tiveram comportamentos divergentes, com valores próximos a antes do envelhecimento e com ligeiro aumento no eixo embrionário e estabilizando-se nos cotilédones. A galactose teve os valores praticamente estáveis no eixo durante o tempo de envelhecimento, enquanto aumenta nos cotilédones, alcançando valores próximos entre os compartimentos (Figura 4c). A glicose, que apresentou a menor quantidade dentre os demais açúcares, também mostrou valores crescentes e divergentes entre os dois compartimentos durante o envelhecimento (Figura 4d). Diferente das sementes envelhecidas naturalmente, no envelhecimento artificial não houve consumo das reservas dos açúcares, apesar da mobilização dos mesmos de suas fontes nas sementes.

Fica evidente que os comportamentos das sementes durante um envelhecimento e outro são diferentes na utilização de suas reservas de açúcares, em qualquer um dos compartimentos.

Locher e Buchelli (1998) e Marcos Filho (2005) afirmam que durante o envelhecimento ocorre liberação gradual de açúcares redutores que agem acelerando a deterioração por induzir a destruição dos componentes das proteínas, afetando a viabilidade das sementes. As enzimas que poderiam promover tal liberação, como a invertase e α -galactosidase, requerem níveis de hidratação relativamente altos para sua atividade (Wettlaufer e Leopold, 1991), por isso acredita-se que este evento foi, provavelmente, facilitado nas sementes de *M. brauna*, quando expostas a alta umidade relativa no envelhecimento artificial. Justifica-se assim a maior tendência de aumento nos teores de açúcares redutores entre essas sementes em relação àquelas armazenadas. Assim, o

alto teor de água, que pode estar induzindo atividade de enzimas responsáveis pela liberação de açúcares redutores, causadores, em potencial, da desestruturação das proteínas pode esclarecer também a maior perda da atividade das enzimas antioxidantes quando submetidas ao envelhecimento artificial (*Capítulo anterior*), expondo assim as membranas celulares à ação das EROs culminando por fim na morte das sementes.

Observa-se que houve comportamento semelhante entre as sementes envelhecidas naturalmente e artificialmente no uso dos oligossacarídeos (Figura 5a, b, c, d, e, e f). Os teores no eixo embrionário foram sempre mais elevados do que nos cotilédones. Ao final de 12 meses de armazenamento ou de 72 horas de envelhecimento artificial os valores aproximaram-se pelo maior uso dos açúcares no eixo em relação ao dos cotilédones. Não há clara definição entre a estaquiase e a rafinose a respeito de quem é utilizado primeiro (Figura 5a e c), diferente da sacarose no armazenamento cujo teor permaneceu relativamente estável durante nove meses, decrescendo em seguida (Figura 5e).

Segundo Dey (1981), a rafinose é armazenada nos órgãos de reserva, sendo utilizada como precursora para a síntese de outros oligossacarídeos ou ser hidrolisada por alfa-galactosidases. Camacho et al. (1992) observaram a redução de oligossacarídeos em sementes de várias espécies, explicada pelo aumento na atividade de alfa-galactosidase. Essa enzima está presente no embrião de sementes secas armazenadas e mantém atividade naquelas cuja germinação foi bloqueada (Feurtado et al., 2001). Os oligossacarídeos da família rafinósica são compostos por moléculas de sacarose ligadas a galactose (Buckeridge e Dietrich, 1996) e quando hidrolisados produzem sacarose e galactose livres nos tecidos (Cruz et al., 1981).

Percebe-se que os teores de glicose em ambos os métodos de envelhecimento, no eixo embrionário, elevam-se, enquanto o de galactose diminui no armazenamento e permanece estável no envelhecimento artificial. Provavelmente, a redução dos teores da galactose e da manose no eixo em sementes sob armazenamento tenha ocorrido pela formação de parede celular, pois estes monossacarídeos são utilizados como matéria prima na síntese de mananas e galactomananas estruturais ou estejam sendo eliminados para evitar possível efeito deletério. Borges et al. (2004) observaram que a galactose inibiu a atividade de α -galactosidase do eixo embrionário e do cotilédone em sementes de

Caesalpinia peltophoroides. O teor de manose e galactose em extratos de sementes das três subfamílias das leguminosas (Caesalpinoideae, Faboideae e Mimosoideae) também foram correlacionados à presença de galactomananas (Buckeridge e Dietrich, 1990).

Depreende-se que os oligossacarídeos estejam sendo usados para respiração e não para constituição de estruturas físicas, tendo em vista a manutenção ou não dos níveis de galactose, elemento fundamental nas paredes celulares. A confirmação da suposição baseia-se na redução no teor de manose no armazenamento e sua elevação no envelhecimento artificial. Assim, a estrutura básica da hemicelulose da parede fica comprometida para posterior crescimento quando em condições adequadas de germinação (tabelas 1 e 2, capítulo anterior).

Diversos autores correlacionam o decréscimo nos níveis de açúcares solúveis, açúcares totais, amido e acúmulo de açúcares redutores com a deterioração (Zeleny, 1954; McDonald, 1999; Braccini et al., 2001; Marcos Filho, 2005), acarretando em menor disponibilidade de substratos para a respiração, e provocando queda da germinação e vigor (Bernal-Lugo e Leopold, 1992; Locher e Bucheli, 1998; Marcos Filho, 2005).

Nas sementes de *Caesalpinia peltophoroides*, a grande quantidade de carboidratos solúveis observados foi atribuída não só ao fornecimento de energia para a germinação, mas também à maior armazenabilidade das sementes (Corte et al., 2006), pois é conhecido o papel dos açúcares solúveis na manutenção da integridade da estrutura das membranas e proteínas em condições de baixa umidade das sementes (Carpenter et al., 1987).

Os resultados trazem evidências de que, apesar do embrião da semente estar em estado latente, as suas atividades vitais não cessam inteiramente, provavelmente ficando na dependência das condições de umidade e temperatura do ambiente em que são armazenadas.

4. Conclusão

Os ácidos graxos não foram responsáveis pela deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna*.

A redução nos teores dos carboidratos solúveis é uma evidencia da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna*. Os resultados, quanto aos carboidratos, no envelhecimento artificial confirmaram os resultados obtidos pelo envelhecimento natural.

5. Referências Bibliográficas

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

BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GRZESIK, M.; GUY, P.; CÔME, D. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p. 161-169, 1996.

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

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

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

BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G.; BUCKERIDGE, M.S. Alterações nas composições de carboidratos e de ácidos graxos em sementes de jacarandá-da-bahia osmocondicionadas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, n. 1, p.10-16, 2000.

BORGES, E.E.L.; REZENDE, S.T. ; BORGES, R.C.G.; PEREZ, S.C.J.G.A. Caracterização de alfa-galactosidase e sua relação com a germinação das sementes de *Platymiscium pubecens* Michel, var. *pubecens* (tamboril da mata). **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.2, p.82-90, 2004.

BRACCINI, A. L.; BRACCINI, M.C.L.; SCAPIM, C.A. Mecanismos de deterioração das sementes: aspectos bioquímicos e fisiológicos. **Informativo ABRATES**, v.11,n.1,p.10-15, 2001.

BUCHERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. Galactomanans from Brazilian legume seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v.13, p.109-112, 1990.

BUCHERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. Mobilization of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). **Plant Science**, v.117, p.33-43, 1996.

BUCHERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P.; LIMA, D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n.12 (Edição especial), p.137-162, 2000.

CAMACHO, L.; SIERRA, C.; CAMPOS, R.; GUZMÁN, E.; MARCUS, E. Nutritional changes caused by germination of staple Chilean legumes. **Archivos Latinoamericano de Nutricion**, Caracas, v.42, n.3, p.283-290, 1992.

CAMARGO, M.L.P.; MORI, E.S.; MELLO, E.J.; ODA, S.; LIMA, G.P. Atividade enzimática em plântulas de *Eucalyptus grandis* provenientes de sementes envelhecidas artificialmente e naturalmente. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 113-122, 2000.

CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M.; CROWE, J.H. Stabilization of phosphofructokinase with sugar during freeze-drying. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.923, p.109-115, 1987.

CHIU, K.Y.; WANG, C.S.; SUNG, J.M. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging and hydration of watermelon seeds differing in ploidy. **Physiologia Plantarum**, v. 94, p. 441-446, 1995

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: Basra, A.S. (ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York, The Haworth Press Inc. p.223-277, 1995.

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.A.; VENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A.A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Árvore**. v.30, n.6, p.941-949, 2006.

CRUZ, R.; BATISTELA, J.C.; WOSLACKI, G. Microbial agalactosidase for soy milk processing. **Journal of Food Science**, Chicago, v.46, n.4, p.1126-1200, 1981.

DAS, G.; SEN-MANDI, S. Scutellar amilase activity in naturally aged and accelerated aged wheat seeds. **Annals of Botany**, London, v.69, n.6, p.497-501, June. 1992.

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.

DEY, P.M. Alpha-galactosidase from sweet chestnut seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v.20, p.1493-1496, 1981.

ENGLYST, H.N.; CUMMINGS, J.H. Simplified method for the measurement of non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugar as alditol acetates. **Analyst**, v. 109, p. 937-942, 1984.

FANAN, S. ; P.F. Medina ; T. C Lima ; J.M.Filho . Avaliação do vigor de sementes de trigo pelos testes de envelhecimento acelerado e de frio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, p. 152/2-158, 2006.

FEURTADO, J.A.; BANIK, M.; BEWLEY, J.D. The cloning and characterization of alpha-galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. **Journal of Experimental. Botany**, Oxford, v.52, n.359, p.1239- 249, 2001.

HALDER, S.; KOLE, S.; GUPTA, K. On the mechanism of sunflower seed deterioration under two different types of accelerated ageing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.11, 1983.

IBAMA – Lista oficial de Flora ameaçada de extinção – acesso em 18/10/2008. Site: [<http://www.ibama.gov.br/flora>].

KALPANA, R.; RAO, M. K.V. On the ageing mechanism in piogenpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) seeds. **Seed Science and Technology**. v. 23, p. 1-9, 1995.

LOCHER, R.; BUCHELI, P. Comparison of soluble sugar degradation in soybean seed under simulated tropical storage conditions. **Crop Science**, Madison, v.38, p.1229-1253, 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MARCOS-FILHO, J. Envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D. & CARVALHO, N.M. (eds.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, p.133-150,1994.

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

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1999.

StatSoft, Inc. Statistic (data analysis software system), Version 6. www.Stasolf.com. 2001.

SUSKO, D.J.; LOVETT-DOUST, L. Patterns of seed mass variation and their effects on seedling traits in *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). **American Journal of Botany**. V.87, p. 56-66. 2000.

PASSOS, L.P. **Growth and water status responses of mung bean (*Vigna mungo* L.) and other dicot species to osmotic stress**. Tucson: University of Arizona, 108 p., Thesis (Ph.D.) – University of Arizona, 1989.

PAULA, N.F. de **Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento**. Viçosa: UFV, 52p. (Dissertação de Mestrado), 1997.

SANTOS, S.R.G.; PAULA, R.C. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de lotes de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilho) – Euphorbiaceae. **Rev. Instituto Florestal**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2007.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos**. Viçosa, U.F.V., Imprensa Universitária, 165p., 1990.

THAPLIYAL, R C; CONNOR, K F. Effects of accelerated ageing on viability, leachate exudation, and fatty acid content of *Dalbergia sissoo* seeds. **International Seed Testing Association**. v.25, n. 2; p. 311-319, 1997.

TRAWATHA, D.E.; TEKRONY, D.M.; HILDEBRAND, D.F.; Soybean lipoxygenase mutants and seed longevity. **Crop Science**, Madison, v.35, p. 862-868, 1995.

VIEIRA, R.D.D. & CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 164p., 1994.

WETTLAUFER, D.H.; LEOPOLD, A.C. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. **Plant Physiology**, v.97, n.2, p.165-169, 1991.

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

ZELNY, L. Chemical physical and nutritive changes during storage. In: Anderson, J.A.; Alcock, A.W. **Storage of cereal grains and their products**. St Paul, Amer. Assoc. Cereal Chemists, p.46-76, 1954.

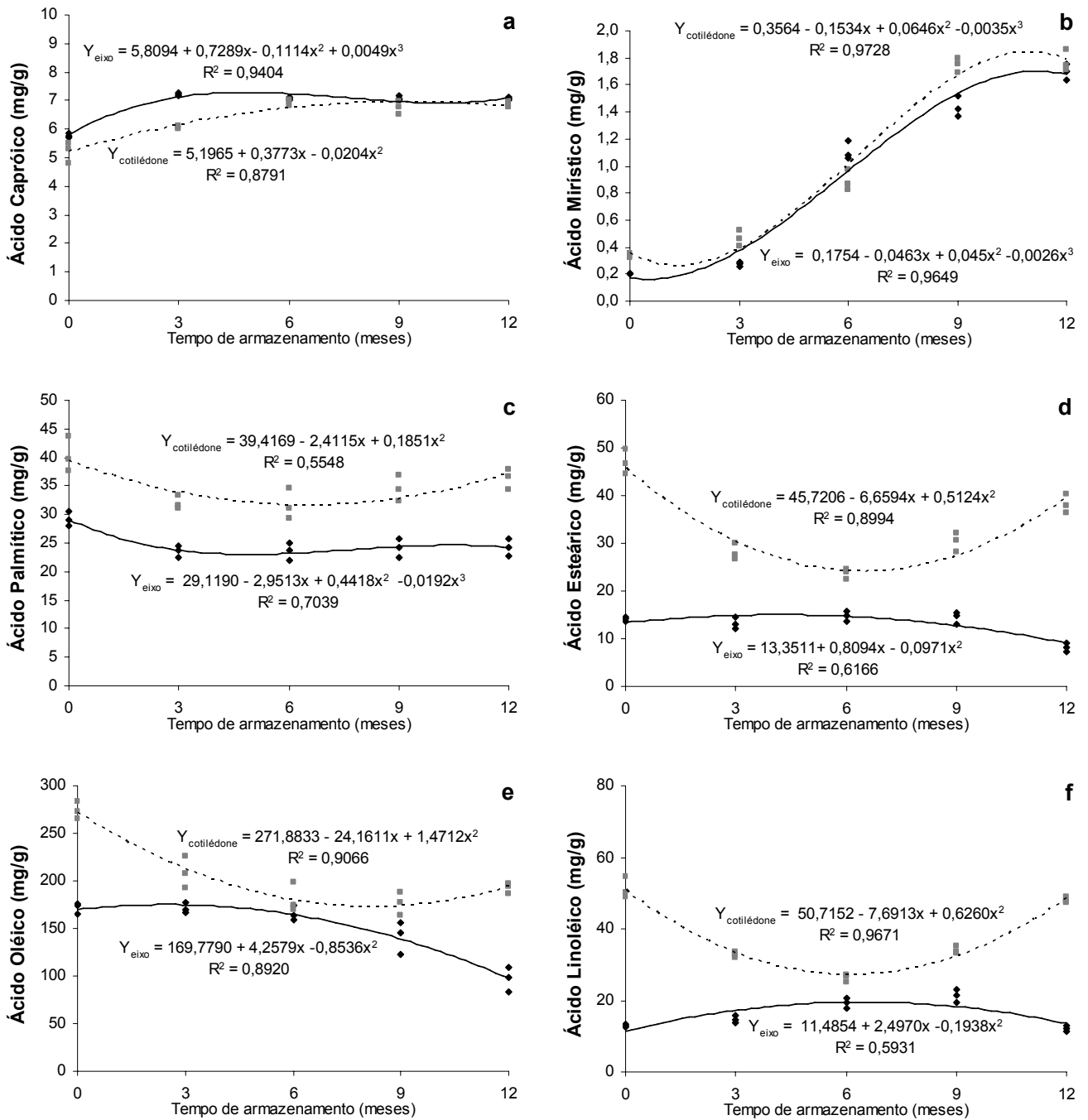


FIGURA 1 – Teor de ácidos graxos em sementes de *Melanoxyton brauna*, submetidas ao envelhecimento natural. —▪ eixo embrionário; ---- cotilédone.

Figure 1 – Fatty acids in *Melanoxyton brauna* seeds, submitted to the natural ageing. —▪ embryonic axe; ---- cotyledon.

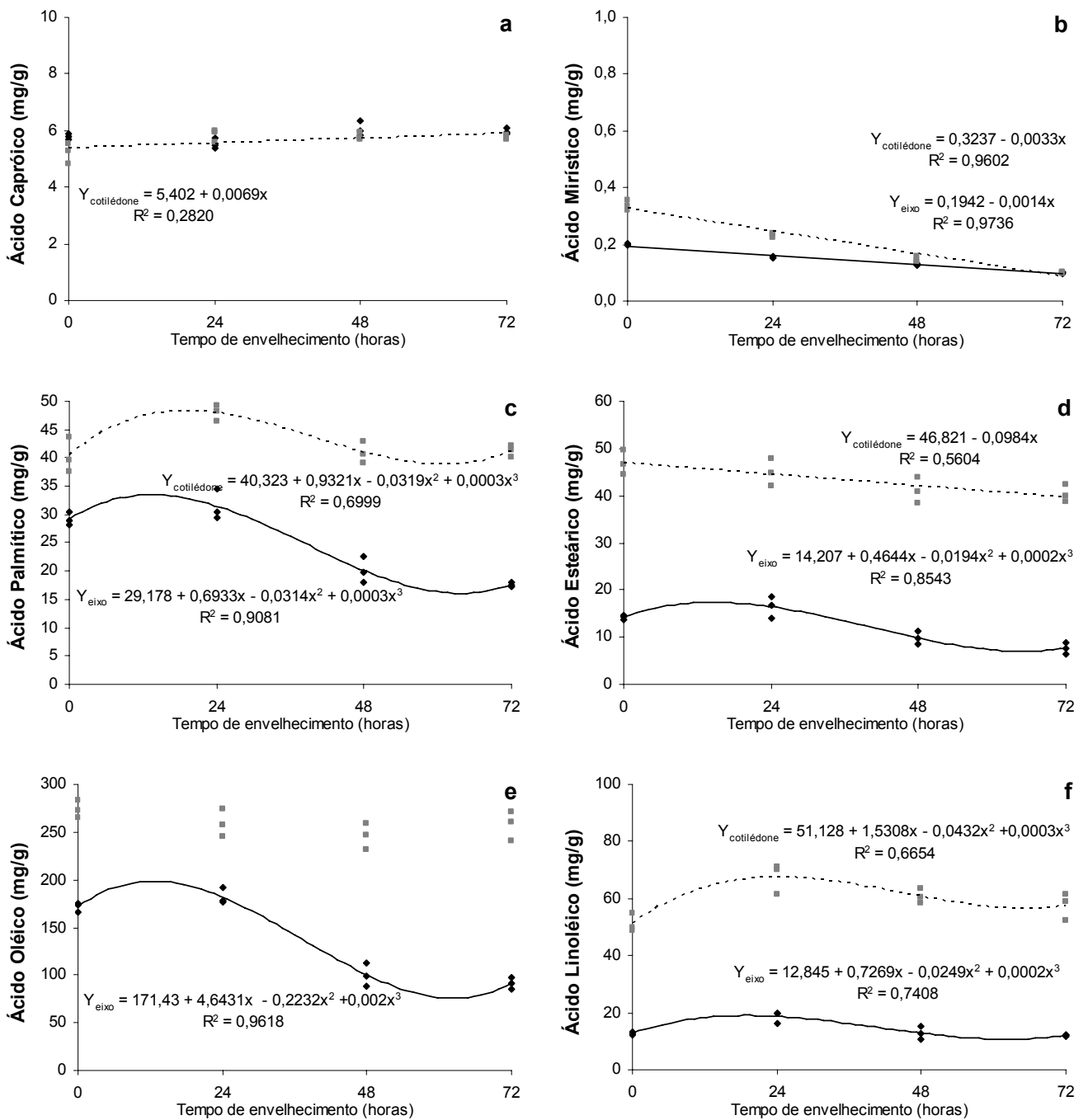


FIGURA 2 – Teor de ácidos graxos em sementes de *Melanoxylon brauna*, submetidas ao envelhecimento artificial. —■ eixo embrionário; ----■ cotilédone.

Figure 2 – Fatty acids in *Melanoxylon brauna* seeds, submitted to the artificial ageing. —■ embryonic axe; ----■ cotyledon.

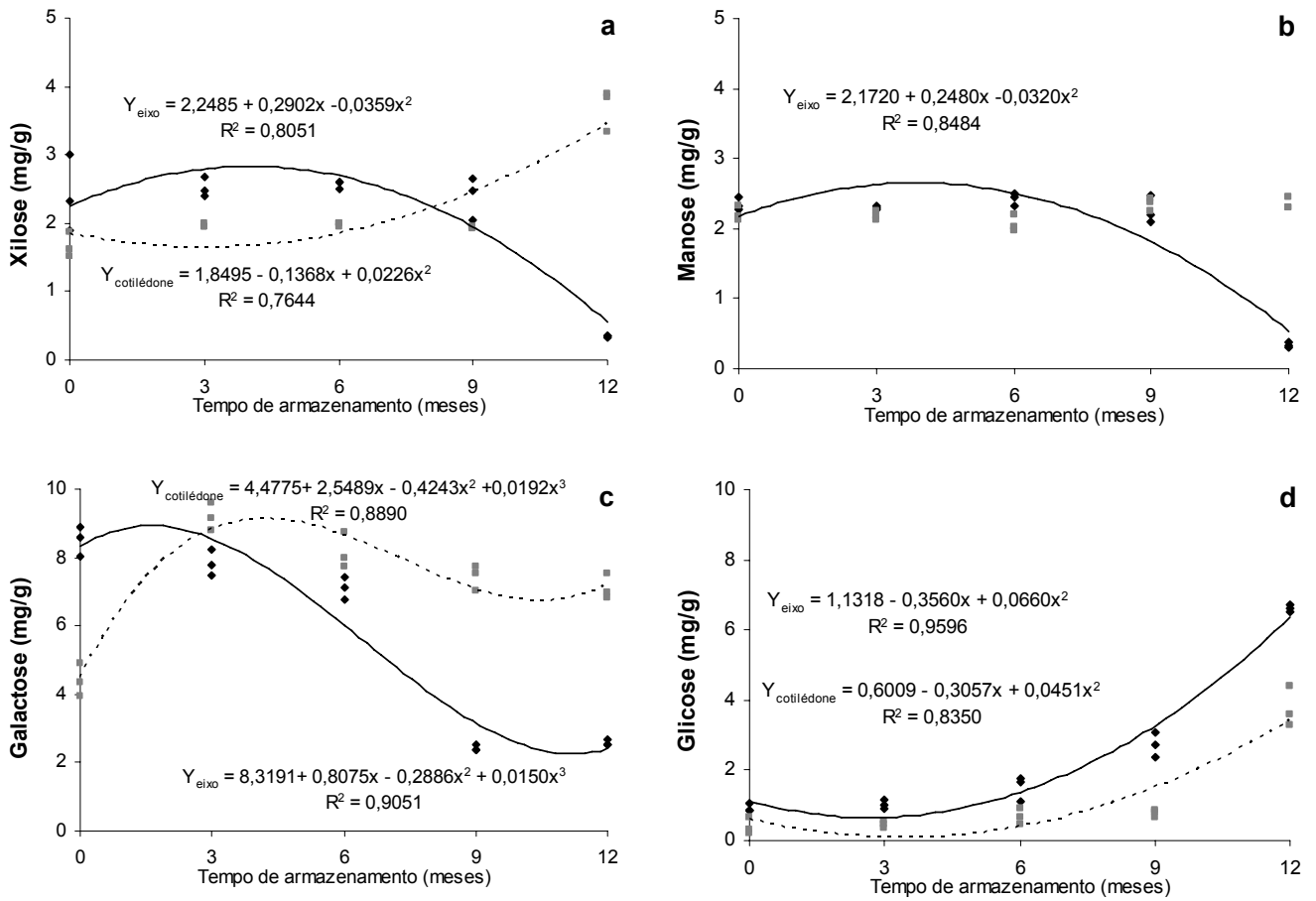


FIGURA 3 – Teor de monossacarídeos em sementes de *Melanoxyton brauna*, submetidas ao envelhecimento natural. —■ eixo embrionário; ----■ cotilédone.

Figure 3 – Monosaccharides in *Melanoxyton brauna* seeds, submitted to the natural ageing. —■ embryonic axe; ----■ cotyledon.

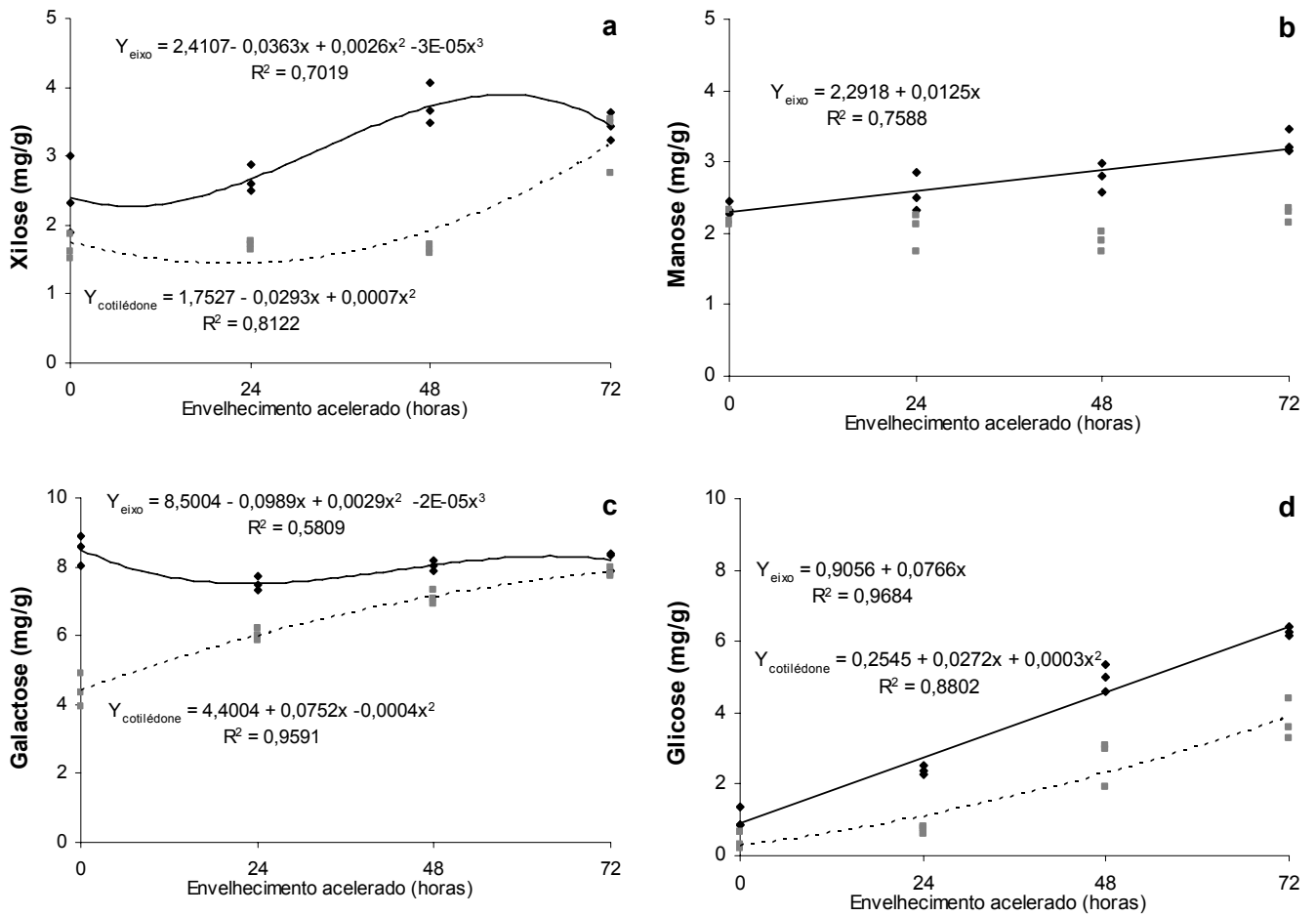


FIGURA 4 – Teor de monossacarídeos em sementes de *Melanoxyton brauna*, submetidas ao envelhecimento artificial. —■ eixo embrionário; ---- cotilédone.

Figure 4 – Monosaccharides in *Melanoxyton brauna* seeds, submitted to the accelerating ageing. —■ embryonic axe; ---- cotyledon.

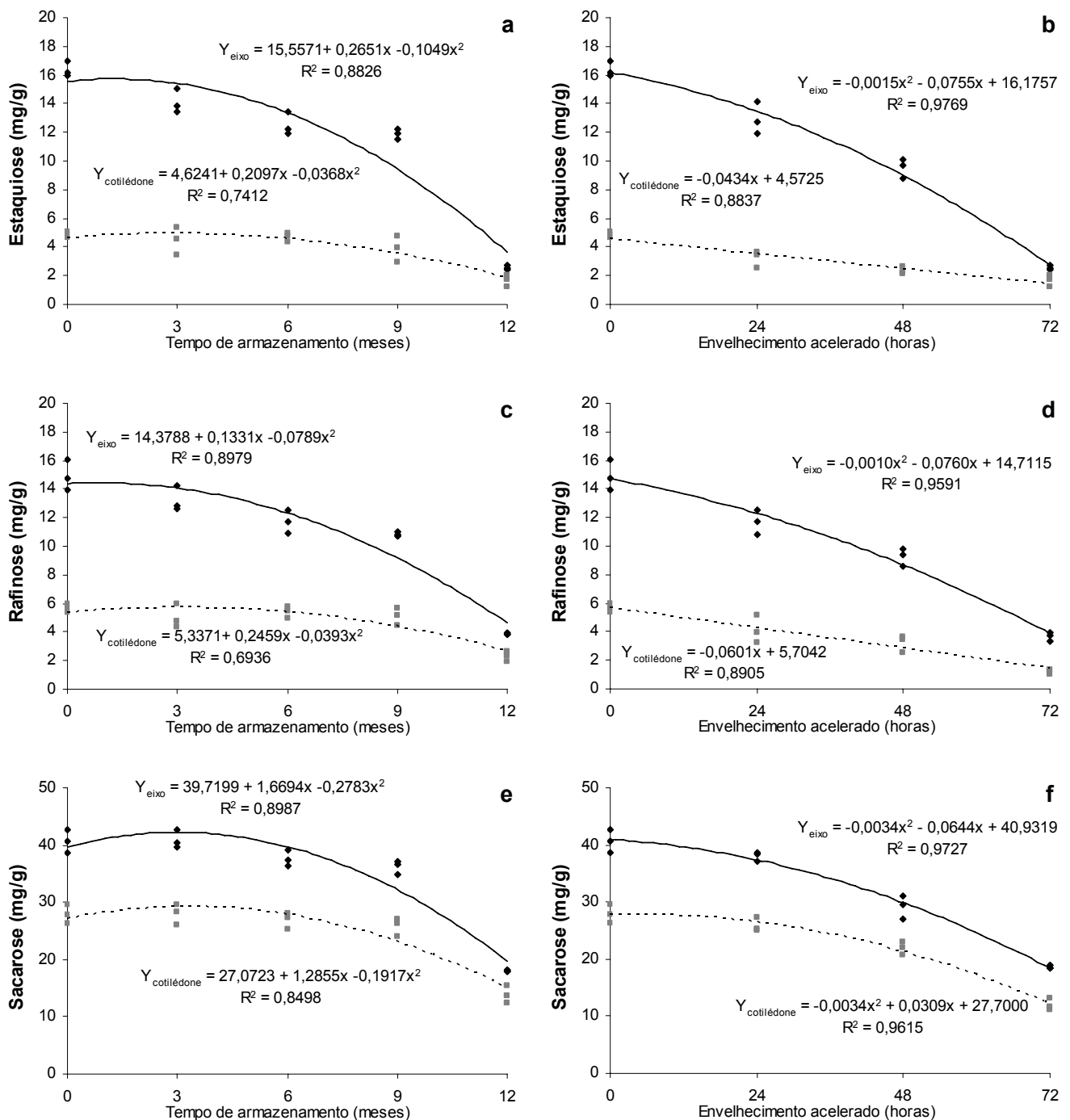


FIGURA 5 – Teor de oligossacarídeos em sementes de *Melanoxyton brauna*, submetidas ao envelhecimento natural e artificial. —▪ eixo embrionário; ---▪ cotilédone.

Figure 5 – Oligosaccharides in *Melanoxyton brauna* seeds, submitted to the natural and artificial ageing. —▪ embryonic axe; ---▪ cotyledon.