



JOSE CARLOS LOPES

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo candidato José Carlos
Lopes e aprovada pela comissão julgadora

Campinas, 13 de agosto de 1990.
Rosely Rode Shaif.

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *PHASEOLUS VULGARIS*
APÓS DIVERSOS PERÍODOS E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

CAMPINAS

1990

L881g
12288/BC

JOSE CARLOS LOPES

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *PHASEOLUS VULGARIS*
APÓS DIVERSOS PERÍODOS E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Orientador: Dra. Rosely Rocha Sharif

CAMPINAS

1990

Homenagem

Aos meus pais, irmãos,
sogros e cunhados

Dedicatória

À minha esposa Maria Aída
e filhas Simone e Liliane

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Rosely Rocha Sharif, pelo apoio, estímulo e orientação deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos, especialmente aos professores Dr. Ivany Ferreira Marques Válio e Dr. Ladaslav Sodek pelos conhecimentos transmitidos e valiosas sugestões e esclarecimentos prestados.

Aos professores Dr. Benedicto de Campos Vidal e Dr. Ângelo Luiz Cortelazzo do Departamento de Biologia Celular pela orientação, sugestões e auxílios nos trabalhos de topoquímica e citoquímica.

À Seção de Fitoquímica e Laboratório de Sementes do Instituto Agronômico de Campinas e aos colegas Eng. Agr. João Paulo Feijão Teixeira e Jocely Andreuccetti Maeda e demais funcionários pela cocessão de aparelhos e auxílios nas análises de óleos, ácidos graxos e envelhecimento precoce das sementes.

Ao Centro Agropecuário da UFES pela cocessão de afastamento e suporte para realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Departamento de Fisiologia Vegetal, pelo apoio e ensinamentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PICD/UFES), pelo apoio financeiro e concessão de bolsa.

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal, Biologia Celular e Botânica pelo incentivo, amizade e auxílios prestados na realização deste trabalho.

De modo especial agradeço à minha esposa Maria Aída de Oliveira Lopes e minhas filhas Simone de Oliveira Lopes e Liliane de Oliveira Lopes pela compreensão, incentivo e, sobretudo, pelo apoio irrestrito durante toda a condução deste trabalho.

Finalmente o autor agradece a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xv
INTRODUÇÃO.....	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
1 . MATERIAL BIOLÓGICO.....	32
2 . TESTES PARA A CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DAS SEMENTES....	33
2.1 . Determinação do conteúdo de cinzas.....	33
2.2 . Determinação do teor de umidade das sementes.....	33
2.3 . Peso de mil sementes.....	34
2.4 . Curva de embebição das sementes.....	34
2.5 . Teste de respiração - Consumo de O_2	35
2.6 . Teste topográfico de tetrazólio.....	36
2.7 . Extrações bioquímicas.....	37
2.7.1. Material.....	37
2.7.2. Aminoácidos livres e açúcares solúveis totais	37
2.7.3. Proteínas.....	38
2.7.4. Polissacarídeos solúveis em água (WSP) e amido.....	38
2.7.5. óleos.....	41

2.8 . Dosagens bioquímicas.....	41
2.8.1. Açúcares solúveis totais e polissacarídeos solúveis em água (WSP).....	41
2.8.2. Amido.....	42
2.8.3. Aminoácidos livres.....	42
2.8.4. Proteínas.....	43
2.8.5. Determinação do conteúdo de óleo.....	44
2.8.6. Ácidos graxos totais.....	44
2.8.7. Ácidos graxos livres.....	45
2.8.8. Peróxidos.....	46
2.9 . Determinação da curva espectral da água de lava- gem.....	46
2.10. Análise da água de lavagem das sementes.....	47
3 . <i>TESTES ENVOLVENDO GERMINAÇÃO E VIGOR DAS SEMENTES</i>	47
3.1 . Testes de germinação e vigor realizados em placas de petri	47
3.1.1. Efeito da temperatura.....	48
3.1.2. Efeito da luz branca.....	48
3.1.3. Efeito da luz vermelha e do vermelho ex- tremo.....	49
3.2 . Testes de germinação e vigor realizados em rolo de papel.....	49
3.2.1. Avaliação de plântulas normais com 5 e 9 dias após a semeadura.....	49

3.2.2. Comprimento de radícula de plântulas após 4 dias.....	50
3.2.3. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 8 dias	51
3.3 . Testes de germinação e vigor realizados em caixas contendo vermiculita em casa de vegetação.....	51
3.3.1. índice de velocidade de emergência.....	51
3.3.2. população final após 14 dias.....	52
3.3.3. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 14 dias	52
3.4 . Estudo da distribuição da massa de matéria seca em eixos e cotilédones com zero, 12 e 24 meses de armazenamento.....	53
3.5 . Mudança no teor relativo de água.....	53
3.6 . Determinação da época de mudança do estadio de de plântula para planta.....	54
3.7 . Tratamento com temperatura e umidade relativa altas.....	55
4 . TESTES REALIZADOS "IN SITU".....	55
4.1 . Preparação de cortes histológicos.....	55
4.1.1. Fixação.....	56
4.1.2. Inclusão e corte.....	56
4.1.3. Métodos de coloração.....	57
Hematoxilina-eosina (HE).....	57
Xylidine Ponceau (XP).....	57

Azul de toluidina (AT).....	58
4.2 . Análise do material.....	58
5 . <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	58
<i>RESULTADOS</i>	60
1 . Composição das sementes.....	60
2 . Conteúdo de cinzas nas sementes.....	60
3 . Umidade das sementes.....	63
4 . Peso de mil sementes.....	63
5 . Curva de embebição.....	66
6 . Estudo da distribuição da massa de matéria seca em eixos e cotilédones com zero, 12 e 24 meses de armazenamento.....	69
7 . Determinação da idade em que o eixo passa a utilizar nutrientes do substrato.....	69
8 . Germinação e vigor.....	74
8.1. Protrusão de radícula após 1 dia sob diferentes regimes de luz.....	74
8.2. Protrusão de radícula após 3 dias sob diferentes regimes de luz.....	75
8.3. Germinação de sementes após 5 dias.....	78
8.4. Germinação de sementes após 9 dias.....	78
8.5. Velocidade de emergência	79
8.6. População final após 14 dias.....	81
8.7. Comprimento de radícula de plântulas após 4 dias..	81

8.8. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 8 dias.....	83
8.9. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 14 dias.....	84
9. Teste topográfico de tetrazólio.....	86
10. Atividades respiratórias - Consumo de O_2	86
11. Análise de água de lavagem das sementes.....	90
11.1. Curva espectral da água de lavagem.....	90
11.2. Efluxo de eletrólitos.....	90
11.3. Aminoácidos livres.....	93
11.4. Carboidratos solúveis em água.....	93
12. Determinações bioquímicas.....	95
12.1. Aminoácidos livres.....	95
12.2. Açúcares solúveis totais.....	103
12.3. Proteínas.....	111
12.4. Polissacarídeos solúveis em água (WSP).....	115
12.5. Amido.....	121
12.6. Lipídios.....	126
12.7. Ácidos graxos totais.....	129
12.8. Ácidos graxos livres.....	131
12.9. Peróxidos.....	135
13. Efeito da mudança no teor relativo de água.....	138
13.1. Protrusão de radícula após 1 dia.....	138
13.2. Protrusão de radícula após 3 dias.....	139

14. Efeito do tratamento com temperatura e umidade relativa altas.....	141
14.1. Germinação e vigor.....	141
14.1.1. Protrusão da radícula após 1 dia.....	141
14.1.2. Protrusão da radícula após 3 dias.....	143
14.1.3. Germinação de sementes após 5 dias.....	143
14.1.4. Germinação de sementes após 9 dias.....	144
14.1.5. Velocidade de emergência.....	146
14.1.6. População final após 14 dias.....	148
14.1.7. Comprimento da radícula de plântulas após 4 dias.....	148
14.1.8. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 8 dias.....	150
14.1.9. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 14 dias.....	151
14.2. Determinações bioquímicas.....	153
14.2.1. Aminoácidos livres.....	153
14.2.2. Açúcares solúveis totais.....	155
14.2.3. Proteínas.....	157
14.2.4. Polissacarídeos solúveis em água (WSP)...	157
14.2.5. Amido.....	159
15. Estudos topoquímicos e citoquímicos.....	162
15.1. Cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE)...	162
15.2. Cortes corados pelo xylydine Ponceau (XP).....	163
15.3. Cortes corados pelo azul de toluidina (AT).....	166

15.4. Microscopia de polarização.....	169
<i>DISCUSSÃO</i>	174
<i>CONCLUSÕES</i>	197
<i>RESUMO</i>	199
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	203
<i>APÊNDICE</i>	237

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 .	Curva de embebição (porcentagem do aumento do peso) de sementes do lote 2 antes da estocagem.....	67
FIGURA 2 .	Curva de embebição (porcentagem do aumento do peso) de sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2) e de sementes do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural (48AN1).....	68
FIGURA 3 .	Conteúdo da massa de matéria seca (mg) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por 0, 12 e 24 meses, após 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas do início da embebição. A. Antes da estocagem. B. Estocadas por 12 meses. C. Estocadas por 24 meses.....	70
FIGURA 4 .	Conteúdo de massa de matéria seca em eixos e cotilédones oriundos de sementes do lote 2 antes da estocagem.....	71
FIGURA 5 .	Conteúdo de massa de matéria seca em eixos e cotilédones oriundos de sementes estocadas em câmara fria e em ambiente natural por 24 meses. A. Sementes tratadas com água. B. Sementes tratadas com Hoagland.....	73
FIGURA 6 .	Protrusão de radícula ($\arcsin \sqrt{P}$), em sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, após 1 e 3 dias da semeadura. A. Luz branca. B. Escuro. C. Vermelho. D. Vermelho-extremo.....	76
FIGURA 7 .	Germinação ($\arcsin \sqrt{P}$) de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, após 5 e 9 dias da semeadura.....	80
FIGURA 8 .	Índice de velocidade de emergência de plântulas em casa de vegetação, oriundas de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos.....	80
FIGURA 9 .	População final ($\arcsin \sqrt{P}$) de plântulas oriundas de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos.....	82

FIGURA 10. Comprimento de radícula (mm) de plântulas oriundas de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, após 4 dias da semeadura.....	82
FIGURA 11. Peso da massa de matéria seca (mg/plântula) de plântulas oriundas de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, após 8 dias da semeadura.....	85
FIGURA 12. Peso da massa de matéria seca (mg/plântula) de plântulas oriundas de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, após 14 dias da semeadura.....	85
FIGURA 13. Coloração de partes vivas de sementes com o sal cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio.....	88
FIGURA 14. Volume de O_2 (μ l/2 sementes) absorvido por sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos durante 120 minutos.....	89
FIGURA 15. Determinação da absorbância da água de lavagem de sementes do lote 2 recém-colhidas, entre 230 e 530 nm, após 30 minutos de embebição.....	91
FIGURA 16. Análise da água de lavagem de sementes recém-colhidas, estocadas por 6 meses em câmara fria (6CF2) e em ambiente natural (6AN2) e de sementes estocadas por 30 meses em ambiente natural (30AN1) feita em comprimento de ondas a 264 nm.....	91
FIGURA 17. Efluxo de eletrólitos de sementes (μ S) na água de lavagem de sementes recém-colhidas (N5), de sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2) e sementes estocadas por 48 meses em ambiente natural (48AN1). A. Sementes embebidas por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. B. Sementes embebidas por 1/2, 1, 4 e 12 horas...	92
FIGURA 18. Conteúdo de aminoácidos livres (nmoles/semente) na água de embebição de sementes recém-colhidas (N5), de sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2) e sementes estocadas por 48 meses em ambiente natural (48AN1). A. Sementes embebidas por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. B. Sementes embebidas por 1/2, 1, 4 e 12 horas.....	94

- FIGURA 19. Conteúdo de carboidratos solúveis ($\mu\text{g}/\text{semente}$) na água de embebição de sementes recém-colhidas (N5), de sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2) e sementes estocadas por 48 meses em ambiente natural (48AN1). A. Sementes embebidas por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. B. Sementes embebidas por 1/2, 1, 4 e 12 horas..... 96
- FIGURA 20. Conteúdo de aminoácidos ($\mu\text{moles}/\text{semente}$) em cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embeber..... 100
- FIGURA 21. Conteúdo de aminoácidos ($\mu\text{moles}/\text{semente}$) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e ambiente natural (24AN2) e do lote 1 por 48 meses em ambiente natural (48AN1), sem embeber e após 6, 12, 18 e 24 horas de embebição. A. Eixos. B. Cotilédones..... 102
- FIGURA 22. Conteúdo de aminoácidos ($\mu\text{moles}/\text{semente}$) em eixos e cotilédones de sementes, estocadas em câmara fria (CF2) e ambiente natural (AN2), 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o início da embebição. A. Sementes estocadas por 18 meses. B. Sementes estocadas por 21 meses..... 104
- FIGURA 23. Conteúdo de açúcares solúveis totais ($\text{mg}/\text{semente}$) em cotilédones de sementes, estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embeber..... 107
- FIGURA 24. Conteúdo de açúcares solúveis totais ($\text{mg}/\text{semente}$) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e ambiente natural (24AN2) e do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural (48AN1), sem embeber e após 6, 12, 18 e 24 horas de embebição. A. Eixos. B. Cotilédones..... 109
- FIGURA 25. Conteúdo de açúcares solúveis totais ($\text{mg}/\text{semente}$) em eixos e cotilédones de sementes, estocadas em câmara fria (CF2) e em ambiente natural (AN2), 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o início da embebição. A. Sementes estocadas por 18 meses. B. Sementes estocadas por 21 meses..... 110
- FIGURA 26. Conteúdo de proteínas ($\text{mg}/\text{semente}$) em cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embeber..... 114

- FIGURA 27. Conteúdo de proteínas (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes, estocadas em câmara fria (CF2) e em ambiente natural (AN2), 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o início da embebição. A. Sementes estocadas por 18 meses. B. Sementes estocadas por 21 meses..... 116
- FIGURA 28. Conteúdo de polissacarídeos solúveis em água -WSP- (mg/semente) em cotilédones de sementes, estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embeber..... 118
- FIGURA 29. Conteúdo de polissacarídeos solúveis em água -WSP- (mg/semente) em sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e ambiente natural (24AN2) e do lote 1 por 48 meses em ambiente natural (48AN1), sem embeber e após 6, 12, 18 e 24 horas de embebição. A. Eixos. B. Cotilédones..... 120
- FIGURA 30. Conteúdo de amido (mg/semente) em cotilédones de sementes, estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embeber..... 124
- FIGURA 31. Conteúdo de amido (mg/semente) em sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e ambiente natural (24AN2) e do lote 1 por 48 meses em ambiente natural (48AN1), sem embeber, após 6, 12, 18 e 24 hora de embebição. A. Eixos. B. Cotilédones..... 125
- FIGURA 32. Conteúdo de lipídios (mg/semente) em sementes do lote 2 inteiras e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e ambiente natural (24AN2) e do lote 1 por 48 meses em ambiente natural (48AN1)..... 127
- FIGURA 33. Conteúdo de lipídios (mg/semente) em sementes do lote 2 estocadas por 34 meses em câmara fria (34CF2) e ambiente natural (34AN2) e do lote 1 por 58 meses em ambiente natural (58AN1), sem embeber e com 24 horas de embebição. A. Eixos. B. Cotilédones..... 128
- FIGURA 34. Efeitos do teor relativo de água na protrusão de radícula ($\text{arco seno}\sqrt{P}$) em sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos. A. Após 1 dia da semeadura. B. Após 3 dias da semeadura..... 140

- FIGURA 35. Protrusão de radícula (arco seno $\sqrt{P}$) em sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas. A. após 1 dia da semeadura. B. Após 3 dias da semeadura..... 142
- FIGURA 36. Germinação (arco seno $\sqrt{P}$) de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas. A. Após 5 dias da semeadura. B. Após 9 dias da semeadura..... 145
- FIGURA 37. Plântulas anormais e sementes deterioradas (arco seno $\sqrt{P}$) oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas, após 9 dias da semeadura. A. Plântulas anormais. B. Sementes deterioradas..... 147
- FIGURA 38. Índice de velocidade de emergência de plântulas oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas..... 149
- FIGURA 39. População final (arco seno $\sqrt{P}$) de plântulas oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas, após 14 dias da semeadura..... 149
- FIGURA 40. Comprimento de radícula (mm) de plântulas oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas, após 4 dias da semeadura..... 152
- FIGURA 41. Peso da massa de matéria seca (mg/plântula) de plântulas oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas, após 8 dias da semeadura..... 152

- FIGURA 42. Peso da massa de matéria seca (mg/plântula) de plântulas oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas, após 14 dias da semeadura..... 152
- FIGURA 43. Conteúdo de aminoácidos (μ moles/semente) em sementes recém-colhidas (N5) e em sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas. A. Eixos. B. Cotilédones..... 154
- FIGURA 44. Conteúdo de açúcares solúveis (mg/semente) em sementes recém-colhidas (N5) e em sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas. A. Eixos. B. Cotilédones..... 156
- FIGURA 45. Conteúdo de proteínas (mg/semente) em sementes recém-colhidas (N5) e em sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas. A. Eixos. B. Cotilédones..... 158
- FIGURA 46. Conteúdo de polissacarídeos solúveis em água -WSP- (mg/semente) em sementes recém-colhidas (N5) e em sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas. A. Eixos. B. Cotilédones..... 160
- FIGURA 47. Conteúdo de amido (mg/semente) em sementes recém-colhidas (N5) e em sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas. A. Eixos. B. Cotilédones..... 161
- FIGURAS 48-51. Cortes de cotilédones de sementes sem embebição, corados pela hematoxilina-eosina. As paredes celulares são coradas pela hematoxilina e o conteúdo citoplasmático apresenta grânulos não corados e material hematoxilina e eosina positivos. Aumento: 580 X..... 164

- FIGURA 52. Corte de eixo embrionário de semente sem embebição, estocada em câmara fria por 21 meses, corado pelo xylidine Ponceau a pH 2,5..... 165
- FIGURAS 53-56. Cortes de cotilédones sem embebição, corados pelo xylidine Ponceau a pH 2,5 para proteínas. As paredes celulares praticamente não se coram por esse método. Aumento: 580 e 2310 X..... 167
- FIGURAS 57-58. Cortes de cotilédones embebidos por 24 horas e corados pelo xylidine Ponceau a pH 2,5 para proteínas. Aumento: 580 X..... 168
- FIGURAS 59-60. Cortes de eixos embrionários de sementes sem embebição corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. Nota-se núcleos e nucléolos corados, além da parede celular, metacromática. Aumento: 1850 X 169
- FIGURAS 61-62. Cortes de cotilédones sem embebição, corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. Notam-se evidenciadas as paredes celulares que apresentam metacromasia e o material proteico corado ortocromáticamente. Aumento: 580 X..... 170
- FIGURA 63. Corte de cotilédone de semente estocada em câmara fria por 21 meses e corado pelo azul de toluidina. Aumento: 1850 X 171
- FIGURA 64. Corte de eixo embrionário de semente estocada em câmara fria por 21 meses, submetido a análise em microscópio de polarização com analisador e polarizador cruzados. Aumento: 380 X..... 171
- FIGURAS 65-66. Cortes de cotilédones submetidos a análise em microscópio de polarização. Aumento 380 X..... 172
- APÊNDICE:**
- FIGURA 1. Cromatografia gasosa dos ácidos graxos componentes do óleo de eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas por 34 meses em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas por 58 meses em ambiente natural, sem embeber e após embebição por 24 horas. As setas indicam picos que são mostrados nas Tabelas 13 e 14..... 238

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição de eixos e cotilédones de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> do lote 2, após 34 meses de armazenamento em câmara fria.....	61
TABELA 2	Conteúdo de cinzas (mg/semente) em sementes inteiras e eixos e cotilédones isolados de sementes recém-colhidas (N6), do lote 2 estocadas por 34 meses em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas por 58 meses em ambiente natural, sem embeber e após 24 horas de embebição...	62
TABELA 3	Níveis de umidade de sementes do lote 2 estocadas em Campinas em câmara fria (CF) e em ambiente natural (AN) por 36 meses.....	64
TABELA 4	Peso de mil sementes determinado imediatamente após a colheita e redução do teor de umidade a cerca de 14%.....	65
TABELA 5	Porcentagem de sementes agrupadas por classe de acordo com o grau de coloração com o sal cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio.....	87
TABELA 6	Conteúdo de aminoácidos (μ moles/semente) em sementes recém-colhidas, sem embebição.....	98
TABELA 7	Conteúdo de aminoácidos (μ moles/semente) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.....	99
TABELA 8	Conteúdo de açúcares solúveis (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.....	106
TABELA 9	Conteúdo de proteínas (mg/semente) em sementes recém colhidas, sem embebição.....	112
TABELA 10	Conteúdo de proteínas (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.....	113
TABELA 11	Conteúdo de polissacarídeos solúveis em água - WSP (mg/semente), em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.....	117

TABELA 12.	Conteúdo de amido (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.....	123
TABELA 13.	Conteúdo de ácidos graxos totais (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.....	130
TABELA 14.	Conteúdo de ácidos graxos livres (%) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.....	133
TABELA 15.	Conteúdo de óleo e índice de peróxido em sementes inteiras, com diferentes períodos de armazenamento.....	136
TABELA 16.	Índice de peróxidos (neq./semente) em eixos e cotilédones de sementes sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.....	137

APÊNDICE:

TABELA 1.	Dados meteorológicos de Alegre durante o período de condução do trabalho - temperatura.....	239
TABELA 2.	Dados meteorológicos de Alegre durante o período de condução do trabalho - umidade relativa.....	240
TABELA 3.	Dados meteorológicos de Campinas durante a condução do trabalho - temperatura.....	241
TABELA 4.	Dados meteorológicos de Campinas durante a condução do trabalho - umidade relativa.....	242
TABELA 5.	Dados meteorológicos de Campinas durante a condução do trabalho - precipitação pluviométrica e insolação.....	243
TABELA 6.	Níveis de umidade na semente para estudo do efeito da mudança no teor relativo de água na germinação.....	244
TABELA 7.	Protrusão de radícula de sementes do lote 2 estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, com diferentes níveis de umidade, após 1 dia da semeadura.....	245

TABELA 8.	Protrusão de radícula de sementes do lote 2 estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, com diferentes níveis de umidade, após 3 dias da semeadura.....	246
TABELA 9.	Conteúdo de massa de matéria seca (mg/órgão) em sementes do lote 2, recém-colhidas.....	247
TABELA 10.	Conteúdo de massa de matéria seca (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas em ambiente natural, por diferentes períodos, sem embeber e após 24 horas de embebição, utilizadas para determinação de proteínas, aminoácidos e açúcares solúveis.....	248
TABELA 11.	Conteúdo de massa de matéria seca (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas em ambiente natural, por diferentes períodos, sem embeber e após 24 horas de embebição, utilizadas para determinação de polissacarídeos solúveis em água e amido.....	249
TABELA 12.	Conteúdo de massa de matéria seca (mg/semente) em sementes do lote 2, estocadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural, e do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural, utilizadas para determinação do conteúdo de óleo e índice de peróxidos.....	250
TABELA 13.	Conteúdo de massa de matéria seca (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas por 34 meses em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas por 58 meses em ambiente natural, sem embeber e após 24 horas de embebição, utilizadas para determinação de ácidos graxos e índice de peróxidos.....	251
TABELA 14.	Conteúdo de massa de matéria seca (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural, sem embeber e após 0, 6, 12, 18 e 24 horas de embebição, utilizadas para determinação de aminoácidos, açúcares solúveis e proteínas.....	252

- TABELA 15. Conteúdo de massa de matéria seca (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural, sem embeber e após 0, 6, 12, 18 e 24 horas de embebição, utilizadas para determinação de polissacarídeos solúveis em água e amidos..... 253
- TABELA 16. Conteúdo de massa de matéria seca (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural, após 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos e 1, 4 e 12 horas de embebição, utilizadas na determinação de aminoácidos, carboidratos solúveis em água e efluxo de eletrólitos..... 254

INTRODUÇÃO

A semente, entre outros insumos agrícolas, desempenha um papel muito importante na agricultura moderna. É fundamental para o plantio que ela seja de boa qualidade, tendo-se em vista o aumento de produtividade durante o processo de multiplicação.

A qualidade da semente durante o período de sua existência é afetada pelas condições em que são preservadas. Quando são mantidas sob condições controladas de umidade e de temperatura, que são considerados como sendo os principais fatores que determinam a redução parcial ou total da sua viabilidade, há uma redução nos processos metabólicos, conduzindo a uma melhor manutenção da capacidade germinativa e do vigor.

Muitas sementes podem manter-se quiescentes por muitos anos no estado desidratado mas, quando reidratadas elas prontamente retornam as suas funções celulares normais (SIMON, 1974). A passagem do estado quiescente para o estado dinâmico, caracterizado como germinação, determina um rápido aumento no metabolismo, onde as reservas de lipídios, carboidratos e proteínas são hidrolisadas e os produtos utilizados pelo eixo embrionário para síntese do protoplasma, componentes estruturais e subsequente crescimento (ASHTON, 1976).

Devido à sua alta capacidade higroscópica, a semente apresenta grandes oscilações no seu conteúdo de umidade quando em contacto com ambiente de alta umidade relativa, principalmente se

a temperatura do ambiente for elevada. O aumento de umidade da semente no armazém acelera os processos metabólicos, os quais vão promover trocas bioquímicas e fisiológicas na mesma acelerando a deterioração, que é normalmente manifestada pela perda de vigor e baixa capacidade germinativa.

Os efeitos negativos do teor de umidade elevado podem ser minimizados desde que o ambiente de conservação apresente baixa temperatura. Assim, quando as sementes apresentam baixo teor de umidade podem ser conservadas em ambientes com temperaturas mais elevadas.

Muitas teorias tem tentado explicar o envelhecimento da semente, destacando-se principalmente aquelas que envolvem fatores externos como irradiação e ataque de fungos ou fatores internos como acumulação de compostos tóxicos, perdas de vitaminas e hormônios, degradação de ácidos nucleicos, proteínas ou membranas (PRIESTLEY, 1986) e peroxidação de lipídios durante o envelhecimento (WILSON & McDONALD, 1986).

Vários trabalhos foram desenvolvidos na área de armazenamento de sementes, principalmente sobre aquelas de plantas cultivadas.

A semente de feijão, quando armazenada sob condições adversas de temperatura e umidade, apresenta grande susceptibilidade a uma rápida redução no seu vigor e capacidade germinativa e perda de suas propriedades organolépticas. Na época da colheita, ela apresenta um conteúdo de umidade alto, em torno de 15%, o que determina uma alta atividade respiratória. Para o seu arma-

zenamento por período de tempo prolongado, há necessidade de secagem.

A maneira como o feijão é colhido atualmente determina seu envelhecimento com uma certa facilidade e provoca perda de seu valor comercial em um período de tempo relativamente curto. É necessário portanto, que o teor de umidade da semente antes do armazenamento seja reduzido a um nível adequado à sua preservação. Por isso, no menor espaço de tempo possível após a colheita, é recomendável que elas sejam beneficiadas, fumigadas e armazenadas convenientemente para sua melhor preservação.

O Programa de Produção de Sementes Básicas promove a ligação entre a pesquisa e a área de produção. Os reflexos da eficiência do sistema de produção são traduzidos pela taxa de utilização de sementes selecionadas. Entretanto, os agricultores apresentam certa resistência ao uso de sementes comercializadas por falta de divulgação de resultados obtidos pela pesquisa, desconhecimento das vantagens do uso de sementes de alta qualidade e das condições técnicas que permitem a sua conservação durante o armazenamento a nível de propriedade rural.

De acordo com TOOLE (1973), as sementes de feijão conservam-se bem com 11 % de umidade em ambiente de 21°C. Entretanto, se a temperatura se elevar a 26,5°C, a umidade da mesma deverá baixar a 8 % para que haja uma boa conservação da semente.

O tipo de embalagem a ser utilizado no armazenamento dependerá basicamente do grau de umidade das sementes, condições do ambiente e período em que serão estocadas.

Embora não seja possível melhorar a qualidade da semente durante o período de armazenamento, sua velocidade de deterioração pode ser controlada através do manejo conveniente após a maturidade fisiológica. Torna-se portanto importante aprimorar os conhecimentos básicos sobre a fisiologia e a influência dos fatores que afetam o seu comportamento antes e após o período de conservação, conhecer e identificar as alterações químicas e um processo respiratório intensivo que provoca aquecimento e consumo de reservas.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos, caracterizar as sementes de *Phaseolus vulgaris* recém-colhidas ou após diversos períodos e condições de armazenamento, bem como verificar as alterações bioquímicas, topoquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o envelhecimento e perda de vigor dessas sementes.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A germinação é um processo que tem início com a absorção de água pela semente e termina com o início do alongamento do eixo embrionário (CHING, 1972; BEWLEY & BLACK, 1985).

A germinação pode ser definida como uma série sequencial de eventos morfogénéticos que resultam na transformação de um embrião em uma plântula. É um processo dinâmico envolvendo divisão e expansão celular e formação dos órgãos da planta como folhas, caules e raízes (BERLYN, 1972). É caracterizada por uma rápida absorção de água pelos tecidos, que facilita a hidrólise e mobilização do material de reserva e posteriormente sua utilização no crescimento do eixo embrionário (INGLE *et alii*, 1964). A germinação pode ser classificada em dois tipos: epigeal, onde os cotilédones são levados acima da superfície do solo como é o caso do feijão, soja e amendoim, e hipogeal, na qual os cotilédones permanecem no interior do solo como ocorre em milho, arroz e ervilha.

A protrusão do embrião através do tegumento é o ponto crucial que identifica a germinação da semente (BROWN, 1972; BEWLEY & BLACK, 1982). Entretanto para que ela ocorra é necessário além do substrato, que haja disponibilidade de água em níveis ideais, de acordo com o tipo de semente; composição de gases e temperatura adequadas, além de luz que é exigida para certas espécies; que a semente esteja viável, isto é; que o embrião esteja

vivo e capaz de germinar e que esteja no estado quiescente, de tal forma que quando submetida a condições de ambiente ideais, ela germine (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982).

Vigor é a soma de todos os atributos da semente que favorecem o estabelecimento de uma população inicial sob condições de campo desfavoráveis (ISELY, 1957). São consideradas sementes de alto vigor aquelas que estão no auge do seu poder potencial, quando todos os fatores que possam prejudicar sua qualidade estão ausentes e aqueles que constituem uma boa semente estão presentes nas proporções certas, condicionando a um desempenho satisfatório na máxima variação das condições de ambiente. Enfim, aquelas que possuem características que as levem a uma alta porcentagem de germinação e uma rápida emergência no campo (HEYDECKER, 1972). O desempenho dos aspectos que podem exibir variações associadas com divergências no vigor das sementes inclui processos bioquímicos e reações durante a germinação, tal como reações enzimáticas e atividade respiratória (PERRY, 1978). O vigor pode ser avaliado pela velocidade de germinação das sementes no campo ou em laboratório, utilizando-se de um dos dois métodos: método direto, simulando as condições de campo (teste de frio), o qual permite a avaliação de todos os componentes de vigor da semente e o método indireto, que consiste da avaliação de certos atributos fisiológicos e características estruturais da semente como velocidade de germinação em substratos especiais para germinação, crescimento de radícula, teste de respiração, teste de tetrazólio, germinação a baixa temperatura e imersão em água quente (ISELY, 1957). Segundo POWELL & MATTHEWS (1981) durante a aplicação do teste de tetrazólio, mesmo

as células que se apresentarem sem coloração não estão totalmente sem atividade. O teste de tetrazólio é comumente usado para estimar viabilidade de sementes (MOORE, 1969), mas geralmente mostra uma correlação significativa entre redução na cor, respiração e vigor de plântulas (KITTOCK & LAW, 1968).

1. Fatores que afetam a qualidade fisiológica da semente.

Qualidade da semente é o somatório de todos os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que afetam a sua capacidade de originar plantas de alta produtividade e, a qualidade fisiológica, é a sua capacidade de desempenhar funções vitais, que são caracterizadas pela sua germinação, seu vigor e sua longevidade (POPINIGIS, 1977).

A máxima qualidade da semente é atingida por ocasião de sua maturidade fisiológica que é o ponto de máximo peso da massa de matéria seca e aquele em que a semente atinge máximo poder germinativo e máximo vigor (HARRINGTON, 1972; POPINIGIS, 1977; OBENDORF *et alii*, 1980).

Os principais fatores que afetam a qualidade fisiológica da semente são: origem da semente e vigor das plantas ascendentes (DELOUCHE & POTTS, 1974; MAGUIRE, 1977), quantidade e qualidade de adubação empregada para a produção da semente (YORK JUNIOR & COLWELL, 1951; AUSTIN, 1972; SCOTT & LONGDEN, 1972; DELOUCHE, 1981; MAEDA *et alii*, 1986), condições climáticas durante a multiplicação da semente (TOLEDO & MARCOS FILHO, 1977), maturação da semente (RENA & VIEIRA, 1971; CONDÉ & GARCIA, 1984), atraso na colheita após a maturação fisiológica (GARCIA, 1980;

CARVALHO & NAKAGAWA, 1988; ARAÚJO, 1983), teor de umidade da semente na época da colheita (SILVA *et alii*, 1975; NEUBERN & CARVALHO, 1976), temperatura de secagem (HARRINGTON, 1972; SATHLER, *et alii*, 1980; ARAÚJO, 1983), embalagem (HARRINGTON, 1963; BASKIN, 1969; LOPES, 1980; 1983), condições de armazenamento (MORRIS & WOOD, 1956; SARTORI & MIORIM, 1979; MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982; LOPES, 1983), injúria mecânica e danificações por insetos e microorganismos (CROCKER & BARTON, 1957; QUASEN & CHRISTENSEN, 1960; HOWE, 1973; DELOUCHE & POTTS, 1974).

A semente mesmo sendo portadora de elevada qualidade fisiológica, nem sempre é utilizada imediatamente após a sua colheita, necessitando ser armazenada na entressafra. A sua viabilidade todavia é mantida por maior período durante o armazenamento quando se associa baixo teor de umidade, embalagem de acondicionamento e temperatura e umidade relativa baixas no ambiente de conservação (SITTISROUNG, 1970; ZINK & ALMEIDA, 1970; HARRINGTON, 1972; DELOUCHE, 1973; 1975; LOPES, 1983).

Tem sido estabelecido por muitos autores que um dos fatores de fundamental importância para a longevidade da semente é o seu conteúdo de umidade (BARTON, 1961; HARRINGTON, 1972; DELOUCHE, 1973). Toda semente apresenta um certo teor de umidade que é dado em relação ao seu peso úmido e que varia com o tipo de semente e em função do tipo de reservas armazenadas no seu tecido (BARTON, 1941).

2. Fatores que afetam a germinação da semente.

A temperatura é um dos mais importantes fatores do ambiente que afeta a germinação de sementes. As oscilações da temperatura de germinação além de afetarem a germinação total afetam também a velocidade e a uniformidade de germinação.

A temperatura na qual diferentes sementes germinam e o limite dentro do qual elas germinam é determinado pela sua origem, diferenças genéticas, diferença varietal e pela sua idade (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982).

Dentro dos limites ótimos de temperatura para a germinação de sementes de uma determinada variedade são propostos três pontos críticos: temperatura mínima, abaixo da qual não ocorre germinação; temperatura máxima, acima da qual não se verifica germinação e temperatura ótima, que é a temperatura que possibilita que o maior número possível de sementes germine num período de tempo mínimo (SALGADO-LABORIAU, 1973), sendo que esses limites oscilam geralmente entre 15 e 30°C para a maioria das sementes não dormentes (HENDRICKS & TAYLORSON, 1976). Altas e baixas temperaturas provocam redução na germinabilidade devido à inabilidade das membranas da semente para funcionar eficientemente como membranas semi-permeáveis (SIMON, 1974).

Temperaturas alternadas simulando as flutuações de temperaturas que ocorrem normalmente na natureza promovem a germinação de muitas sementes como por exemplo as de *Cucumis anguria* (FELIPPE, 1980) e *Vitis vinifera* (MAEDA, 1982).

Diferenças de potencial da água entre diferentes pontos dão origem a seu movimento (REICHARDT, 1987). O potencial da água

de uma semente madura e seca é extremamente baixo, podendo atingir valores menores que -1000 bars (MANOHAR, 1966). A absorção de água pelos diversos tecidos da semente consiste na primeira etapa da germinação, onde ocorre reidratação das macromoléculas e organelas celulares, aumentando a permeabilidade do tegumento ao oxigênio e dióxido de carbono.

A embebição como um processo físico relacionado com as propriedades dos coloides depende da composição da semente, permeabilidade do tegumento ou fruto e da disponibilidade de água no estado líquido ou gasoso, independente da viabilidade da semente. Ela pode se realizar com maior ou menor velocidade dependendo da pressão hidrostática que se desenvolve no interior da semente, isto é: a embebição da semente acarreta um aumento do volume de água no seu interior, o qual exerce pressão sobre as membranas e estas, como reação, geram pressão de igual magnitude em sentido oposto (POPINIGIS, 1977; MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982).

O processo de absorção de água consiste de duas fases distintas: A fase de embebição, na qual a absorção de água é amplamente passiva e a fase de crescimento, que inicia com o aparecimento da radícula, na qual a absorção de água se torna mais acentuada (HILLEL, 1972). Entretanto, sementes de várias espécies quando colocadas em placas de petri com água destilada, sob condições ideais para germinação, apresentam um padrão trifásico de absorção de água. Fase I, caracterizada pela rápida embebição inicial, sendo consequência do gradiente entre o potencial matricial da semente e o potencial de água do substrato no qual a semente se encontra em embebição. A embebição ocorre independente

da atividade metabólica da semente, se a semente está viável ou inviável, dormente ou não dormente. É acompanhada pela liberação de gases, lixiviação de materiais como ácidos orgânicos, aminoácidos, íons e açúcares, principalmente em sementes inviáveis. Há intensificação da respiração e demais atividades metabólicas. Fase II, em que o potencial matricial aumenta e se equipara ao potencial osmótico, provocando uma redução acentuada na velocidade de absorção de água e na intensidade de respiração. Há maior ativação dos processos metabólicos, preparando o embrião para a germinação. Sementes mortas ou dormentes não passam desta fase. Fase III, onde ocorre o reinício do crescimento do embrião (protrusão de radícula). Há redução no potencial de água da semente, provocando novamente absorção de água e aumento na atividade respiratória. Esta fase só é atingida por sementes não dormentes e viáveis (BEWLEY & BLACK, 1982).

O ponto no qual a semente absorve água do solo durante a fase inicial de germinação é determinado pela composição da semente, permeabilidade do tegumento da semente ou do fruto à água e disponibilidade e mobilidade de água no solo (MAYER & POLJACOFF-MAYBER, 1982).

As sementes da maioria das plantas cultivadas comportam-se indiferentemente quanto aos efeitos de luz na germinação. Há entretanto muitas espécies de plantas cuja germinação é influenciada pela luz. A exigência de luz que algumas espécies apresentam para germinar está relacionada com a dormência (POPINIGIS, 1977; MARCOS FILHO, 1986; CARVALHO & NAKAGAWA, 1988). De acordo com suas respostas à presença de luz, as sementes são

classificadas em fotoblásticas positivas ou negativas (EVENARI, 1965), existindo ainda as fotoblásticas neutras ou não fotoblásticas (SMITH, 1975). Essas respostas da semente à luz durante a germinação ocorrem através de uma fotorreação, cujo receptor é o fitocromo (P) que, segundo SIEGELMAN & FIRER (1964), é uma proteína de alto peso molecular, à qual se acopla um cromóforo semelhante a uma ficocianina (composto tetrapirrólico). O fitocromo existe em duas formas fotorreversíveis: Pr, forma de absorção máxima a 660 nm; e Pfr, forma de absorção máxima a 730 nm (BORTHWICK *et alii*, 1952). De acordo com HENDRICKS (1968), essa variação de estado se processa pela mudança de dois átomos de hidrogênio.

Vários pesquisadores têm sugerido que as sementes podem apresentar comportamentos diferentes em resposta à luz, dependendo de alterações no comprimento de ondas e tempo de exposição às irradiações (McCULLOUGH & SHROPSHIRE, 1970; KENDRICK, 1976; SMITH, 1973; SCHULTZ & KINCH, 1976), interação da espécie com fatores do ambiente-solo (WESSON & WAREING, 1969a; 1969b; VICENT & ROBERTS, 1977), interações com luz e temperatura (FELIPPE, 1980; RANDI & FELIPPE, 1981; BONNEWELL *et alii*, 1983), condições e tempo de armazenamento (MAYER & POLJACOFF-MAYBER, 1982), estresse osmótico (PRESSMAN *et alii*, 1977) e substâncias endógenas (THOMAS, 1977; KRISHNAMOORTHY, 1981).

3. Armazenamento da semente.

Os problemas de armazenamento estão entre os mais comuns que entravam o desenvolvimento dos programas de sementes nos

países menos desenvolvidos. As causas principais destes problemas são as condições climáticas relativamente adversas, isto é; altas temperaturas e umidades relativas. Quase de igual importância é a qualidade das sementes produzidas e beneficiadas. Sementes de baixa qualidade, com alto índice de deterioração, não mantêm sua viabilidade e seu vigor nem nas melhores condições de armazenamento. A regra geral é armazenar sementes sob condições frescas e secas. A temperatura e umidade relativa adequadas são características de cada espécie (DELOUCHE, 1973; DELOUCHE & POTTS, 1974; PARICHA *et alii*, 1977).

As condições de armazenamento são de fundamental importância para a preservação da qualidade da semente. Muitos trabalhos têm sido conduzidos na área de armazenamento visando caracterizar as melhores condições de preservação da qualidade fisiológica da semente por um período mais longo.

As sementes ao serem estocadas apresentam níveis de qualidade variáveis; a manutenção do potencial de armazenamento vai depender da temperatura e umidade relativa do ar no ambiente de armazenagem, ação de insetos e fungos, bem como do tipo de embalagens em que serão acondicionadas. O vigor da semente armazenada diminui mais rapidamente do que a sua porcentagem de germinação (DELOUCHE, 1975).

As condições de estocagem que mantêm a viabilidade da semente são aquelas que reduzem a respiração e outros processos metabólicos, sem causar injúria ao embrião (HARTMANN & KESTER, 1975).

De acordo com as características de viabilidade, as sementes podem ser classificadas como ortodoxas ou recalcitrantes, sendo consideradas ortodoxas aquelas que podem secar na própria planta de origem ou no ambiente, até atingir baixo nível de umidade, cerca de 5% ou menos, sem que sofram danos, isto é, estas sementes mantêm sua viabilidade quando secas, podendo serem armazenadas por longos períodos nesta condição. As sementes recalcitrantes, ao contrário, não secam na planta de origem, apresentam um valor crítico relativamente alto para o conteúdo de umidade, abaixo do qual elas morrem. Mesmo quando conservadas sob condições de umidade elevada, elas possuem longevidade relativamente curta (ROBERTS, 1973).

A longevidade da semente é extremamente variável em função do tipo de semente e das condições de armazenamento. Normalmente a semente é bem conservada em ambiente que reduz a atividade metabólica, ambiente com baixa temperatura e alta concentração de CO_2 (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982). Para HARRINGTON (1972) a longevidade da semente será máxima se a umidade relativa do ambiente de conservação permanecer entre 20 e 25%.

Em geral, os níveis de deterioração e vigor têm sido caracterizados, dentre outros fatores, pela velocidade de emergência, comprimento de radícula e parte aérea, peso da massa de matéria seca de raízes e de parte aérea e pela variabilidade entre plantas (SARTORI, 1971; PERRY, 1978; LOPES, 1980; OLIVEIRA, 1981).

Segundo SITTISROUNG (1970), a deterioração é uma consequência de alterações fisiológicas e químicas que ocorrem nos

tecidos da semente até sua morte. A deterioração determina a perda de viabilidade da semente, provocando atraso na germinação, redução na porcentagem de germinação, aumento do número de plântulas anormais, impossibilidade para a semente germinar, baixa performance das plantas que sobrevivem no campo, o que pode conduzir a um baixo rendimento da cultura (CHING *et alii*, 1969; ROBERTS, 1972; 1973), ocorrência de mudança na cor da semente, menor tolerância às condições adversas de estocagem, velocidade de crescimento reduzida (DELOUCHE, 1968).

Em sementes deterioradas, sementes menos vigorosas, o valor do quociente respiratório (QR), que é dado pelo quociente da quantidade de CO_2 liberada pela quantidade de O_2 consumida, é alto, devido ao aumento no desenvolvimento de CO_2 e redução na absorção de O_2 ou ambos, indicando que substâncias altamente oxidadas como ácidos graxos, glicerol e ácidos orgânicos estão sendo respiradas pela semente (WOODSTOCK & GRABE, 1967; ANDERSON, 1970a). Em certos casos, aumento na produção de CO_2 ocorre antes de declínio da germinação (ANDERSON, 1970a; 1970b) enquanto redução na absorção de O_2 aparece principalmente durante o avanço da deterioração (THRONEBERRY & SMITH, 1955; WOODSTOCK & GRABE, 1967).

4. Reservas da semente

Os órgãos de reservas de sementes e frutos são principalmente o endosperma, o perisperma e os cotilédones. Substâncias como carboidratos, proteínas e lipídios, que funcionam como fonte de energia, encontram-se distribuídas nos órgãos de reservas e

tecidos específicos (CHING, 1972; EVENARI, 1984).

Três classes de sacarídeos servem como fonte de reserva de carboidratos em sementes: amido, polissacarídeos de parede celular e sacarose e outros derivados; eles são depositados em diferentes quantidades em diferentes espécies durante o desenvolvimento da semente e consumidos durante e principalmente após a germinação (HALMER, 1985).

Os polissacarídeos de reserva mais comumente encontrados são o amido e os frutanos, que são em geral depositados no citoplasma das células, embora possam ser também encontrados galactomananos, glicomananos e xiloglucanos funcionando como fontes de reservas em sementes de algumas espécies (BAILEY, 1971; GRANT REID, 1971; MEIER & REID, 1982).

O amido é um polissacarídeo composto por dois polímeros de glicose: um linear contendo resíduos de glicose ligados por ligações glicosídicas alfa-1,4 (amilose) e outro ramificado que é uma glicana, contendo ligações alfa-1,4 e alfa-1,6 (amilopectina), sendo que a proporção de amilose e amilopectina na composição do amido varia de acordo com a espécie e mesmo com a variedade (AKAZAWA, 1965; SHANON *et alii*, 1970; DUNN, 1974; BEWLEY & BLACK, 1983; MERCIER, 1985).

Em plantas superiores e especialmente em cotilédones de sementes, o amido é a forma de polissacarídeo mais abundante e de maior importância (AKAZAWA, 1965; SWAIN & DEKKER, 1966a; 1966b; BEWLEY & BLACK, 1982; MERCIER, 1985), sendo depositado e acumulado na forma de grânulos insolúveis em água, em organelas denominadas amiloplastos. Representa em geral 60 a 90% do peso da massa

de matéria seca de sementes de cereais e 30 a 40% em sementes de algumas leguminosas (MERCIER, 1985). KOSLOWSKI (1972) afirma que em *Phaseolus* o amido pode chegar a 60% do peso da massa de matéria seca da semente.

As proteínas de reserva são armazenadas em organelas subcelulares denominadas corpos protéicos (VARNER & SCHIDLOVSKY, 1963; CHING, 1972; BEWLEY & BLACK, 1982; MURRAY, 1984). Em leguminosas essas estruturas são envolvidas por membrana lipoprotéica, de formato arredondado, com teor médio de proteína de cerca de 80%, contendo fitatos e lipídios, podendo ainda apresentar cristais globóides em seu interior (LOTT, 1980). Esses corpos protéicos desenvolvem-se paralelamente ao acúmulo de proteínas e apresentam três funções principais: proteção da proteína de reserva contra a degradação enzimática durante a formação da semente, armazenamento de grande quantidade de proteínas sob forma concentrada e compartimentação lítica das células do tecido de reserva, o qual se expressa durante a germinação (MURRAY, 1984). Os sítios intracelulares responsáveis pela síntese dos polipeptídeos dos órgãos de reserva são os polissomos associados às membranas do retículo endoplasmático (BEEVERS, 1982; MURRAY, 1984).

OSBORNE (1895) classificou as proteínas de sementes em 4 grupos de acordo com as propriedades de sua solubilidade diferencial: albuminas, solúveis em água; globulinas, solúveis em soluções salinas; glutelinas, solúveis em soluções de ácidos ou bases fracas e as prolaminas, solúveis em álcool. OSBORNE & CAMPBELL (1898) estudando proteínas em leguminosas identificaram duas globulinas: leguminas e vicilinas, de acordo com sua solubi-

lidade em diferentes concentrações de soluções salinas e pelas diferentes características de coagulação no calor. Cerca de 50 a 75% das proteínas da semente de leguminosas são solúveis em soluções salinas, sendo portanto classificadas como globulinas (SUN & HALL, 1975); as globulinas apresentam grandes variações em sua composição (McLEESTER *et alii*, 1973; MILLERD, 1975; DERBYSHIRE *et alii*, 1976; SGARBIERE, 1980; SGARBIERE *et alii*, 1982). ROMERO *et alii* (1975), SUN & HALL (1975) e LARKINS (1981) designaram de G_1 a globulina-1 e de G_2 a globulina-2 quando se referiram a globulinas de sementes de feijão. Os polipeptídeos da globulina G_2 são menores que os da globulina G_1 (MA & BLISS, 1978).

As globulinas em leguminosas são formadas por duas frações principais que em ultracentrifugação correspondem às unidades de sedimentação de 11S e 7S, denominadas glicoproteína I e glicoproteína II respectivamente, por apresentarem moléculas de açúcar em suas subunidades (BAILEY & BOULTER, 1970; PUSZTAI & WATT, 1970; RACUSEN & FOOTE, 1971; ERICSON & CHRISPEELS, 1973; BARKER *et alii*, 1976), sendo que a glicoproteína I compreende as leguminas e a glicoproteína II, as vicelinas (DERBYSHIRE *et alii*, 1976).

O conteúdo protéico de leguminosas como ervilha, feijão, soja e lentilha é de 25 a 40% de suas reservas (EARLE & JONES, 1962; KELLY & BLISS, 1975).

As proteínas não se distribuem uniformemente dentro dos cotilédones da semente de feijão; a região abaxial periférica é mais rica em proteínas do que a região central e a composição das

subunidades das glicoproteínas é diferente nessas regiões (BARKER *et alii*, 1976).

Os lipídios estão geralmente presentes em organelas especiais denominadas esferossomos que contêm as enzimas necessárias para a hidrólise de lipídios em ácidos graxos e glicerol.

A maior parte dos ácidos graxos das sementes são insaturados, e os que ocorrem com maior frequência são o oléico, linoléico e linolênico. Dentre os saturados são encontrados como glicerídeos o ácido acético, butírico, palmítico, esteárico, láurico e mirístico (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982).

5. Hidrólise e mobilização de reservas durante a germinação

Durante o processo de germinação e crescimento da plântula, os tecidos de reserva da semente apresentam uma reversão no metabolismo onde, células que durante a embriogênese funcionaram como locais de síntese de carboidratos, proteínas e lipídios, tornam-se sítios de degradação e mobilização de reservas (BEWLEY & BLACK, 1983).

Tem sido mostrado que o embrião produz reguladores de crescimento os quais controlam diretamente a mobilização de reservas dos cotilédones ou endosperma durante o processo de germinação de várias sementes, inclusive nas de feijão (CLUM, 1967; DALE, 1969; GEPSTAIN & ISLAN, 1970; METIVIER & PAULILO, 1980).

Para BEWLEY & BLACK (1983) o início da hidrólise do amido e proteína em *Fisum sativum* e *Vigna sesquipedalis* ocorre ao mesmo tempo; em *Vicia faba* a digestão de proteínas inicia-se após a do amido e em *Phaseolus vulgaris* os corpos protéicos começam a

ser hidrolisados antes que o amido. A degradação do amido é catalizada pelas enzimas alfa e beta amilase, amido fosforilase, alfa glucosidade e enzimas desramificadoras (OKITA *et alii*, 1979), sendo que a alfa amilase é a principal enzima envolvida na degradação inicial do amido e a beta amilase e a amido fosforilase auxiliam na conversão do produto a açúcares livres (SWAIN & DEKKER, 1966a; 1966b; JULIANO & VARNER, 1969; CHANG, 1982). Em germinação de cereais foi constatada a presença da alfa amilase hidrolisando a amilose e a amilopectina, liberando inicialmente grande quantidade de oligossacarídeos e, posteriormente, formação de grande quantidade de maltose e pequena quantidade de glicose e maltotriose (AKAZAWA, 1965). A alfa amilase ataca as ligações alfa-1,4 da amilose e da amilopectina. Na primeira forma cadeias de maltodextrinas que posteriormente vão sendo mais lentamente hidrolisadas (GREENWOOD & MCGREGOR, 1965). Na segunda não rompe ligações alfa-1,6 e libera glicose, maltose, maltotriose e dextrina limite (MANNERS & MARSHALL, 1971)

A síntese completa e liberação de uma molécula de alfa amilase requer cerca de 60 minutos (CHEN & JONES, 1974). Somente após o início do processo de germinação da semente é que foi constatada a atividade da alfa amilase em ervilha (JULIANO & VARNER, 1969), arroz (TANAKA *et alii*, 1970), sorgo (GHOSE *et alii*, 1974), e milho (GOLDSTEIN & JENNINGS, 1975), e que o desaparecimento do amido coincidia com o aumento da atividade dessa enzima em milho (DURE, 1960), arroz (MURATA *et alii*, 1968), ervilha, (JULIANO & VARNER, 1969) e lentilha (TARRAGO & NICOLAS, 1976). GREENWOOD & MCGREGOR (1965) também verificaram a presença

de alfa amilase em sementes quiescentes de cevada.

As principais enzimas que estão presentes nos corpos protéicos são a fosfatase, RNase, alfa e beta glicosidase, alfa amilase e protease (LARKINS, 1981; MURRAY, 1984).

As enzimas proteolíticas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e transportadas em vesículas para os corpos protéicos onde vão ser armazenadas (BEWLEY & BLACK, 1983). Tanto em sementes secas como em sementes germinadas foi detectada a atividade de endopeptidases que hidrolisam as proteínas de armazenamento transformando-as em peptídeos solúveis que posteriormente vão sofrer ação da exopeptidase (PENNER & ASHTON, 1967; YOMO & VARNER, 1973), tendo sido observado que durante o processo de germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* a atividade proteolítica aumenta (CHING, 1972; YOMO & SRINIVASEN, 1973).

As proteínas de reserva, durante a germinação são hidrolisadas pelas proteases a aminoácidos e peptídeos que serão translocados para os pontos de crescimento, ou na forma de polipeptídeos, como foi detectado em soja (CORTELAZZO, 1986), onde serão utilizados na síntese de novas proteínas ou oxidados no ciclo de Krebs para liberação de energia (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982).

As principais formas de lipídios armazenados em sementes são triglicerídeos, glicolipídios e fosfolipídios, sendo que a forma predominantemente encontrada é a de triglicerídeos, que são compostos por uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos.

O desaparecimento de lipídios em muitas sementes é acompanhado pelo aparecimento de carboidratos. Isto porque os ácidos graxos sofrem uma beta oxidação, com a formação do Acetil CoA que pode ser completamente oxidado no ciclo de Krebs para produção de energia com liberação de CO₂ e água ou convertido a malato via ciclo do glioxilato, que posteriormente será convertido a carboidrato por uma série de reações (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982; BEWLEY & BLACK, 1983).

A análise de lipídios polares em sementes de soja usando difração de raios-X indicou que mesmo quando desidratados, os lipídios mantêm a configuração lamelar e com a hidratação há evidências de alterações estruturais como aumento acentuado e rápido nos espaços intercelulares (SEEWALDT *et alii*, 1981). Em cotilédones de *Ricinus* os lipídios armazenados são convertidos a glicose e sacarose por uma rota incluindo a beta oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, o ciclo do glioxilato e parte do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e o sentido inverso da glicólise (BEEVERS, 1961; HUANG & BEEVERS, 1974), sendo que o ciclo glicolítico depende da presença do embrião ou eixo embrionário (BLACK & ALTSCHUL, 1965).

A hidrólise da parede celular provoca a liberação de enzimas como a peroxidase que geralmente se apresenta ligada a polissacarídeos da parede celular (WHITMORE, 1978; WILHELM & WILELNOVA, 1981). A peroxidase age sobre a membrana afetando a sua estrutura (HAARD & TOBIN, 1971; TAKAKI, 1979).

Segundo KAREL *et alii* (1975) os peróxidos oxidam grupos sulfidrilas dos aminoácidos sulfurados, tornando-os não disponíveis.

As reações de peroxidação podem ser iniciadas enzimaticamente através da lipoxigenase (LYNCH *et alii*, 1985), que é uma dioxigenase que catalisa como reação primária a hidroperoxidação pelo oxigênio molecular, do ácido linoléico e outros lipídios poli-insaturados (AXELROD *et alii*, 1981). O hidroperóxido de lipídios resultante da ação dessa enzima pode provocar um baixo valor nutritivo pela destruição de certas vitaminas e proteínas, podendo ainda formar produtos com efeitos tóxicos pela sua decomposição química (GARDNER, 1979).

A degradação oxidativa de lipídios insaturados em sementes de amendoim produz hidroperóxidos que posteriormente vão originar ácidos, álcoois, aldeídos e cetonas (St. ANGELO & DRY, 1975).

6. Parede e membrana celular, tegumento e hidratação de sementes

A parede celular vegetal é delimitada por dois blocos de polissacarídeos, com destaque para a celulose (CHAMBAT *et alii*, 1984). A presença de substâncias pécticas em sua estrutura tornam-na metacromática quando ela é evidenciada "in situ" por certos corantes como o azul de toluidina a pH 4,0, por exemplo. Durante o processo de germinação e alongamento celular, podem ocorrer alterações na metacromasia das paredes (CORTELAZZO, 1986; RANDI, 1987).

Sementes secas apresentam as membranas desorganizadas possivelmente no estado não lamelar, cuja função de barreira à entrada de água e saída de solutos se torna ineficiente (SIMON, 1978). MAYER & SHAIN (1974) verificaram que na semente seca as mitocôndrias são anormais e apresentam rápidas alterações em função dos níveis de água durante a embebição.

A capacidade que tem a semente de resistir à desidratação indica que suas membranas podem manter a integridade estrutural mesmo quando secas (SEEWALDT *et alii*, 1981). Porém, há possibilidade da dupla camada de membrana tornar-se rearranjada numa fase hexagonal de característica altamente hidrofóbica, entretanto perfurada por longos canais contendo água e enfileirados pelas cabeças polares dos fosfolipídios (SEEWALDT *et alii*, 1981; SIMON, 1984; BEWLEY & BLACK, 1985). Taxa excessiva de absorção de água antes de terminada a reorganização das membranas pode levar a um deslocamento dos componentes das mesmas, combinar deterioração de compostos e perda de componentes celulares através de saída no meio aquoso (SIMON, 1978).

O tegumento normalmente restringe ou regula a entrada de água na semente, agindo como uma barreira mecânica à difusão (VÁLIO, 1986). O fluxo de água para as sementes é controlado por um gradiente de cerca de 1000 bars (MANOHAR, 1966; LARSON, 1968) e quando a água entra nos tecidos da semente provoca sérios danos às membranas celulares, podendo provocar rompimento parcial ou total destas membranas, determinando a liberação de solutos citoplasmáticos que pode chegar a 100% de perda (LARSON, 1968).

Uma importante característica da reidratação da semente é a liberação substancial de solutos durante os primeiros minutos de embebição, sugerindo uma organização incompleta das membranas no estado seco, com uma mudança mais efetiva da barreira da membrana sob nova embebição (SIMON, 1974; PARRISH & LEOPOLD, 1977a, 1977b; TULLY *et alii*, 1981). A soma de solutos que saem da semente inclui muitas substâncias características do citoplasma como aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos, proteínas, íons, fenóis, fosfatos e ácido giberélico (CHING, 1972; SIMON, 1974; ABDEL SAMAD & PEARSE, 1978; BEWLEY & BLACK, 1985; WILSON & McDONALD, 1986). JONES (1972) trabalhando com cevada observou pela análise da hidrólise da parede celular que enzimas e outros produtos podem ser liberados do citoplasma através da plasmalema, independente de organelas secretoras. ABDUL-BAKI (1969a) observou que todos os açúcares identificados em água de lavagem de sementes eram solúveis em água e tinham baixo peso molecular. Essas duas características permitem aos açúcares se difundirem dentro e fora da semente durante a embebição. DUKE & KAKEFUDA (1981) observaram que em solutos que saíam dos embriões das sementes de ervilha e de amendoim após 6 horas de embebição, cerca de 1 a 2% eram enzimas solúveis enquanto em embriões das sementes de feijão e de soja a quantidade de enzimas nos solutos era cerca de 6 e 17%, respectivamente.

A saída de solutos de baixo peso molecular, de embriões e de sementes é mais acentuada quando embriões relativamente secos são colocados em água. A condutividade elétrica em água de

lavagem de sementes reduz quando o teor de umidade desta aumenta (SIMON, 1984; TAYLOR & DICKSON, 1987), indicando que está ocorrendo menor saída de solutos, a que tem sido atribuída a grande funcionalidade das membranas das células e melhor organização das membranas em alto teor de umidade (SIMON, 1974; SIMON & MILLS, 1983; SIMON, 1984).

A condutividade da água de lavagem de sementes demonstrou ser um bom indicador do grau de deterioração das mesmas. O aumento de eletrólitos na água de lavagem de sementes mortas e de sementes em deterioração são considerados como resultantes do processo de degradação de membranas celulares e subsequente perda do controle de permeabilidade (HIBBARD & MILLER, 1928; THOMAS, 1960; LARSON, 1968; VILIERIS, 1973; LEOPOLD, 1980; BUCHVAROV & GANTCHEFF, 1984; GIDROL *et alii*, 1988). As medidas de condutividade na água de lavagem de sementes de *Trifolium incarnatum* e em *Lolium perene* indicaram que a umidade da semente durante o armazenamento foi o fator que mais acelerou a degradação das membranas; quanto mais alto o teor de umidade, maior o grau de degradação; a temperatura do ambiente de conservação também afetou a integridade das membranas, principalmente a flutuação natural de temperatura, mesmo em sementes com baixa umidade; a saída de solutos ou a degradação de membranas foi um processo progressivo regular após a morte das sementes (CHING & SCHOOLCRAFT, 1968).

As oscilações do teor de umidade das sementes conjugadas com temperaturas elevadas no ambiente de armazenamento aceleram os processos metabólicos, provocando a deterioração das mesmas, culminando com a perda total de vigor e germinação em decor-

rência das alterações fisiológicas e bioquímicas que se processam em seu interior (KOOSTRA & HARRINGTON, 1969; EDJE & BURRIS, 1970; CHING, 1972; PARICHA *et alii*, 1977).

7. Efeito do armazenamento sobre as reservas das sementes

Durante o armazenamento há o processo de deterioração onde ocorre a hidrólise dos lipídios armazenados, coalescência de corpos de lipídios e liberação de ácidos graxos livres, que determinam a perda de viabilidade (ROBERTS, 1973). Os ácidos graxos formados pela hidrólise dos glicerídeos são posteriormente metabolizados pelo ciclo do glioxilato ou utilizados diretamente no metabolismo celular (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982).

CHING & SCHOOLCRAFT (1968) trabalhando com armazenamento de sementes de *Trifolium incarnatum* e de *Lolium perene* observaram que os teores de açúcares e amido nos dois tipos de sementes reduziram com o aumento do teor de umidade da semente e temperatura de armazenamento enquanto o teor de aminoácidos aumentou. A medida de condutividade indicou que a umidade da semente foi o fator de maior importância na degradação de membranas e que a temperatura também afetou a integridade das mesmas. Aqueles autores encontraram maior quantidade de aminoácidos em água de lavagem de sementes com o envelhecimento e morte das mesmas, indicando que a atividade de proteases pode estar associada com o envelhecimento na degradação estrutural vital de proteínas solúveis de membranas de organelas, nucleoproteínas, ribossomos e enzimas. Observaram ainda que houve uma redução clara na quantidade de proteínas solúveis.

OHAD *et alii* (1971) obtiveram redução no conteúdo de amido e aumento no teor de açúcares livres em tubérculos de *Solanum tuberosum* armazenados a 40°C. WETZSTEEIN & STERLING (1979) também observaram que em tubérculos de *Solanum tuberosum* armazenados a baixas temperaturas havia aumento no teor de açúcares redutores, a que atribuíram os efeitos da temperatura sobre a atividade de enzimas que degradam o amido. FIGUEIREDO-RIBEIRO & DIETRICH (1983) armazenaram fragmentos de xilopódio de *Ocimum nudicaule* a 5°C e 5-28°C alternados durante uma semana. Após este período de armazenamento observaram que a 5°C houve redução no conteúdo de carboidratos solúveis enquanto a 5-28°C houve aumento; os níveis de galactose, glicose e frutose também aumentaram na condição de 5-28°C e a 5°C somente a glicose aumentou. As autoras sugeriram que as mudanças nesses níveis de açúcares poderiam estar associadas com mudanças na atividade de enzimas hidrolíticas. ABDUL-BAKI & ANDERSON (1970) trabalhando com armazenamento de sementes de cevada observaram que nos lotes com 5 e 8 anos de armazenamento, que apresentavam baixa viabilidade, a concentração de açúcares solúveis na água de lavagem das sementes era muito mais acentuada do que na água de lavagem daquelas armazenadas por 2 anos, que apresentavam alta viabilidade. Segundo TAKAYANAGI & MURAKAMI (1968); CHING & SCHOOLCRAFT (1968), a determinação do teor de açúcares livres em sementes é um teste prático para estimativa aproximada da viabilidade das sementes, enquanto ABDUL-BAKI & ANDERSON (1970) sugerem que o método não é seguro.

ANTUNES & SGARBIERI (1979) trabalhando com *Phaseolus vulgaris*, cultivar Rosinha G-2, encontraram redução nos parâmetros taxa de eficiência protéica (PER), disponibilidade de metionina e cisteína e digestibilidade aparente "in vivo" de proteínas de feijão em função do tempo de exposição às condições de 12, 25 e 37°C e 52, 65 e 76% de umidade relativa, enquanto MOLINA *et alii*, (1975) encontraram aumento de disponibilidade de lisina e metionina em sementes de feijão após 6 meses de estocagem. CHING & SCHOOLCRAFT (1968) e HOHLBERG & STANLEY (1987) também verificaram que armazenagem de sementes sob condição de alta temperatura e umidade relativa determinava aumento nos níveis de aminoácidos livres nas sementes.

Alta temperatura e umidade relativa durante o armazenamento influem no aumento de acidez dos lipídios e no tempo de cozimento (BURR *et alii*, 1968).

As lipases estão envolvidas na deterioração de membranas e destas, três enzimas degradam lipídios: fosfolipase D; fosfatase ácida fosfatídica e a hidrolase acil lipolítica (PALIYATH & THOMPSON, 1987).

KOOSTRA & HARRIGTON (1969) acreditam que a oxidação de lipídios seja a causa principal do fenômeno de deterioração de sementes e perda de viabilidade onde as células tornam-se mais permeáveis com o envelhecimento; o total de fósforo contendo lipídios é drasticamente reduzido no material envelhecido artificialmente quando comparado com o material envelhecido normalmente e essa redução persiste gradativamente com a redução da viabilidade.

8. Efeito do envelhecimento acelerado sobre as reservas da semente

Durante o envelhecimento da semente muitas trocas bioquímicas e fisiológicas ocorrem (ABU-SHAKRA & CHING, 1967). FOBEL *et alii* (1987) observaram redução no conteúdo dos ácidos graxos insaturados linoléico e linolênico em membranas de flores de cravo senescentes ou envelhecidas "in vitro" e que houve um aumento na relação ácidos graxos insaturados/saturados.

A técnica do envelhecimento acelerado, também chamado de envelhecimento precoce, que consiste em submeter a semente a altas temperatura e umidade relativa por um certo período, que varia em função da espécie, pode ser usada para previsão do potencial de armazenamento de lotes de sementes, além de ser eficiente na comparação do vigor entre esses lotes (DELOUCHE *et alii*, 1968). Em *Phaseolus vulgaris*, foi verificado que o tratamento das sementes com temperatura de 42°C e umidade relativa de 100 % durante 3 dias, foi o mais adequado para promover o envelhecimento acelerado (DELOUCHE & BASKIN, 1973; MAEDA *et alii*, 1982)).

O tratamento de sementes com alta temperatura determina maior saída de solutos na água de embebição durante o processo de germinação (LEOPOLD, 1980; MURPHY & NOLAND, 1982) e redução na síntese de proteínas e de mRNA, após 12 horas de embebição, sendo que geralmente sementes mais velhas e de menor viabilidade apresentam-se mais sensíveis ao envelhecimento acelerado do que as mais novas. Sementes de cevada armazenadas quando tratadas com

alta temperatura apresentaram menor atividade amilolítica e maior taxa de liberação de CO_2 do que sementes não armazenadas (ANDERSON, 1970a).

BURRIS *et alii* (1969) detectaram redução no conteúdo de açúcares solúveis quando sementes de soja foram submetidas ao envelhecimento precoce, não tendo sido observado um declínio uniforme nas características de crescimento como esperado, enquanto BYRD & DELOUCHE (1971) observaram que o envelhecimento precoce, tratamento quente e teste de frio foram os melhores testes para avaliar o grau de deterioração das sementes de soja quando armazenadas com umidade inicial de 12,3% durante 9 meses. WOODSTOCK & TAO (1981) concluíram que o envelhecimento acelerado predispõe o embrião da semente a injúrias durante a embebição e que essa injúria foi responsável pela baixa vitalidade do embrião e redução no crescimento dos embriões sobreviventes. Em outros trabalhos de envelhecimento acelerado com sementes de soja foram observadas reduções nos níveis de carboidratos, nitrogênio e sacarose, embora a redução nos níveis de sacarose não tenha sido significativa; houve redução na taxa respiratória, maior quantidade de açúcares no exsudato e redução na germinação (EDJE & BURRIS, 1970). TILDEN & WEST (1985) também observaram aumento na taxa de embebição por ruptura das membranas das células.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizados 6 lotes de sementes de *Phaseolus vulgaris* L., cultivar Vitória, grupo preto.

Sementes dos lotes 1 e 2 foram provenientes da Fazenda Experimental de Linhares (ES), cedidas pela Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária (EMCAPA). As sementes do lote 1 foram colhidas em julho de 1983, tratadas com malation 4% diluído para 1%, mantidas em estufa a 30°C com circulação de ar até atingir 14% de umidade, acondicionadas em sacos de algodãozinho e armazenadas em ambiente natural nas condições de Alegre (ES) até agosto de 1985, quando foram removidas para Campinas (SP) e mantidas nas condições do lote 2 de ambiente natural descritas a seguir.

As sementes do lote 2 foram colhidas em julho de 1985, tratadas com Kobutol 75 - (PCNB) e divididas em 2 lotes de 12 kg, acondicionadas em embalagens semelhantes às sementes do lote 1. Posteriormente foram armazenadas em Campinas (SP) em ambiente natural, à temperatura média de 20°C $\pm$ 4°C e umidade relativa de 71% $\pm$ 11% ("vide" apêndice) e em câmara fria à temperatura média de 5°C $\pm$ 1°C e umidade relativa de 95% $\pm$ 3%.

Os lotes 3, 4, 5 e 6 foram constituídos por sementes recém-colhidas nos meses de fevereiro de 1986, maio e agosto de 1987 e junho de 1988, respectivamente, oriundas de multiplicação das sementes estocadas em câmara fria, em sementeiras do Departa-

mento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Todos os lotes de sementes receberam tratamentos e redução no teor de umidade semelhantes ao lote 1.

2. TESTES PARA A CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DAS SEMENTES

2.1. Determinação do conteúdo de cinzas

Este teste foi conduzido com sementes do lote 2 com 34 meses estocadas em câmara fria (34CF2) e em ambiente natural (34AN2), sementes do lote 1 com 58 meses estocadas em ambiente natural (58AN1), embebidas por 24 horas e sem embeber.

Foram utilizadas 5 sementes com pesos homogêneos por tratamento, inteiras ou separadas em eixos embrionários (5) e cotilédones (10) e colocados em mufla a temperatura de 600°C durante 6 horas. Posteriormente, usando balança analítica modelo WA-33 com precisão de 0,0001g, determinou-se o peso de cinzas das sementes.

2.2. Determinação do teor de umidade das sementes

O teor de umidade das sementes foi determinado utilizando-se duas repetições de 50 g, colocadas em frascos de vidro abertos e expostos em estufa elétrica (Precision Scientific - FANEM), à temperatura de 80°C durante 48 horas. Antes e após este tratamento de secagem, as sementes foram pesadas, utilizando-se balança Marte modelo A. 200 com precisão de 0,001g.

A porcentagem de umidade das sementes foi calculada aplicando-se a seguinte fórmula:

$$p1 - p2$$

$$U = \frac{\quad}{p1} \times 100 \quad \text{onde:}$$

$$p1$$

U = porcentagem de umidade;

p1= peso do material úmido;

p2= peso do material seco;

2.3. Peso de mil sementes

O peso de mil sementes foi determinado em sementes de todos os lotes (1 a 6), imediatamente após a redução do teor de umidade a 14%.

Foram tomadas ao acaso, 8 repetições de 100 sementes. Posteriormente determinou-se o peso de cada repetição, utilizando-se balança marca MARTE, mod. A-200 com precisão de 0,001g e calculou-se a variância, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos valores obtidos nas pesagens. Se o coeficiente de variação obtido não excedeu de 4%, a média obtida das 8 repetições foi multiplicada por 10 para o cálculo final. Entretanto, quando o coeficiente de variação excedeu o limite acima, outras 8 amostras de 100 sementes foram contadas, pesadas e, após calcular o desvio padrão das 16 amostras, obteve-se o peso de mil sementes com base na média das amostras (BRASIL, 1976).

2.4. Curva de embebição das sementes

Para o estudo da embebição, 5 repetições de 10 sementes foram imersas em água destilada a 25°C. Durante 12 horas, a in-

tervalos de 1 hora, as sementes eram retiradas, enxugadas com papel de filtro e pesadas em balança analítica modelo WA 33, com precisão de 0,0001g. Os resultados são apresentados em porcentagem de aumento em relação ao peso fresco inicial.

2.5. Testes de respiração - Consumo de O_2 .

A atividade respiratória das sementes foi avaliada pelo consumo de O_2 e liberação de CO_2 , de acordo com o método descrito por UMBREITT *et alii*, (1964).

Tres repetições de 2 sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e de sementes do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural, com volume conhecido, não embebidas e com 6 e 12 horas de embebição em água destilada foram colocadas nos frascos de WARBURG contendo 0,5 ml de água destilada ou 0,5 ml de KOH a 20% no orifício central para captação de CO_2 liberado. Os frascos foram mantidos em banho-maria à temperatura de 25°C constante durante o experimento. O controle de temperatura foi feito pelo uso de 3 termobarômetros contendo somente água destilada. Posteriormente à montagem dos experimentos, quando o sistema havia atingido o equilíbrio de temperatura constante a 25°C, os frascos foram vedados e a cada 15 minutos procederam-se as leituras durante um período de 120 minutos.

O consumo de O_2 foi calculado multiplicando-se os valores obtidos nos frascos contendo KOH pela constante de WARBURG (K) e os resultados expressos em μl de O_2 consumido por semente.

$$v_g \cdot \frac{273}{T} + v_f \cdot \alpha$$

Constante de WARBURG $K = \frac{\text{---}}{P_o}$ onde:

K = Constante do frasco de WARBURG;

v_g = volume do gás dentro do manômetro e do frasco;

T = temperatura absoluta do banho (273 + temperatura em $^{\circ}\text{C}$);

v_f = volume do líquido colocado no frasco mais o volume ocupado pelo material vegetal;

α = constante - coeficiente de solubilidade do gás que está sendo medido;

P_o = pressão padrão do fluido de Krebs (10.000mm de água ou 760mm de Hg).

2.6. Teste topográfico de tetrazólio

Quatro repetições de 50 sementes foram colocadas para embeber, em placas de petri forradas com 2 folhas de papel de filtro umedecido com água destilada, por um período de 6 horas em estufa "FANEM" com convecção, a 30°C . Após a embebição e remoção dos tegumentos, as sementes foram imersas na solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio a 1% e mantidas em câmara escura a 30°C , durante 2 horas. Posteriormente, procedeu-se o cálculo das porcentagens de sementes cujos eixos embrionários e cotilédones apresentavam-se perfeitos, completamente coloridos e com a coloração bastante uniforme (classe 1); sementes com eixos embriônários uniformemente coloridos e cotilédones não uniformemente co-

loridos, apresentando poucas áreas sem coloração (classe 2); eixos e cotilédones não uniformemente coloridos, apresentando muitas áreas sem coloração (classe 3) e eixos e cotilédones não coloridos (classe 4).

2.7. Extrações bioquímicas

2.7.1. Material

Eixos embrionários (cerca de 5 a 20) e cotilédones (cerca de 2 a 10) foram isolados de sementes do lote 1, colhidas em agosto de 1983 e armazenadas em ambiente natural (AN1) e do lote 2, colhidas em agosto de 1985 e armazenadas em ambiente natural (AN2) e em câmara fria (CF2), sem embeber ou embebidas em placas de petri, sobre papel de filtro umedecido com água destilada por 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

Estes materiais foram triturados em moinho de bolas, graal ou polytron PT 35, após serem mantidos em solução extraente de metanol, clorofórmio e água (M.C.W.) na proporção de 12 : 5: 3 (V/V) e de 20 ml por grama de peso de massa de matéria fresca. O macerado foi centrifugado em centrífuga FANEN a 2.500 rpm por 15 minutos e separados o sobrenadante e o precipitado.

2.7.2. Aminoácidos livres e açúcares solúveis totais

A preparação de extratos para dosagens de aminoácidos livres e açúcares solúveis totais foi feita de acordo com BIELESKI & TURNER (1966).

Para cada 4 ml do sobrenadante obtido em 2.7.1 foram adicionados 1,0 ml de clorofórmio e 1,5 ml de água destilada.

O material foi colocado em funil de separação, agitado e mantido em repouso durante a noite ou centrifugado a 2.500 rpm por 5 minutos, para separação das 2 fases: a superior composta de metanol e água, que contém os açúcares solúveis totais e os aminoácidos e a inferior contendo o clorofórmio (com lipídios e pigmentos) que foi descartada.

2.7.3. Proteínas

Parte do precipitado obtido em 2.7.1 foi ressuspensa com volume conhecido de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N por 3 vezes consecutivas e centrifugada a 2.500 rpm por 15 minutos. O volume de NaOH 0,1 N utilizado foi de 10 ml por grama de matéria fresca do material.

Para aumentar a concentração de proteínas no extrato, quando necessário, elas foram precipitadas com igual volume de ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugadas a 2.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as proteínas precipitadas foram ressuspensas em menor volume de NaOH 0,1 N.

2.7.4. Polissacarídeos solúveis em água (WSP) e amido

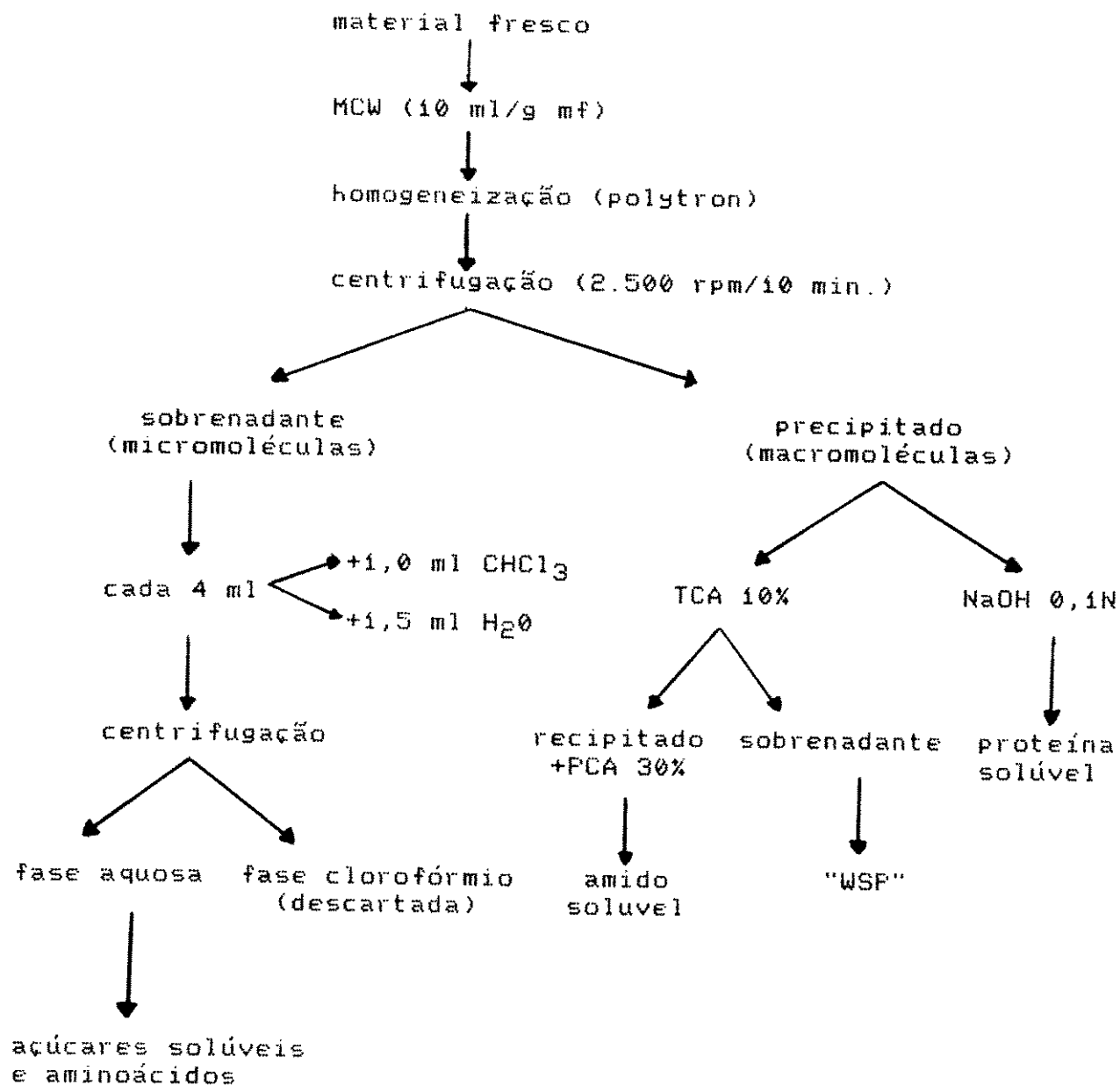
Parte do material obtido em 2.7.1 foi ressuspensa com volume conhecido de ácido tricloroacético (TCA) 10% por 3 vezes consecutivas e centrifugada a 2.500 rpm por 15 minutos. O volume de TCA 10% utilizado foi 10 ml por grama de massa de matéria fresca do material.

O sobrenadante foi posteriormente utilizado para as dosagens de polissacarídeos solúveis em água (WSP).

O resíduo obtido foi utilizado para a extração de amido segundo McCREADY *et alii* (1950). A ele, foram adicionados 2,5 ml de água destilada com posterior agitação. Em seguida, foram adicionados 3,25 ml de ácido perclórico (PCA) 52% com agitações periódicas por 30 minutos, sendo o material mantido em gelo durante a extração. Foram feitas 3 extrações consecutivas, seguidas de centrifugação a 2.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de amido e o resíduo descartado.

O esquema de extrações para as dosagens é mostrado na página seguinte.

Diagrama esquemático das extrações de aminoácidos livres, açúcares solúveis totais, proteínas, polissacarídeos solúveis em água e amido.



2.7.5. óleos

Mil eixos embrionários, com peso de massa de matéria fresca de 3 a 7g, e 100 a 200 cotilédones, com peso de 8 a 26g, isolados e sementes inteiras do lote 1, armazenadas em ambiente natural por 48 meses (48AN1) e do lote 2, armazenadas por 24 meses em ambiente natural (24AN2) e em câmara fria (24CF2), sem embeber ou embebidas em placas de petri, sobre papel de filtro umedecido com água destilada por 24 horas foram triturados em moinho de bolas.

O procedimento usado para a extração de óleos para estudos foi o descrito por TRIEBOLD & AURAND (1963). O material triturado foi transferido para cartuchos de papel de filtro colocados em extratores "BUTT" acoplados a balões de boca esmerilhada e fundo chato contendo aproximadamente 80 ml de hexano e mantido durante 10 horas sob aquecimento a cerca de 70°C. Após esse período, o solvente foi evaporado à temperatura de cerca de 70°C em evaporador rotativo.

2.8. Dosagens bioquímicas

2.8.1. Açúcares solúveis totais e polissacarídeos solúveis em água (WSP)

As dosagens de açúcares solúveis totais e de polissacarídeos solúveis em água foram feitas segundo a metodologia descrita por YEMM & WILLIS (1954), com 3 repetições por amostra.

Foi utilizada antrona da SIGMA CHEMICAL Co a 2% dissolvida em ácido sulfúrico 95%. Em tubos de ensaio foram colocadas alíquotas de 1 ml dos extratos obtidos em 2.7.2 e 2.7.4, respec-

tivamente, adicionados 2 ml do reagente antrona, agitados, vedados e aquecidos em banho-maria a 100°C por 5 minutos, sendo a seguir resfriados.

As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro MICRONAL a 620 nm e os cálculos feitos a partir de uma reta padrão obtida com a utilização de concentrações de 10 a 70 ug de dextrose (dextrose anidropó da BARKER ANALYZED REAGENT, J.T.) por ml de água destilada.

2.8.2. Amido

A quantificação do amido foi feita de acordo com McCREADY *et alii* (1950), nos extratos obtidos com PCA a 30%, em 2.7.4, utilizando-se o reagente de antrona e procedendo-se como no item anterior. Os valores encontrados nas leituras a 620 nm foram multiplicados pelo fator 0,9 para conversão a amido, sendo que os cálculos das quantidades foram feitos a partir da reta padrão de glicose com concentrações de 10 a 70 ug/ml de ácido perclórico (PCA) a 30%.

2.8.3. Aminoácidos livres

A dosagem de aminoácidos livres foi realizada de acordo com YEMM & COCKING (1955), utilizando-se 3 repetições por amostra.

Alíquotas de 1 ml de extrato obtido em 2.7.2 foram colocadas em tubos de ensaio, seguidos de 0,5 ml de tampão citrato 0,2 M a pH 5,0 (2,10g de ácido cítrico em 50 ml de água destilada e 2,94g de citrato de sódio em 50 ml de água destilada); 0,2 ml

de ninhidrina a 5% (p/v) em metilcelusolve e 1,0 ml de cianeto de potássio (KCN) a 2% (v/v) de uma solução de concentração a 0,01 M em metilcelusolve. A seguir, os tubos foram agitados, cobertos com bolas de vidro e colocados em banho-maria à temperatura de cerca de 100°C por 20 minutos, sendo então colocados para resfriar em água à temperatura de cerca de 25°C por 5 minutos. Posteriormente, completou-se o volume para 4 ml com etanol 60%.

As leituras de absorbância foram feitas a 570 nm em espectrofotômetro MICRONAL e os cálculos de aminoácidos livres obtidos a partir de uma reta padrão feita com leucina nas concentrações de 20 a 100 umoles, de acordo com SMITH & AGIZA (1951).

2.8.4. Proteínas

As proteínas foram dosadas pelo método de "Dye Binding" (BRADFORD, 1976), sendo utilizada solução de Coomassie Brilliant Blue, preparada com a dissolução de 100 mg do Coomassie Brilliant Blue G-250 (SIGMA CHEMICAL Co.) em 50 ml de etanol a 95%. Posteriormente, foram adicionados 100 ml de ácido ortofosfórico (H₃PO₄) a 85% (p/v) e o volume final ajustado para 1.000 ml, com água destilada. A solução foi então filtrada a vácuo.

As dosagens foram feitas com 3 repetições por amostra do estrato obtido em 2.7.3, colocando-se alíquotas de 0,1 ml da amostra em tubos de ensaio e adicionando-se 5,0 ml da solução reagente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro MICRONAL a 595 nm, após 2 minutos de iniciada a reação.

O cálculo da concentração de proteínas nos extratos foi feito com base na reta padrão obtida com a utilização de concen-

trações de 20 a 100 ug de soroalbumina bovina - BSA (SIGMA CHEMICAL Co.) em volume de 0,1 ml.

A calibração da concentração 100 ug/0,1 ml de BSA foi feita com base no conhecimento da densidade ótica: absorbância de 0,60 a 280 nm, determinada em espectrofotômetro "VARIAN".

2.8.5. Determinação do conteúdo de óleo

O resíduo obtido em 2.7.5 contendo o óleo, foi colocado em estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, até a evaporação total do hexano. Posteriormente, procedeu-se a pesagem do balão e a determinação do teor de óleo, sendo o material a seguir utilizado para as dosagens de ácidos graxos totais, livres e peróxidos.

2.8.6. Ácidos graxos totais

A dosagem de ácidos graxos totais foi feita segundo a metodologia descrita por HARTMAN & LAGO (1973). Do óleo obtido em 2.7.5, foi retirada uma alíquota e transferida para um balão de boca esmerilhada e fundo chato, onde foi processada a saponificação pela adição de 5 ml de solução metanólica de hidróxido de potássio na concentração de 0,5 N. Este material foi mantido sob refluxo, sobre manta aquecedora, durante 5 minutos. Posteriormente, foi feita a esterificação (60 ml de metanol; 3 ml de ácido sulfúrico concentrado e 2g de cloreto de amônio) e a solução foi mantida sob refluxo em manta aquecedora por 3 minutos. A seguir, com o material à temperatura ambiente (cerca de 25°C), foram feitas 2 lavagens com 5 ml de hexano, sendo que as frações superiores contendo hexano, foram juntadas e lavadas pelo menos duas vezes

com igual volume de água destilada para remoção da fase inorgânica. A água de lavagem foi descartada e a fase do solvente (hexânica) foi filtrada em sulfato de sódio anidro para remoção de traços de água e o hexano evaporado à temperatura ambiente (de cerca de 25°C). O óleo obtido acima foi redissolvido em quantidade conhecida de hexano (cerca de 1.000 µl) e injetado em cromatógrafo a gás para a separação e identificação dos ésteres metílicos.

O cromatógrafo usado foi o 37 - D, com detector de ionização de chamas da Instrumentos Científicos C.G. Ltda., equipado com coluna de vidro de 150 cm X 0,32 cm de diâmetro interno, contendo dietilenoglicolsuccinato 10% (v/v) (DEGS) em chromosorb W - AW DMCS 100 - 120 MESH, a 182°C. Foi injetado cerca de 0,8 µl do extrato para se obterem os cromatogramas.

A identificação dos ácidos graxos foi feita comparando-se o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os tempos de retenção dos padrões. O cálculo da concentração de cada ácido graxo foi feito com base na determinação da área dos triângulos de cada pico.

2.8.7. Ácidos graxos livres

Para a dosagem dos ácidos graxos livres retiraram-se alíquotas de óleo extraído em 2.7.5, seguidas de esterificação e cromatografia gasosa conforme 2.8.6.

2.8.8. Peróxidos

O índice de peróxido foi determinado de acordo com o método oficial da AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (1975).

Ao resíduo, cerca de 200 mg, obtido no item 2.7.5, após pesagem do óleo, foram adicionados 10 ml de uma solução de ácido acético concentrado e clorofórmio na razão de 3 : 2 (v/v), com agitação intermitente para completa dissolução do resíduo (cerca de 1 minuto). A seguir, foram adicionados 0,5 ml de solução saturada de iodeto de potássio, e a mistura foi mantida em repouso com agitações ocasionais durante um minuto. Posteriormente foram adicionados 10 ml de água destilada ao frasco contendo o material e procedida a titulação com solução de tiossulfato de sódio a 0,01 N padronizada segundo ASSUNÇÃO & MORITA (1968), usando amido como indicador. Foi feita uma prova em branco para efeito de cálculo e a concentração de peróxidos expressa em ueq de peróxido/g de semente.

2.9. Determinação da curva espectral da água de lavagem

Cinco sementes do lote 2 antes da estocagem e após 6 meses de armazenamento em câmara fria (6CF2) e em ambiente natural (6AN2); do lote 1 após 30 meses de estocagem em ambiente natural (30AN1) e sementes recém-colhidas (N3), foram colocadas para embeber em 15 ml de água destilada. Uma alíquota de 3 ml da água de lavagem de sementes recém-colhidas foi colocada em cubeta de quartzo; usando-se um espectrofotômetro "VARIAN" foi determinada a absorbância dessa solução no intervalo de 230 a 530nm. Posteriormente, a absorbância da água de lavagem foi sempre de-

terminada a 264nm. As determinações foram feitas a cada 10 minutos e até 60 minutos.

2.10. Análise da água de lavagem das sementes

Três repetições de 10 sementes dos lotes de sementes recém-colhidas (N5); armazenadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2) e estocadas por 48 meses em ambiente natural (48AN1) foram imersas em 10 ml de água deionizada e mantidas em ambiente de laboratório por 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 240 e 720 minutos. Após estes tempos, as sementes foram retiradas e a água de lavagem analisada quanto ao efluxo de eletrólitos (SIMON & RAJA HARUN, 1972), em condutivímetro modelo OK - 102/1 (RADELKIS ELETROCHEMICAL INSTRUMENTS), efluxo de solutos orgânicos em espectrofotômetro "VARIAN" a 264nm (POLLOCK, 1969) e conteúdo de aminoácidos livres e carboidratos solúveis, segundo a metodologia descrita em 2.8.

3. TESTES ENVOLVENDO GERMINAÇÃO E VIGOR DAS SEMENTES

3.1. Testes de germinação e vigor realizados em placas de petri

Placas de petri de 9 cm de diâmetro forradas com 2 folhas de papel de filtro foram esterilizadas a 80°C por 3 horas, umedecidas com solução de paraformaldeído a 2% e colocadas em câmara por 24 horas para eliminação do resíduo de paraformaldeído. O papel de filtro foi então umedecido com água destilada.

Foram colocadas para germinar 20 sementes por placa de petri e utilizadas 5 repetições por tratamento. Os resultados destes experimentos foram tomados em número de sementes que apre-

sentaram protrusão de radícula após 1 e 3 dias. Destarte, 24 horas após a semeadura, as sementes que apresentavam protrusão de radícula foram eliminadas das placas, o número de sementes calculado em porcentagem de germinação e as placas contendo as sementes que não haviam completado a germinação (protrusão de radícula) retornaram à câmara de germinação e nova avaliação foi feita aos 3 dias após a semeadura, quando então todo o material foi eliminado.

3.1.1. Efeito da temperatura

Os testes de germinação em placas de petri foram conduzidos sob temperaturas constantes de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 40°C e sob temperaturas alternadas de 25-5°C e 25-40°C, com duração de 12-12 horas ou de 16-8 horas, em câmara de crescimento "FORMA SCIENTIFIC" modelo 24.

3.1.2. Efeito da luz branca

Para o estudo do efeito de luz, diferentes comprimentos de ondas foram estudados.

Os experimentos feitos sob luz branca foram montados em placas de petri, mantidas sob luz contínua em estufa incubadora para B.O.D. marca "FANEM", modelo 347 F equipada com 4 lâmpadas fluorescentes marca "SILVÂNIA" de 20W.

Quando os experimentos foram montados no escuro, as placas de petri contendo as sementes foram colocadas em 2 sacos de polietileno preto, e a verificação da germinação foi feita em câmara escura equipada com luz verde, cujo espectro dá um pico a 525 nm, de $0,02 \text{ mw.cm}^{-2}.\text{nm}$ (USBERTI, 1979).

3.1.3. Efeito da luz vermelha e do vermelho extremo

Para avaliação dos efeitos do comprimento de ondas do vermelho as placas de petri foram mantidas em câmaras de germinação equipadas com lâmpadas fluorescentes vermelhas marca "SILVANIA", de 20W e filtros montados com 2 folhas de papel celofane vermelho, enquanto para o vermelho extremo, as placas de petri foram colocadas em filtros montados com folhas de papel celofane azuis e vermelhas e expostas a lâmpadas incandescentes brancas, de $1,2 \mu\text{W.cm}^{-2}.\text{nm}$.

3.2. Testes de germinação e vigor realizados em rolos de papel

3.2.1. Avaliação de plântulas normais com 5 e 9 dias após a semeadura

Papel para germinação "GERMITEST" medindo 38 x 28 cm, esterilizado por 3 horas a 80°C , foi utilizado nos testes de germinação em rolo.

Foram utilizadas 5 repetições de 20 sementes, colocadas sobre 2 folhas do papel com uma terceira folha para cobertura, que foram enroladas em forma de cartucho, contendo externamente uma folha de polietileno.

As extremidades inferiores dos rolos de papel foram mantidas imersas em água destilada. Os rolos foram mantidos em câmara de crescimento estufa incubadora para B.O.D., marca "FANEN", modelo 347 F a 25°C sob luz contínua.

Após 5 e 9 dias foi contado o número de sementes germinadas, de acordo com o manual de Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1976), considerando-se germinada toda semente que pelo

desenvolvimento das estruturas essenciais de seu embrião, demonstrasse aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo. Assim, 5 dias após a semeadura os rolos foram abertos, retiradas as plântulas consideradas normais e os rolos contendo o restante das plântulas e sementes não germinadas foram novamente mantidos em germinador até o 9^o dia quando então as plântulas restantes foram classificadas em plântulas normais, plântulas anormais e computadas as sementes deterioradas.

Foram chamadas plântulas normais aquelas capazes de continuar seu desenvolvimento para dar formação a plantas normais. Essas plântulas possuíam as seguintes estruturas essenciais: sistema radicular bem desenvolvido; hipocótilo bem desenvolvido e intacto, sem lesões que atingissem os tecidos vasculares; epicótilo intacto, com a gema normal; presença dos 2 cotilédones.

Foram consideradas plântulas anormais aquelas que mostraram incapacidade para continuar seu desenvolvimento e formar plantas normais. Essas plântulas apresentavam defeitos ou danos tais como: falta de cotilédones; lesões que afetassem os tecidos vasculares do epicótilo, hipocótilo ou raiz; raízes atrofiadas; plântulas com aspecto hialino e vítreo.

3.2.2. Comprimento de radícula de plântulas após 4 dias

As plântulas usadas neste teste foram obtidas através de germinação em rolo de papel conforme descrito em 3.2.1 e foram utilizadas 5 repetições de 10 sementes.

A disposição das sementes no rolo foi feita de modo que as radículas ficassem voltadas para baixo, POPINIGIS (1977).

As radículas foram medidas 4 dias após o início do teste, sendo usadas apenas as plântulas que apresentavam a radícula bem desenvolvida e foi calculado o comprimento médio por plântula.

3.2.3. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 8 dias

O peso da massa de matéria seca de plântulas com 8 dias após a semeadura foi obtido individualmente das mesmas plântulas (plântulas inteiras) usadas no teste de comprimento de radícula em 3.2.2.

Os materiais foram transferidos para estufa "FANEM", modelo 320-SE e mantidos a 80°C durante 48 horas; posteriormente, foram pesados em balança analítica modelo WA-33, com precisão de 0,0001g.

3.3. Testes de germinação e vigor realizados em caixas contendo vermiculita em casa de vegetação

3.3.1. Índice de velocidade de emergência

Os testes foram conduzidos em caixas de madeira de 200 x 120 x 20 cm contendo vermiculita lavada.

Foram utilizadas 5 parcelas de 20 sementes distribuídas em linhas de um metro de comprimento com espaçamento de 30 cm e as sementes foram semeadas a 2 cm de profundidade com espaçamento de 5 cm dentro das linhas.

As caixas de madeira foram mantidas em casa de vegetação sem controle de luz, temperatura ou umidade. A vermiculita foi umedecida diariamente com água de torneira.

Para a determinação do índice de velocidade de emergência o número de plântulas emergidas em cada linha foi anotado diariamente até tornar-se constante.

O índice de velocidade de emergência para cada tratamento foi obtido segundo a fórmula proposta por MAGUIRE (1962):

$$IVE = \frac{N_1}{D_1} + \frac{N_2}{D_2} + \dots + \frac{N_n}{D_n}$$

IVE = índice de velocidade de emergência;

$N_1, N_2 \dots N_n$ = número de plântulas emergidas;

1, 2 e n = dias após a semeadura respectiva;

$D_1, D_2 \dots D_n$ = número de dias decorridos da semeadura à primeira, segunda à última contagem, respectivamente.

3.3.2. População final após 14 dias

Foi considerada população final a porcentagem de plântulas emergidas até o 14^o dia após a semeadura.

3.3.3. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 14 dias

O peso da massa de matéria seca de plântulas com 14 dias após a semeadura foi determinado por plântula, utilizando-se as mesmas plântulas dos testes de índice de velocidade de

emergência e população final; foi determinado o peso de matéria seca apenas da parte localizada acima do solo.

Os materiais foram transferidos para estufa "FANEM", modelo 320-SE e mantidos a 80°C durante 48 horas; posteriormente, foram pesados em balança analítica modelo WA-33, com precisão de 0,0001g.

3.4. Estudo da distribuição da massa de matéria seca em eixos e cotilédones com zero, 12 e 24 meses de armazenamento

Esse teste foi feito em sementes do lote 2 antes da estocagem e após 12 e 24 meses de armazenamento em câmara fria e ambiente natural.

Foram colocadas para germinar 200 sementes por tratamento, conforme descrito em 3.1 e, em intervalos de 24 horas após a semeadura durante 120 horas, 10 plântulas foram retiradas da câmara de germinação, separados eixos e cotilédones e determinado o peso de matéria seca conforme descrito em 3.2.3.

3.5. Mudança no teor relativo de água

Sementes do lote 2 armazenadas em câmara fria e em ambiente natural por diferentes períodos foram mantidas em câmaras úmidas até que atingissem cerca de 30% de umidade e em estufa "FANEM" com ventilação forçada a 30°C até que atingissem cerca de 6% de umidade.

As câmaras úmidas foram feitas em recipientes plásticos forrados internamente com 2 folhas de papel de filtro contendo uma lâmina de água de cerca de 1 cm.

Sementes assim tratadas foram submetidas ao teste de germinação em placas de petri como descrito em 3.1.

Os níveis de umidade das sementes foram calculados conforme descrito em 2.

3.6. Determinação da época de mudança do estágio de plântula para planta

Esse teste foi conduzido em sementes do lote 2 antes do armazenamento e após a estocagem por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural.

Foram colocadas para germinar 5 sementes por vaso com capacidade para 5 litros, contendo vermiculita. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e regados diariamente com 300 ml de água destilada até o 3^o dia. Posteriormente, os vasos contendo plântulas de cada tratamento foram divididos em 2 lotes de 30 vasos e um lote passou a receber 300 ml por vaso de solução de Hoagland de 3 em 3 dias, enquanto o outro continuou a receber água destilada.

Os resultados foram avaliados de 3 em 3 dias até o 12^o dia e diariamente até o 21^o dia, no caso de sementes não estocadas, e de 3 em 3 dias durante todo o experimento, no caso de sementes estocadas.

As 4 plântulas melhor desenvolvidas de cada vaso (5 plântulas por tratamento) foram selecionadas, lavadas em água corrente, separadas em sistema radicular, cotilédones e parte aérea e transferidas para estufa "FANEM", modelo 320-SE com ventilação forçada à temperatura de 80^oC durante 48 horas. Após este

período o material foi pesado em balança analítica modelo WA-33, com precisão de 0,0001g.

3.7. Tratamento com temperatura e umidade relativa altas

Sementes recém-colhidas (lote 5) e sementes com 24 meses de armazenamento (lote 2) em ambiente natural e em câmara fria foram submetidas à técnica do envelhecimento precoce, segundo DELOUCHE & BASKIN (1973).

As sementes foram colocadas em sacos de fios de malha de nylon trançados com aberturas de 1mm, suspensos em câmara de envelhecimento precoce marca "ELOS" com umidade relativa de 100% e temperatura de 42°C. Subamostras foram retiradas da câmara após 24, 48 e 72 horas, e imediatamente determinados seu teor de umidade como descrito em 2.2, sua germinação e vigor como descrito em 3 e foram determinados seus teores de aminoácidos livres, açúcares solúveis totais, proteínas, polissacarídeos solúveis em água e amido, como descrito em 2.7 e 2.8.

4. TESTES REALIZADOS "IN SITU"

4.1. Preparação de cortes histológicos

Foram utilizadas sementes recém-colhidas (N4), sementes armazenadas por 21 meses em câmara fria a 5°C $\pm$ 1°C e em ambiente natural nas condições de Campinas (SP) e por 45 meses em ambiente natural nas condições de Alegre (ES).

4.1.1. Fixação

Eixos embrionários e cotilédones isolados de sementes recém-colhidas e com 21 e 45 meses de armazenamento, "in natura" e com 24 horas de embebição foram fixadas em solução aquosa de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 5%, em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,4 durante 24 horas a 5°C (KIERNAN, 1981).

Para o preparo da solução de paraformaldeído foram tomados 20 gramas de paraformaldeído em 250 ml de água destilada a 65°C seguida da adição de algumas gotas de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M até a solução ficar límpida. Após o esfriamento da solução, foram acrescentados 25 ml de glutaraldeído e o volume completado para 500 ml com tampão fosfato à concentração de 0,2 M a pH 7,4 (114,75 ml de solução 0,2 M de Na_2HPO_4 e 35,25 ml de solução 0,2 M de NaH_2PO_4).

4.1.2. Inclusão e corte

Após a fixação, o material foi desidratado durante 1 hora em cada uma das seguintes soluções de etanol 70; 80; 95; 100 e 100%, diafanizado em xilol por 15 minutos e, posteriormente, deixado em óleo de cedro para término da diafanização, durante 45 dias (POLICARD *et alii*, 1957).

Decorrido o período de diafanização, o material foi lavado em xilol, incluído em parafina e seccionado em micrótomo (R. JUNG-HEIDELBERG), em cortes com 8 micrômetros de espessura. Procedeu-se então a desparafinização em banhos sucessivos de xilol e metanol-clorofórmio 1/1 v/v e reidratação posterior, durante 5

minutos, em cada uma das soluções de etanol de 100, 100, 95, 80 e 70%.

4.1.3. Métodos de coloração

Hematoxilina-eosina (HE)

Os cortes foram corados em hematoxilina de Erlich durante 7 minutos, submetido a banho em água destilada por 12 minutos; sendo em seguida corado durante 10 minutos pela eosina e desidratado rapidamente em álcool 95 e 100%. Posteriormente, o material foi diafanizado em xilol durante 10 minutos e montado em bálsamo do Canadá ($n_D = 1,54$), para visualização geral das células.

A hematoxilina de Erlich foi preparada adicionando-se 0,06% de hematoxilina em um volume de álcool de 95%; um volume de glicerina; um volume de água destilada e 0,1 volume de ácido acético glacial e, a solução de eosina, adicionando-se 0,5% de eosina em etanol 95% (MAIA, 1979).

Xylidine Ponceau (XP)

O cortes foi corado em solução aquosa de ácido acético a pH 2,5 e xylidine Ponceau a 0,1% durante 15 minutos à temperatura ambiente, para detecção de radicais NH_3 totais, a seguir, os cortes foram lavados em ácido acético a 2% durante 30 minutos, desidratados em etanol 95 e 100%, diafanizados em xilol e montados em bálsamo do Canadá (VIDAL, 1970).

O xylidine Ponceau a pH 2,5 foi preparado pela dissolução de xylidine Ponceau em ácido acético a 2% a uma concentração final de 0,1%.

Azul de toluidina (AT)

Procedeu-se a coloração dos cortes em azul de toluidina 0,025% a pH 4,0 em tampão Mc Ilvaine durante 15 minutos à temperatura ambiente, para detecção de radicais aniônicos e de metacromasia. Os cortes foram então lavados rapidamente em água destilada, secos ao ar, diafanizados em xilol durante 10 minutos e montados em bálsamo do Canadá (VIDAL, 1977).

Preparou-se a solução de azul de toluidina dissolvendo-se azul de toluidina em tampão Mc Ilvaine a pH 4,0 (61,5 ml de ácido acético na concentração de 0,1 M e 38,5 ml de Na_2HPO_4 na concentração de 0,2 M), a uma concentração de 0,025%.

4.2. Análise do material

Os materiais, após os diversos métodos de coloração, foram observados em microscópio Pol-Zeiss, com e sem luz polarizada e fotografados.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os experimentos analisados, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, à exceção das dosagens bioquímicas onde utilizaram-se três repetições.

Nos experimentos de germinação, para normalização dos dados, os valores obtidos em porcentagem, quando necessário, foram transformados em valores angulares ($\text{ângulo} = \arcsin \sqrt{p}$, onde p representa a porcentagem de sementes germinadas), de acor

do com SNEDECOR (1962), utilizando-se as tabelas de FISHER & YATES (1971).

As análises dos dados foram feitas em microcomputador, utilizando-se o programa "microstat". Para os experimentos com dois tratamentos procedeu-se a comparação das médias utilizando-se o teste T e na análise de variância foi usado o teste F (SNEDECOR & COCHRAN, 1967), sendo que para a comparação entre médias, quando houve diferença significativa entre os tratamentos, foi calculada a diferença mínima significativa (DMS) ao nível fiducial de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (STEEL & TORRIE, 1980).

RESULTADOS

1. Composição das sementes

A TABELA 1 mostra a composição de eixos embrionários e cotilédones de sementes com peso aproximado de 155 mg (sendo 2,85 mg do eixo e 153 dos cotilédones) e com capacidade de germinação de cerca de 94%, após 34 meses de estocagem em câmara fria.

No eixo embrionário a maior concentração encontrada foi de proteínas, cerca de 0,62 mg, seguida de açúcares solúveis 0,54 mg, amido 0,23 mg, óleo 0,18 mg e em menor quantidade os polissacarídeos solúveis em água (WSP) 0,09 mg. O conteúdo de aminoácidos foi de 0,79 μ moles e o de cinzas de 0,18 mg.

Em cotilédones o componente que se apresentou em maior concentração foi o amido, cerca de 72,96 mg, seguido de proteínas 45,68 mg, açúcares solúveis 8,40 mg, WSP 5,38 mg e em menor quantidade o óleo 2,30 mg. O teor de aminoácidos encontrado em cotilédones foi de cerca de 8,61 μ moles e o de cinzas de 5,2 mg.

2. Conteúdo de cinzas nas sementes

O conteúdo de cinzas (TABELA 2) em sementes inteiras não embebidas foi maior em sementes do lote 1 com 58 meses de armazenamento em ambiente natural do que em sementes do lote 2; neste, as sementes armazenadas em ambiente natural apresentaram maior conteúdo de cinzas do que as mantidas em câmara fria.

TABELA 1. Composição de eixos e cotilédones de sementes de *Phaseolus vulgaris* do lote 2, após 34 meses de armazenamento em câmara fria.

	eixos	cotilédones
	(mg)	(mg)
amido	0,23	72,96
proteínas	0,62	45,68
açúcares solúveis totais	0,54	8,40
polissacarídeos solúveis em água	0,09	5,38
lipídios	0,18	2,30
aminoácidos livres (µmoles)	0,79	8,61
cinzas	0,18	5,20

TABELA 2. Conteúdo de cinzas (mg/semente) em sementes inteiras e em eixos e cotilédones isolados de sementes do lote 2 armazenadas por 34 meses em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 armazenadas por 58 meses em ambiente natural, sem embeber e após 24 horas de embebição.

condições de armazenamento	sementes inteiras		eixos		cotilédones	
	e m b e b i ç ã o (h o r a s)					
	0	24	0	24	0	24
34CF2	5,72	4,92	0,18	0,20	5,20	5,40
34AN2	5,80	5,24	0,18	0,18	5,24	5,16
58AN1	6,36	1,96	0,18	0,16	5,80	1,04

Quando eixos embrionários e cotilédones foram isolados de sementes não embebidas verificou-se que o armazenamento não afetou o conteúdo de cinzas dos eixos e que em cotilédones o padrão foi semelhante ao encontrado em sementes inteiras.

A embebição por 24 horas determinou redução no conteúdo de cinzas de sementes inteiras em todos os tratamentos, sendo esta bem mais acentuada em sementes armazenadas por período mais longo (58 meses) em ambiente natural (58AN1). A embebição por 24 horas determinou pequenas variações nos teores de cinzas dos eixos e, reduziu em cotilédones de sementes armazenadas em ambiente natural, sendo este efeito bem mais marcante em sementes mais velhas; em cotilédones de sementes armazenadas em câmara fria a embebição elevou o teor de cinzas.

3. Umidade das semente

A TABELA 3 mostra o teor de umidade das sementes do lote 2, armazenadas em câmara fria e em ambiente natural pelo período de 36 meses durante o qual elas foram usadas para testes.

4. Peso de mil sementes

De acordo com os resultados da TABELA 4, verifica-se que os lotes de sementes oriundos de multiplicação de sementes básicas provenientes da Fazenda Experimental de Linhares apresentaram pesos maiores do que lotes de sementes oriundos de multiplicação de sementes em sementeiras do Instituto de Biologia da UNICAMP, à exceção do lote 4, onde o peso e o coeficiente de variação foram mais elevados.

TABELA 3. Níveis de umidade de sementes do lote 2 estocadas em Campinas em câmara fria (CF) e em ambiente natural (AN) por 36 meses.

meses	1985		1986		1987		1988	
	CF	AN	CF	AN	CF	AN	CF	AN
JAN	----	----	11,07	12,90	9,76	13,41	9,21	13,44
FEV	----	----	10,55	13,17	8,89	12,09	9,08	13,69
MAR	----	----	10,74	13,91	9,07	13,81	8,84	13,69
ABR	----	----	10,60	12,77	9,22	12,60	8,29	12,88
MAI	----	----	11,18	13,83	9,42	12,93	8,08	9,74
JUN	----	----	11,09	13,91	8,45	13,29	8,19	9,93
JUL	----	----	11,12	12,18	8,90	13,01	7,96	9,21
AGO	13,95	13,95	10,91	12,24	8,84	11,23	7,65	8,73
SET	12,18	12,23	10,63	11,85	8,16	11,79	----	----
OUT	11,19	13,76	10,39	12,97	8,71	10,98	----	----
NOV	11,33	11,26	9,77	10,72	8,50	11,93	----	----
DEZ	11,21	11,45	10,04	12,36	8,87	12,84	----	----

TABELA 4. Peso de mil sementes determinado imediatamente após a colheita e redução do teor de umidade a cerca de 14%.

lote	procedência	ano	peso (g)	variância (V)	desvio padrão	coeficiente variação - %
1	Linhares	1983	166,69	0,004	0,06	0,38
2	Linhares	1985	163,98	0,086	0,29	1,86
3	UNICAMP	1986	153,46	0,291	1,30	3,66
4	UNICAMP	1987	170,08	0,164	0,41	2,38
5	UNICAMP	1987	154,10	0,405	0,61	4,33
6	UNICAMP	1988	155,55	0,374	1,67	3,93

5. Curva de embebição

Para estudo da fisiologia da germinação da semente de feijão durante o armazenamento, determinou-se inicialmente e após 24 meses de estocagem a curva de embebição das sementes do lote 2 e após 48 meses das sementes do lote 1 (FIGURAS 1 e 2).

A embebição de sementes não armazenadas (FIGURA 1) mostrou-se rápida até 2 horas e menos intensa entre 2 e 8 horas. Entre 8 e 12 horas notou-se que a embebição havia praticamente se estabilizado.

A FIGURA 2 mostra curvas de embebição de sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2) e de sementes do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural (48AN1).

Sementes do lote 2, armazenadas em câmara fria apresentaram embebição rápida até 1 hora, entre 1 e 10 horas apresentaram uma embebição mais lenta porém gradativa e entre 10 e 12 horas praticamente não houve aumento no peso da massa de matéria fresca dessas sementes, enquanto sementes estocadas em ambiente natural apresentaram embebição rápida até 2 horas, entre 2 e 9 horas apresentaram embebição mais lenta e gradativa e a partir de 9 horas praticamente paralisou-se a embebição.

Sementes do lote 1 armazenadas em ambiente natural mostraram rápido aumento do peso de matéria fresca durante as 4 primeiras horas de embebição; e após esse período até 12 horas houve uma redução lenta, mas progressiva no peso.

FIGURA 1. Curva de embebição (% de aumento de peso) de sementes do lote 2 antes da estocagem

FIGURA 01

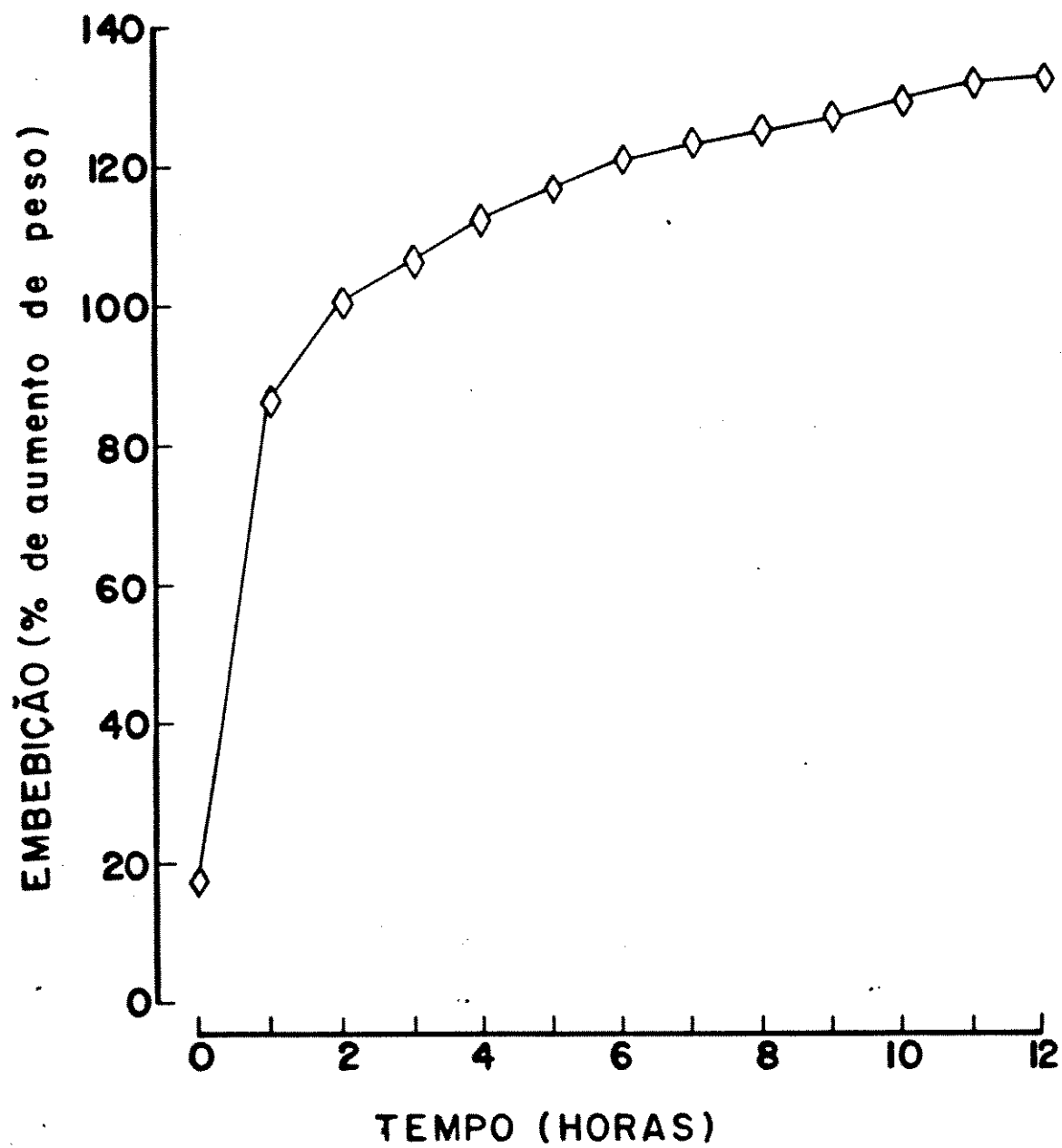
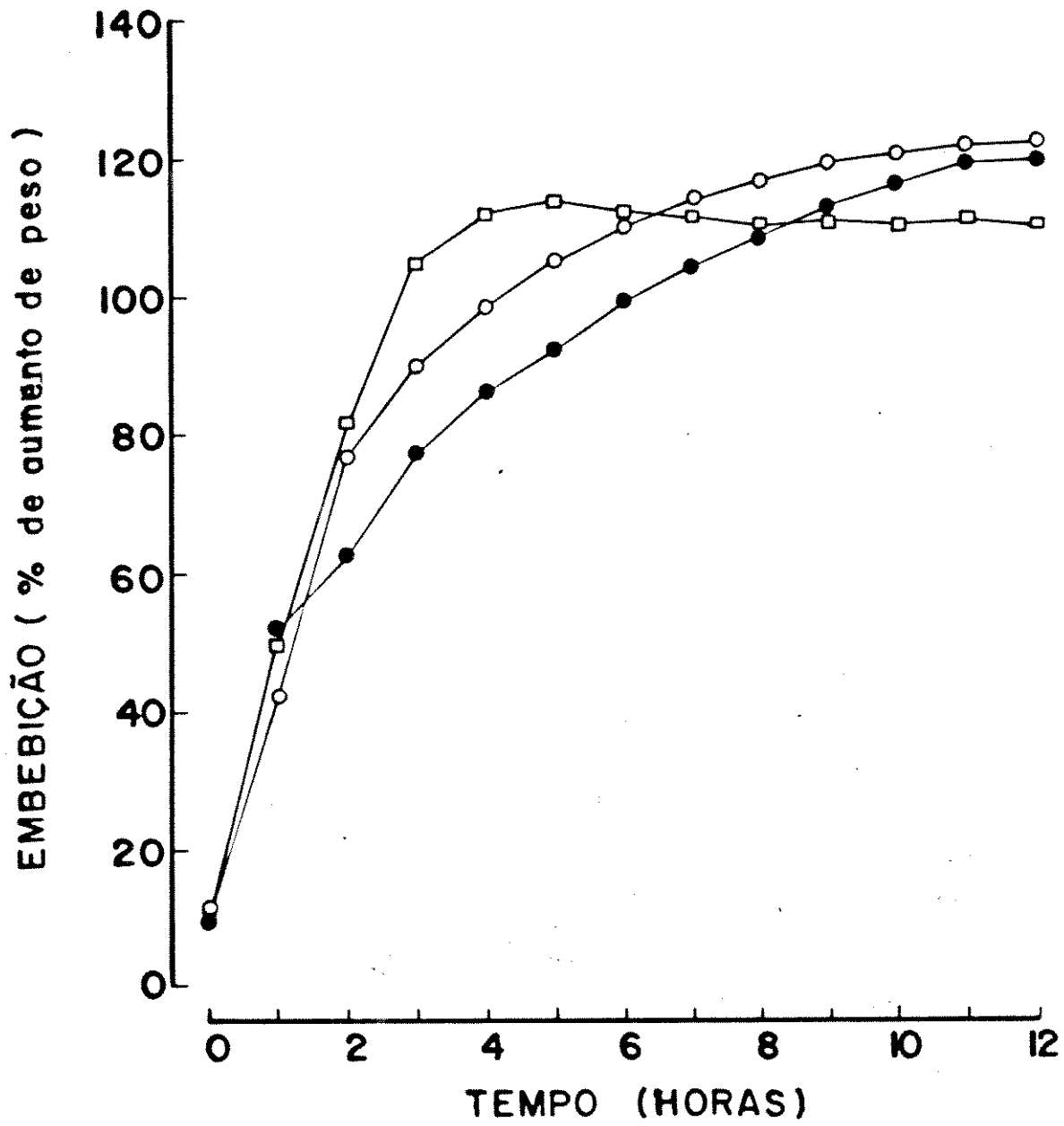


FIGURA 2. Curva de embebição (% de aumento de peso) de sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2) e de sementes do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural (48AN1)

● . 24CF2 ○ . 24AN2 □ . 48AN1

FIGURA 02



6. Estudo da distribuição da massa de matéria seca em eixos embrionários e cotilédones de zero a 24 meses de armazenamento

O aumento da massa de matéria seca no eixo e a redução em cotilédones por um período de 120 horas após a semeadura foi estudado em sementes do lote 2 não armazenadas e armazenadas por 12 e 24 meses em câmara fria e em ambiente natural (FIGURA 3).

Em sementes não estocadas (FIGURA 3A) observou-se um aumento gradativo no conteúdo de matéria seca do eixo e redução nos cotilédones até 120 horas de germinação.

A estocagem das sementes em câmara fria por 12 (FIGURA 3B) e 24 meses (FIGURA 3C) determinou uma redução no aumento do conteúdo de matéria seca no eixo e uma redução desse conteúdo em cotilédones após 24 meses de armazenamento. Quando a estocagem foi realizada em ambiente natural o efeito encontrado em câmara fria foi mais acentuado (FIGURAS 3B e C), especialmente no caso do armazenamento ter sido feito por 24 meses (FIGURA 3C).

7. Determinação da idade em que o eixo passa a utilizar nutrientes do substrato

Este estudo foi conduzido pela análise do aumento da massa de matéria seca em eixos e redução em cotilédones, até o 21^o dia após a semeadura.

A FIGURA 4 mostra que para sementes não armazenadas tanto em plântulas tratadas com água como em plântulas tratadas com solução de Hoagland houve redução gradativa na massa de matéria seca dos cotilédones até o 9^o dia após a semeadura

FIGURA 3. Conteúdo da massa de matéria seca (mg) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por 0, 12 e 24 meses, após 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas do início da embebição.

◆ . Cotilédones	◇ . Eixos
▲ . Cotilédones CF	● . Eixos CF
△ . Cotilédones AN	○ . Eixos AN

A. Antes da estocagem

B. Estocadas por 12 meses

C. Estocadas por 24 meses

FIGURA 03

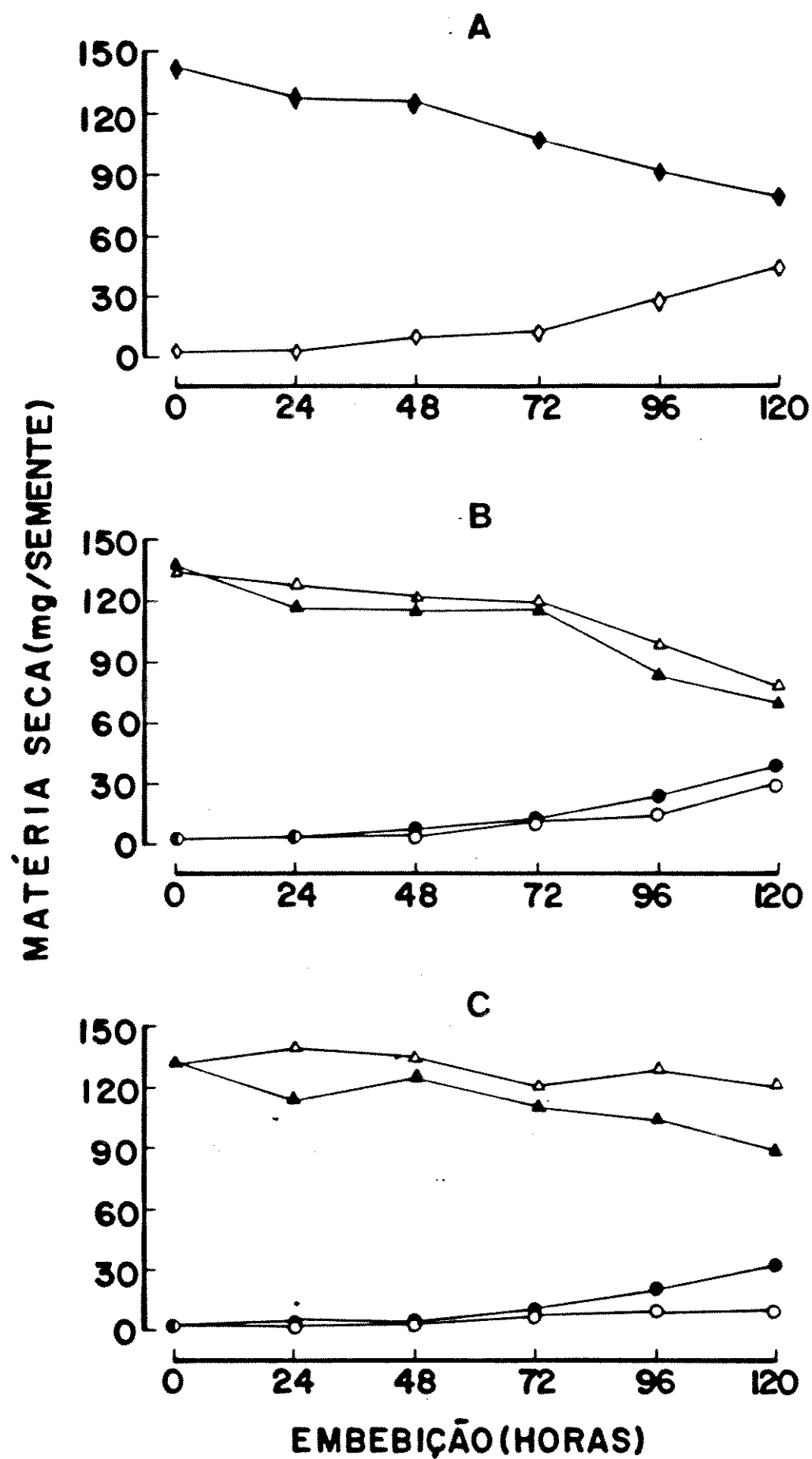


FIGURA 4. Conteúdo de massa de matéria seca em cotilédones e eixos oriundos de sementes do lote 2 antes da estocagem

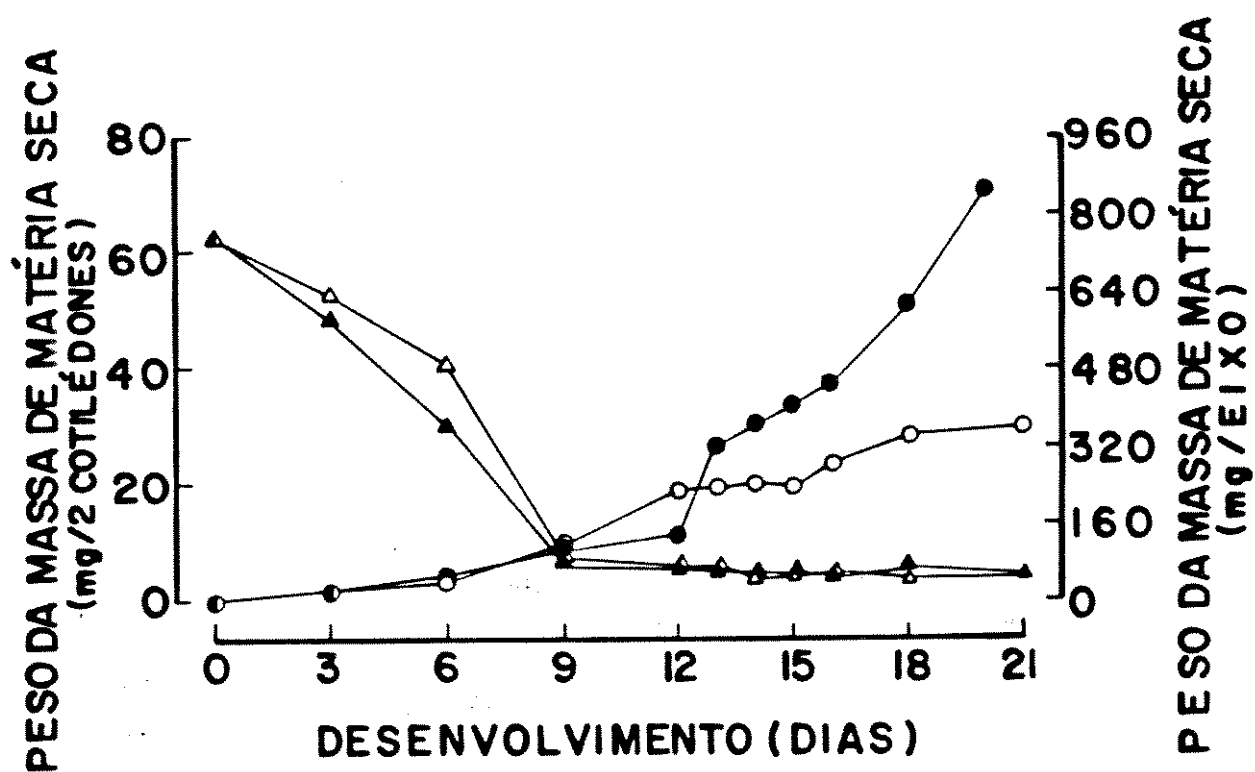
△. Cotilédones tratados com água

▲. Cotilédones tratados com Hoagland

○. Eixos tratados com água

●. Eixos tratados com Hoagland

FIGURA 04



A partir desta data até o final do experimento praticamente não houve variação no conteúdo de matéria seca de cotilédones.

A massa de matéria seca dos eixos aumentou durante todo o período de 21 dias após a semeadura, sendo que até o 12^o dia esse aumento foi semelhante em indivíduos tratados com água destilada e com solução de Hoagland.

Entre o 13^o e o 21^o dia o acúmulo de massa de matéria seca em indivíduos tratados com água foi lento indo de 237,85 mg a 361,08 mg por indivíduo, enquanto em indivíduos tratados com Hoagland esse acúmulo foi bem mais acentuado, indo de 318,87 a 846,23 mg por indivíduo.

No caso de sementes armazenadas por 24 meses, tanto em câmara fria como em ambiente natural, os tratamentos que receberam água (FIGURA 5A) apresentaram uma redução no conteúdo de matéria seca em cotilédones até 12 dias e entre 12 dias e o final do experimento a redução foi mínima. Por outro lado observou-se um aumento gradativo na massa de matéria seca de indivíduos provenientes de sementes estocadas em câmara fria ou em ambiente natural até o final do experimento.

O aumento de matéria seca de indivíduos oriundos de sementes armazenadas em câmara fria durante o período de condução do experimento, mostrou-se maior do que o conteúdo de matéria seca de eixos provenientes de sementes estocadas em ambiente natural.

Quando os tratamentos receberam solução de Hoagland (FIGURA 5B) a redução no conteúdo de matéria seca em cotilédones de sementes estocadas tanto em câmara fria como em ambiente natu-

FIGURA 5. Conteúdo de massa de matéria seca em eixos e cotilédones oriundos de sementes estocadas em câmara fria e em ambiente natural por 24 meses

● . Eixos 24CF2

○ . Eixos 24AN2

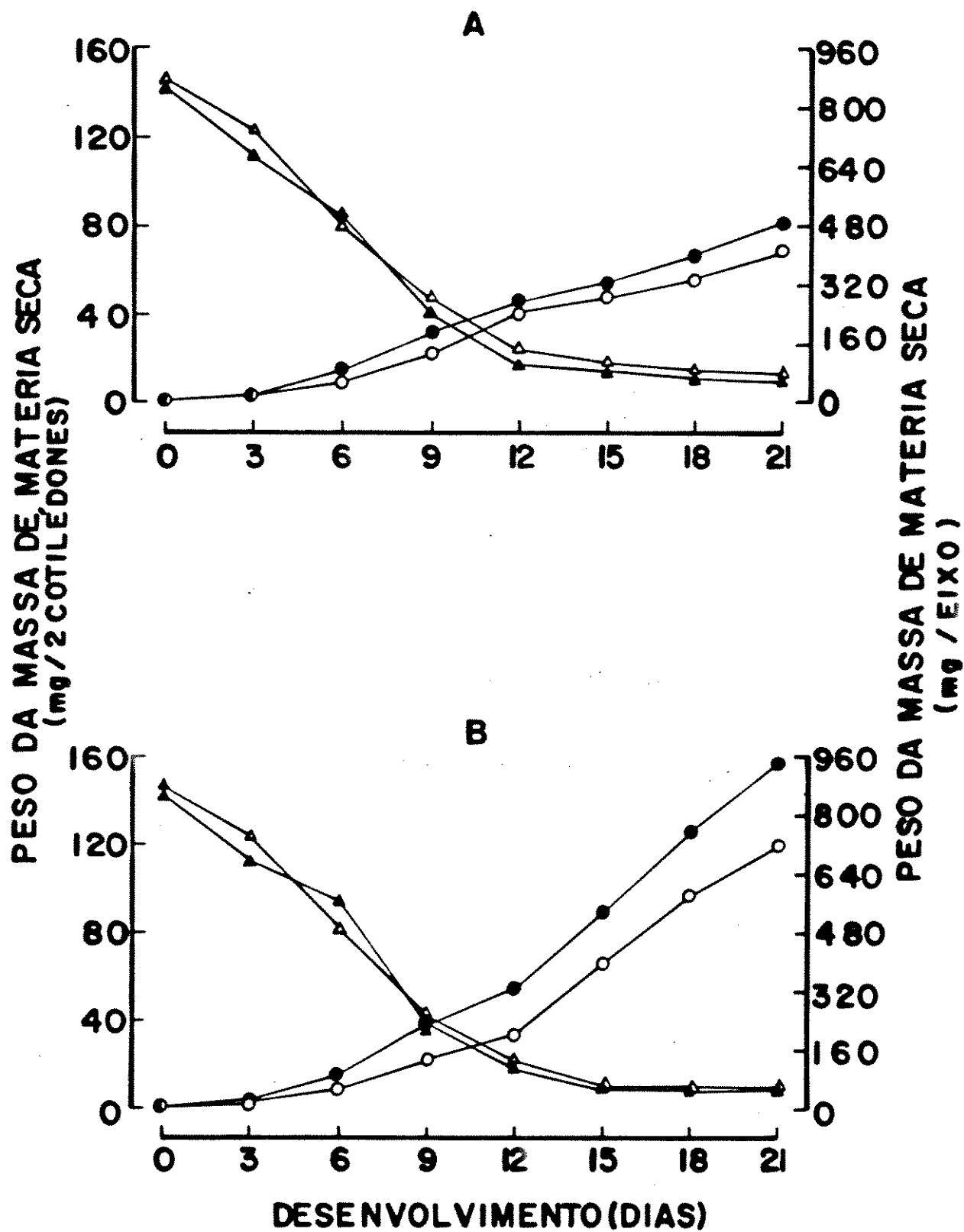
▲ . Cotilédones 24CF2

△ . Cotilédones 24AN2

A. Sementes tratadas com água

B. Sementes tratadas com Hoagland

FIGURA 05



ral foi observada até o 15^o dia após a semeadura; entre o 15^o e o 21^o dias praticamente não houve redução. Nos eixos, verificou-se um aumento gradativo até o final do experimento, sendo que a partir do 6^o dia foi sempre maior o conteúdo de matéria seca de plântulas provenientes de sementes de câmara fria.

Os tratamentos que receberam solução de Hoagland apresentaram maior acúlo de massa de matéria seca do que os que receberam água destilada a partir do 9^o dia para o armazenamento em câmara fria e do 15^o dia para ambiente natural até o final do experimento.

8. Germinação e vigor

8.1. Protrusão de radícula após 1 dia sob diferentes regimes de luz

O armazenamento de sementes em câmara fria por período de 18 meses não afetou a protrusão da radícula verificada 1 dia após a semeadura sob condições de luz branca, escuro, luz vermelha e vermelho extremo (FIGURAS 6A, B, C e D). Armazenamentos mais longos em câmara fria, reduziram gradativamente a porcentagem de protrusão de radículas.

O armazenamento em ambiente natural por período de 12 meses também não afetou a protrusão de radícula com 1 dia após a semeadura, sob as condições de luz testadas (FIGURAS 6A, B, C e D); armazenamentos por período de 12 a 21 meses determinaram redução crescente na porcentagem de protrusão, enquanto os mais longos não determinaram mudanças significativas em relação às encontradas em sementes com 21 meses, nas quatro condições de luz

testadas.

O armazenamento de sementes em ambiente natural determinou uma redução significativa ao nível de 5% na porcentagem de protrusão de radícula em comparação com a condição de câmara fria a partir de 12 meses até o final do experimento quando a protrusão foi estudada sob luz branca (FIGURA 6A) e a partir de 15 meses quando a protrusão foi estudada sob escuro e luz nos comprimentos de onda do vermelho e do vermelho extremo (FIGURAS 6B, C e D).

B.2. Protrusão de radícula após 3 dias sob diferentes regimes de luz

A estocagem de sementes até 36 meses (FIGURAS 6A, B, C e D) em câmara fria não afetou a protrusão de radícula com 3 dias após a semeadura sob luz branca, escuro, luz vermelha e vermelho extremo.

O armazenamento em ambiente natural não afetou a protrusão de radícula após 3 dias até 15 meses quando a protrusão foi estudada sob luz branca e até 12 nas demais condições de luz. Observou-se uma redução crescente estatisticamente significativa na porcentagem de protrusão de radícula em sementes entre 15 e 30 meses. Após 30 meses sob qualquer tratamento de luz a porcentagem de protrusão foi mantida constante.

As sementes estocadas em ambiente natural apresentaram redução estatisticamente significativa na porcentagem de protrusão em relação à câmara fria a partir de 12 meses sob luz branca e a partir de 15 meses sob escuro e luz nas faixas do vermelho e

FIGURA 6. Protrusão de radícula (arco seno $\sqrt{P}$), em sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, após 1 e 3 dias da semeadura.

●. CF 1 dia ○. AN 1 dia

▲. CF 3 dias △. AN 3 dias

A. Luz branca

B. Escuro

C. Vermelho

D. Vermelho-extremo

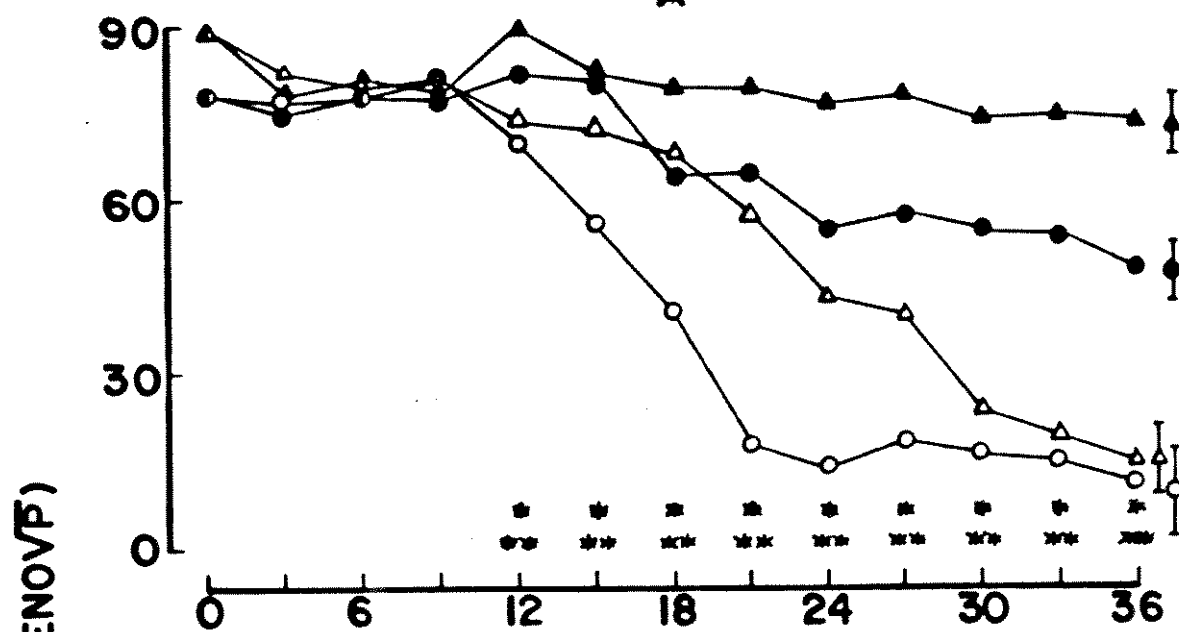
As barras verticais representam as DMS entre valores referentes aos 36 meses de tratamento.

* Diferença significativa ao nível de 5% entre CF e AN após 1 dias.

** Diferença significativa ao nível de 5% entre CF e AN após 3 dias

FIGURA 06

A



B

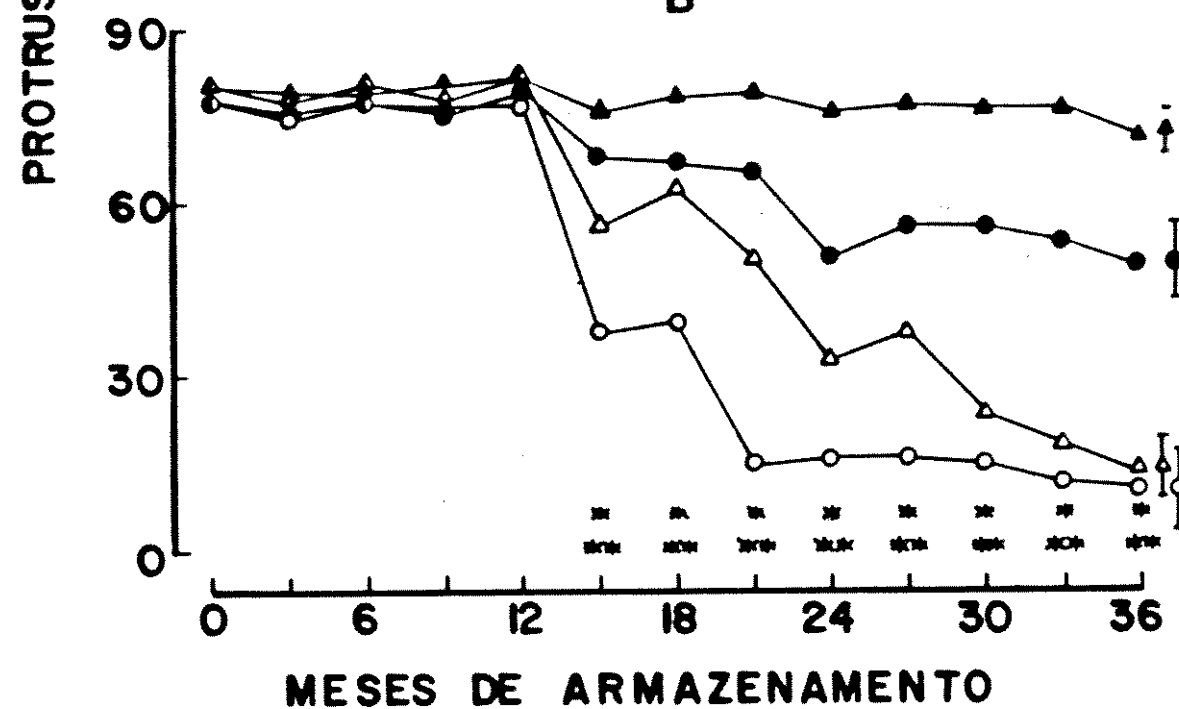


FIGURA 6. Protrusão de radícula (arco seno $\sqrt{P}$), em sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, após 1 e 3 dias da semeadura.

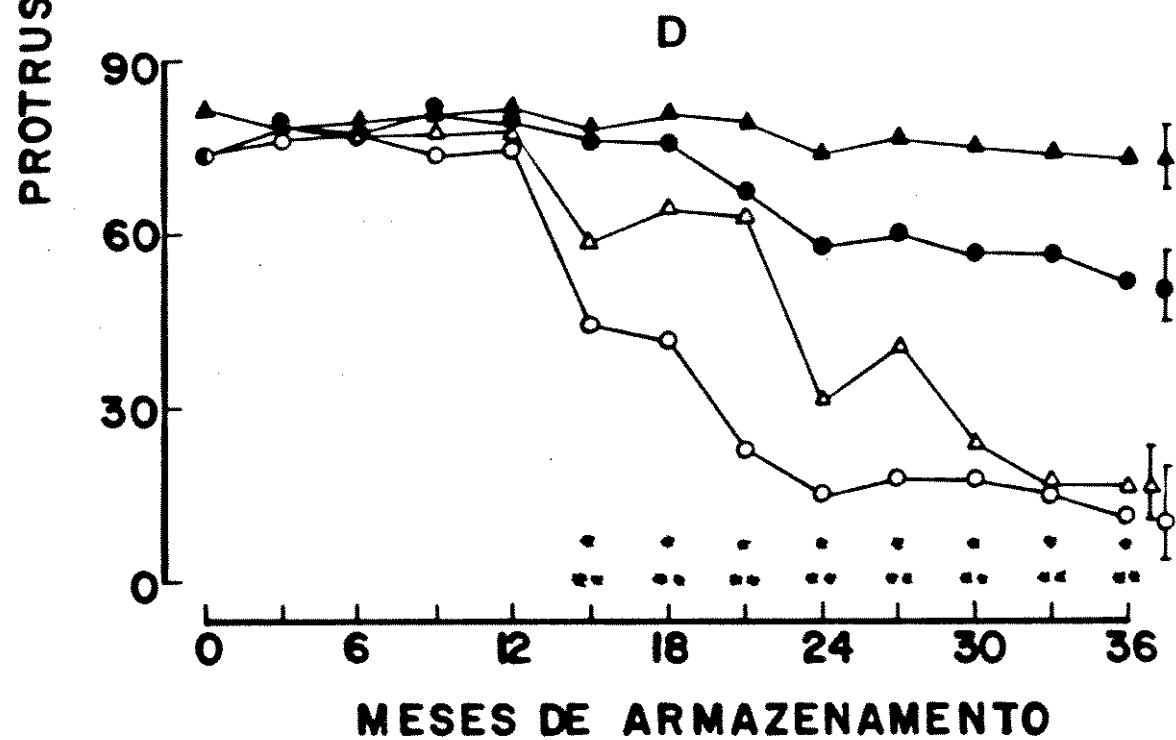
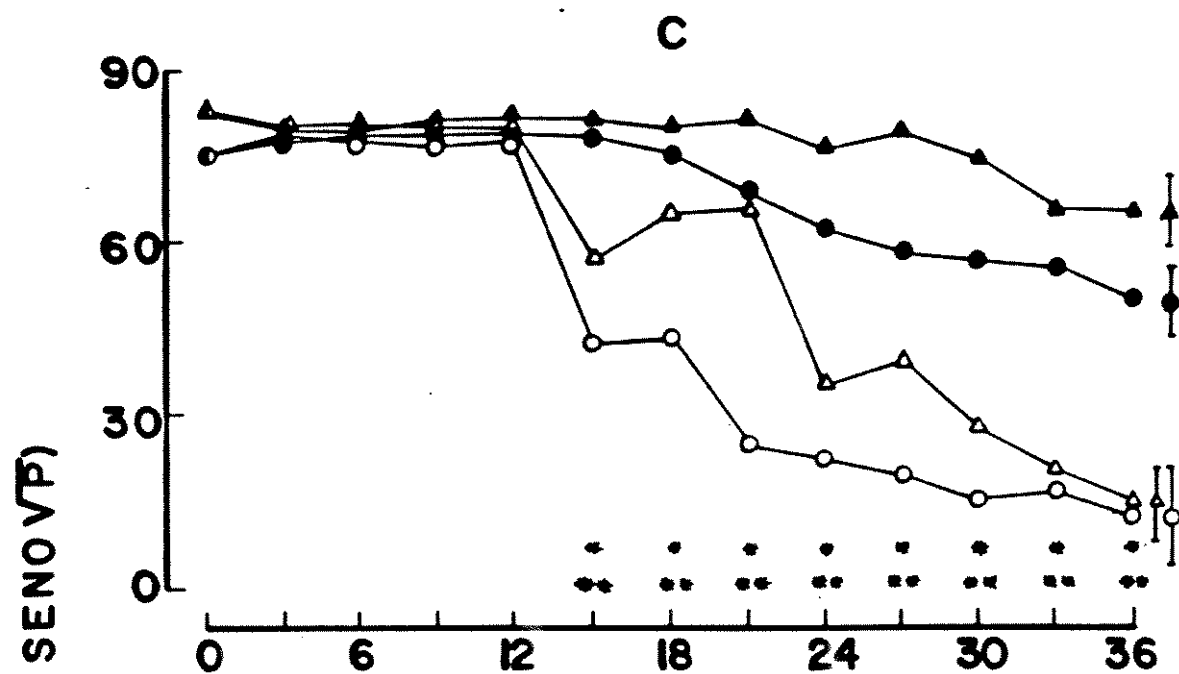
●. CF 1 dia ○. AN 1 dia
▲. CF 3 dias △. AN 3 dias

- A. Luz branca
- B. Escuro
- C. Vermelho
- D. Vermelho-extremo

As barras verticais representam as DMS entre valores referentes aos 36 meses de tratamento.

* Diferença significativa ao nível de 5% entre CF e AN após 1 dias.

** Diferença significativa ao nível de 5% entre CF e AN após 3 dias



do vermelho extremo.

8.3. Germinação de sementes após 5 dias

Com o objetivo de verificar-se a porcentagem de plântulas que se desenvolviam normalmente, procedeu-se contagem das plântulas normais aos 5 dias após a semeadura; as sementes que originaram plântulas normais foram consideradas germinadas.

Sementes estocadas em câmara fria (FIGURA 7) até o 15^o mês apresentaram manutenção do potencial de germinação; já entre 15 e 36 meses de armazenamento houve uma queda gradativa bastante lenta.

Em sementes estocadas em ambiente natural a maior porcentagem de germinação foi mantida até o 6^o mes de armazenamento. A partir do 9^o mês houve uma queda contínua até o 36^o mês na porcentagem de germinação aos 5 dias.

O armazenamento das sementes em ambiente natural determinou uma redução significativa na germinação em relação à condição de câmara fria, a partir do 9^o mês de estocagem (FIGURA 7).

8.4. Germinação de sementes após 9 dias

Germinação foi definida neste item do mesmo modo como no item 3.

O armazenamento em câmara fria (FIGURA 7) não determinou alterações significativas na germinação com 9 dias após a semeadura. Em sementes estocadas em ambiente natural houve manutenção da porcentagem de germinação até o 15^o mês; queda entre 15 e 27 meses e a partir de 27 meses até o final do experimento não

houve redução significativa ao nível de 5% nas porcentagens de germinação.

Entre as sementes mantidas em câmara fria e em ambiente natural até o 15^o mês não houve diferença significativa na germinação com 9 dias. A partir de 18 meses a condição de ambiente natural determinou reduções significativas na porcentagem de germinação com 9 dias em relação às sementes estocadas em câmara fria.

8.5. Velocidade de emergência

A FIGURA 8 mostra os índices de velocidade de emergência de plântulas em casa de vegetação durante o período de armazenamento em câmara fria e em ambiente natural.

Sementes estocadas em câmara fria apresentaram índices de velocidade de emergência que oscilaram com o decorrer do armazenamento (FIGURA 8). Os índices mais baixos foram encontrados em sementes armazenadas por 21 e 12 meses. Esses índices variaram mais em função das condições do ambiente na época do experimento do que com o armazenamento, uma vez que não foram significativamente diferentes em sementes armazenadas por 0 e 36 meses.

Em sementes estocadas em ambiente natural os índices de velocidade de emergência também oscilaram no decorrer do armazenamento e os menores índices também foram encontrados com 21 e 12 meses de armazenamento. Entretanto, nota-se uma redução gradativa significativa desses índices com o armazenamento após o 9^o mês.

Até o 9^o mês as condições de estocagem em câmara fria e em ambiente natural não determinaram diferenças significativas

FIGURA 7. Germinação (arco seno $\sqrt{P}$) de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, após 5 e 9 dias da semeadura.

● . CF2 5 dias ○ . AN2 5 dias

▲ . CF2 9 dias △ . AN2 9 dias

As barras verticais representam as DMS entre valores referentes aos 36 meses de tratamento.

* Diferença significativa ao nível de 5% entre CF e AN com 5 dias após a semeadura.

** Diferença significativa ao nível de 5% entre CF e AN com 9 dias após a semeadura.

FIGURA 8. índice de velocidade de emergência de plântulas em casa de vegetação, oriundas de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos.

● . CF2 ○ . AN2

As barras verticais representam as DMS entre valores referentes aos 36 meses de tratamento.

* Diferença significativa ao nível de 5% entre CF e AN

FIGURA 07

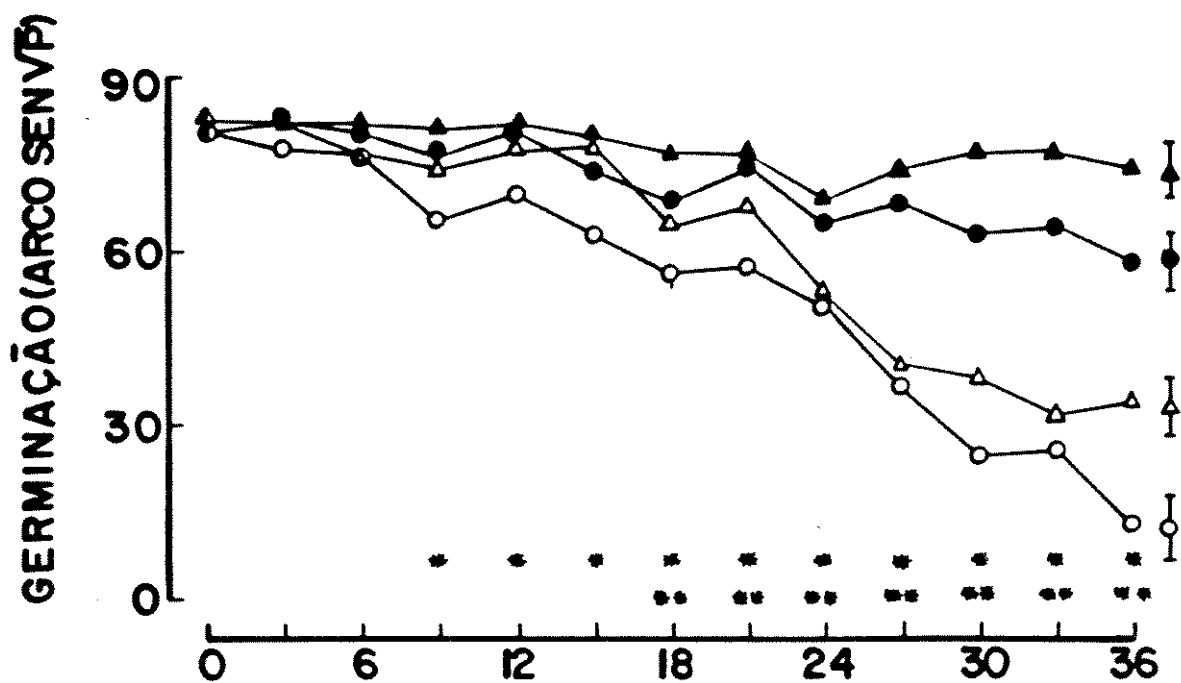
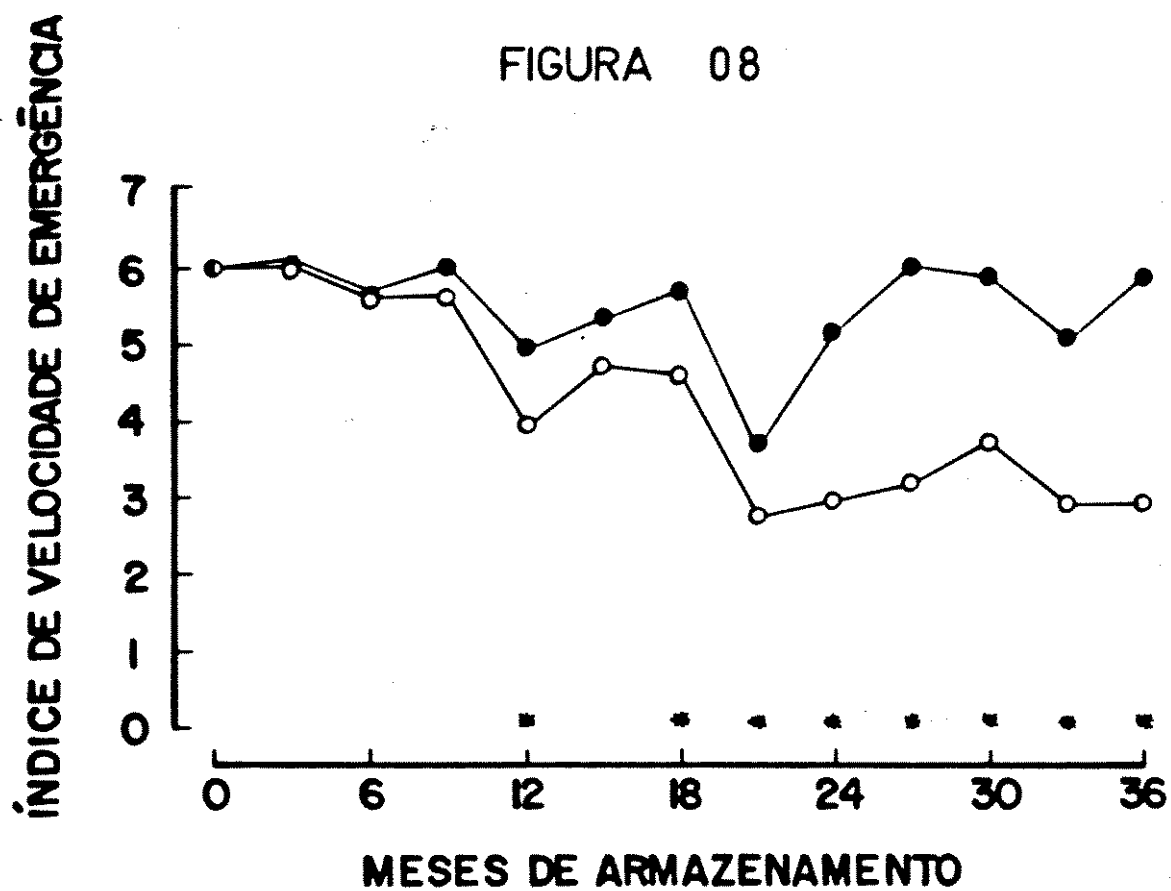


FIGURA 08



entre os índices de velocidade de emergência de plântulas. A partir do 12^o mês o armazenamento em ambiente natural determinou uma redução significativa nos índices até o final do experimento, com exceção do 15^o mês.

8.6. População final após 14 dias

Pela FIGURA 9 observa-se que o armazenamento em câmara fria não afetou significativamente a população final com 14 dias após a semeadura, ao longo dos 36 meses, enquanto o armazenamento em ambiente natural provocou uma redução significativa no "stand" final após período de 27 a 36 meses de estocagem.

O armazenamento em ambiente natural determinou uma redução significativa na população final com 14 dias em relação ao armazenamento em câmara fria, a partir de 24 meses até o final do experimento (36 meses), com exceção daquele determinado para sementes com 33 meses de estocagem.

8.7. Comprimento de radícula de plântulas após 4 dias

A FIGURA 10 mostra que o comprimento de radícula de plântulas provenientes de sementes armazenadas em câmara fria manteve-se estatisticamente inalterado até o 18^o mes, com exceção dos valores obtidos aos 3 e 6 meses que apresentaram redução. Aos 21 meses de estocagem houve uma redução significativa no comprimento de radícula das plântulas, que se manteve estatisticamente inalterado até os 36 meses de armazenamento.

O armazenamento das sementes por 3 meses em ambiente natural determinou redução significativa no comprimento de radí-

FIGURA 9. População final (arco seno $\sqrt{P}$) de plântulas oriundas de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos

● . CF2 ○ . AN2

As barras verticais representam as DMS entre valores referentes aos 36 meses de tratamento

* Diferença significativa ao nível de 5% entre CF e AN

FIGURA 10. Comprimento de radícula (mm) de plântulas oriundas de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, após 4 dias da semeadura

● . CF2 ○ . AN2

As barras verticais representam as DMS entre valores referentes aos 36 meses de tratamento

* Diferença significativa ao nível de 5% entre CF e AN

POPULAÇÃO FINAL (ARCO SENOV $\bar{P}$)

FIGURA 09

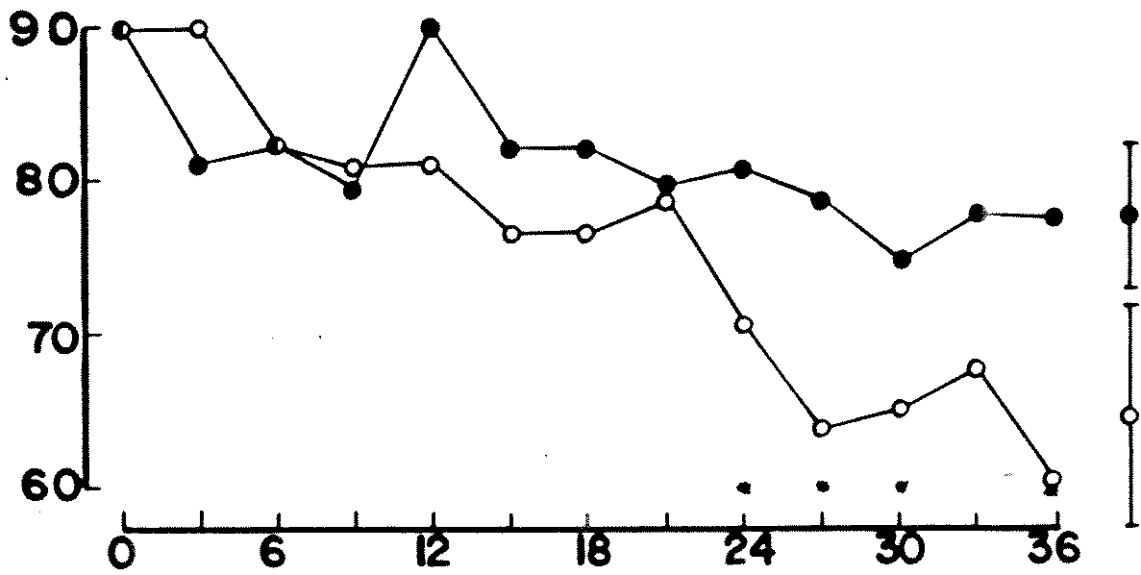
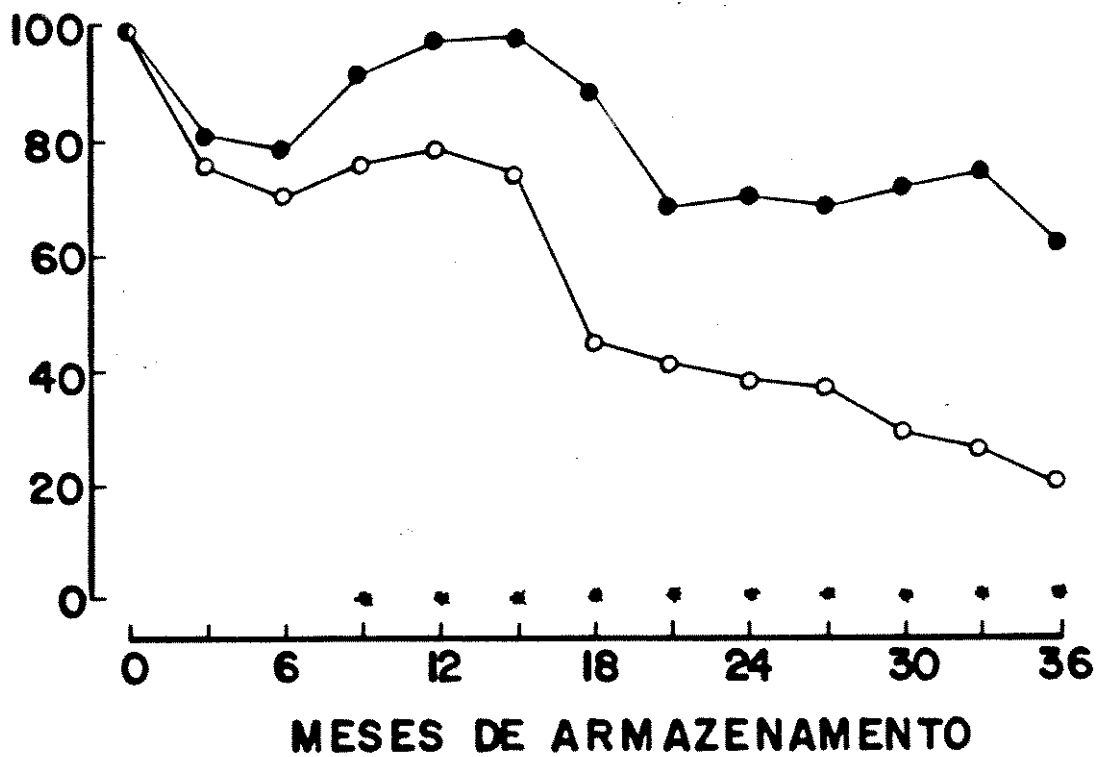


FIGURA 10

COMPRIMENTO DE RADÍCULA (mm)



cula das plântulas.

Este comprimento manteve-se inalterado significativamente em sementes armazenadas por período de 3 a 15 meses, mostrou redução estatisticamente significativa aos 18 meses de armazenamento e de 18 meses até o final do experimento (36 meses) houve redução paulatina desse parâmetro.

A partir do 9^o mes as sementes armazenadas em ambiente natural apresentaram redução estatisticamente significativa ao nível de 5% no comprimento de radícula, em relação às sementes armazenadas em câmara fria.

8.8. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 8 dias

O peso de matéria seca de plântulas oriundas de sementes armazenadas em câmara fria sofreu oscilações durante o armazenamento por 36 meses. O peso mais alto foi encontrado em plântulas oriundas de sementes não armazenadas, os mais baixos quando as sementes haviam sido estocadas por 3 meses, enquanto após períodos de armazenamento de 27 a 36 meses resultaram em plântulas que mostraram peso de matéria seca estatisticamente semelhante ao encontrado em plântulas de sementes não armazenadas.

Plântulas provenientes de sementes armazenadas em ambiente natural também mostraram oscilações na massa de matéria seca durante o período de estocagem.

O maior peso de matéria seca foi encontrado em plântulas provenientes de sementes não armazenadas; uma redução estatística foi encontrada com 36 meses de estocagem, enquanto não houve diferenças significativas entre o peso da massa de matéria

seca de plântulas provenientes de sementes armazenadas por 3 meses e as estocadas por períodos entre 6 e 36 meses.

A estocagem em ambiente natural determinou redução estatisticamente significativa ao nível de 5%, no peso da massa de matéria seca de plântulas após 15 meses de armazenamento das sementes quando comparadas com a matéria seca de plântulas de sementes armazenadas em câmara fria (FIGURA 11).

8.9. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 14 dias

Pela análise da FIGURA 12 observa-se que o peso de matéria seca de plântulas com 14 dias provenientes de sementes armazenadas em câmara fria sofreu oscilações durante os 36 meses de armazenamento. Não houve diferença significativa entre a massa de matéria seca em plântulas com 0, 3, 6, 15, 18 e 36 meses de estocagem, indicando que este parâmetro não foi afetado pelo armazenamento em câmara fria.

Plântulas provenientes de sementes estocadas em ambiente natural também apresentaram oscilações no peso da massa de matéria seca no decorrer dos 36 meses de armazenamento. Este parâmetro não foi afetado significativamente pela estocagem por 3 e 6 meses, foi reduzido entre 6 e 21 meses e manteve-se estatisticamente semelhante após 21 meses.

A condição de ambiente natural determinou diferenças significativas nesse parâmetro quando comparado com a condição de câmara fria, a partir do 18^o mês até o final do experimento, com exceção do 21^o mês.

FIGURA 11. Peso da massa de matéria seca (mg/plântula) de plântulas oriundas de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, após 8 dias da semeadura.

● . CF2 ○ . AN2

As barras verticais representam as DMS entre valores referentes aos 36 meses de tratamento

* Diferença significativa ao nível de 5% entre CF e AN

FIGURA 12. Peso da massa de matéria seca (mg/plântula) de plântulas oriundas de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, após 14 dias da semeadura.

● . CF2 ○ . AN2

As barras verticais representam as DMS entre valores referentes aos 36 meses de tratamento

* Diferença significativa ao nível de 5% entre CF e AN

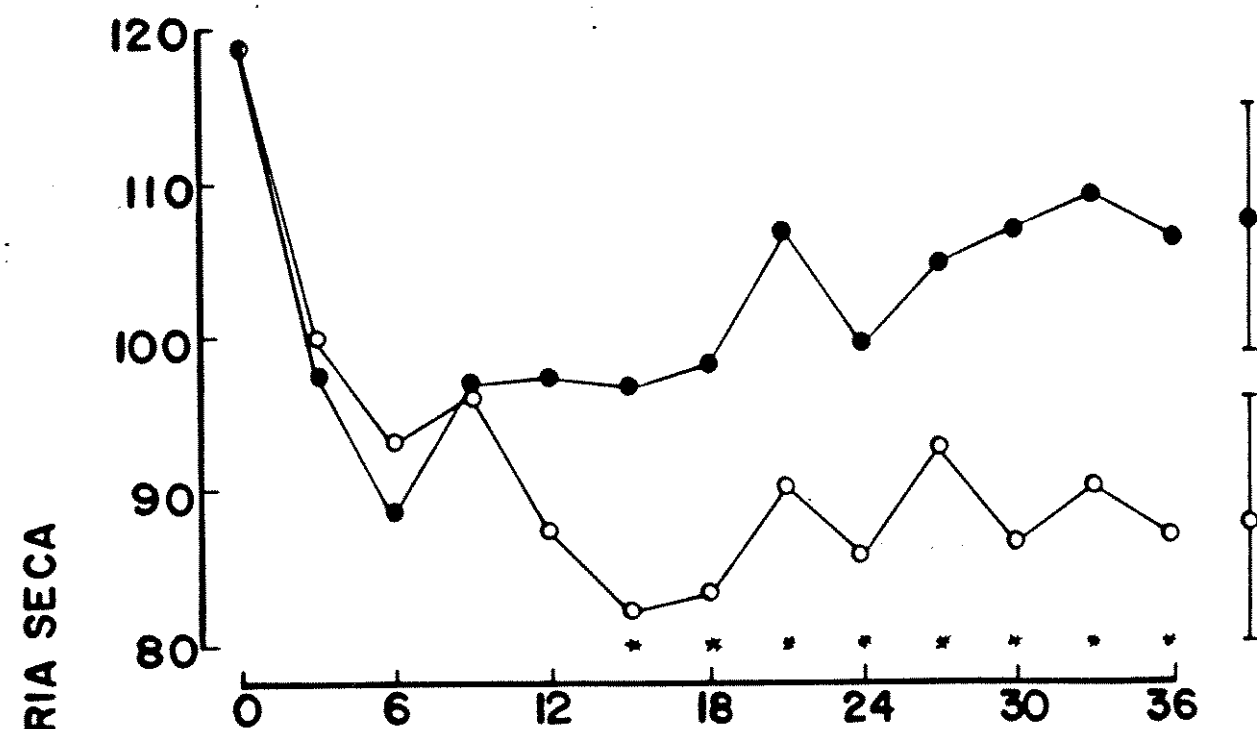
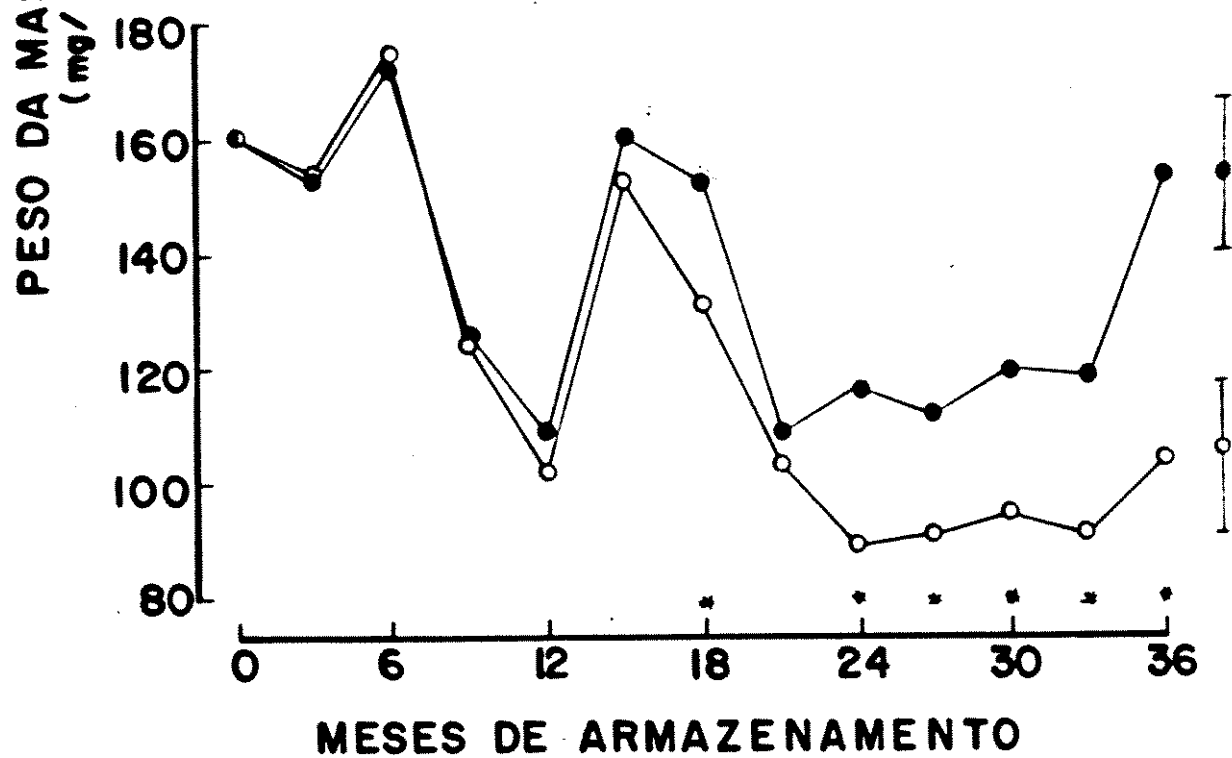


FIGURA 12



9. Teste topográfico de tetrazólio

A coloração das partes vivas das sementes com o sal cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio é mostrada na FIGURA 13.

De acordo com a análise da TABELA 5, sementes recém-colhidas, do lote 5, a maior porcentagem de sementes, 93% foi classificada na classe 1, 2% na classe 2, 5% na classe 3, enquanto nenhuma semente foi classificada no grupo 4. Em sementes do lote 2, com 24 meses de armazenamento, a condição de câmara fria determinou um agrupamento de 75% das sementes na classe 1 seguido de 17% na classe 2, 8% na classe 3 e zero na classe 4, enquanto o armazenamento em ambiente natural determinou um agrupamento menor na classe 1, isto é; 11%; seguido de 14% na classe 2; 52% na classe 3 e 23% na classe 4.

Em sementes do lote 1, sementes com 48 meses de armazenamento em ambiente natural, 100% das sementes apresentaram-se na classe 4.

10. Atividades respiratórias. - Consumo de O_2

Os resultados apresentados na FIGURA 14 mostram que após 0, 6 e 12 horas de embebição o maior consumo de O_2 durante os 120 minutos de cada experimento foi verificado em sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria, seguidas por sementes do lote 2 estocadas em ambiente natural.

As sementes mais velhas (lote 1) estocadas em ambiente natural por 48 meses apresentam consumo de O_2 muito baixo.

Os tratamentos de embebição por 6 e 12 horas (FIGURA 14) determinaram em sementes do lote 2 aumento progressivo no

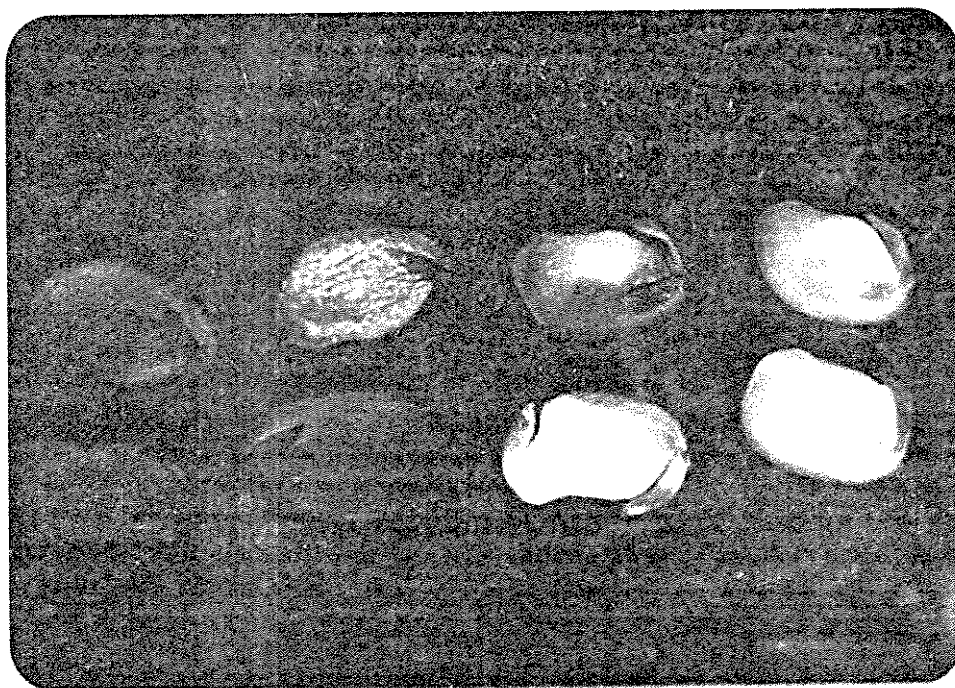


FIGURA 13. Coloração de partes vivas de sementes com o sal cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio

TABELA 5. Porcentagem de sementes agrupadas por classe de acordo com o grau de coloração com o sal cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio.

	c l a s s e s			
	1	2	3	4
24CF2	25	17	8	0
24AN2	11	14	52	23
48AN1	0	0	0	100
ND	93	2	5	0

Classe 1. Eixos e cotilédones completa e uniformemente coloridos.

Classe 2. Eixos e cotilédones não uniformemente coloridos, apresentando poucas áreas sem coloração.

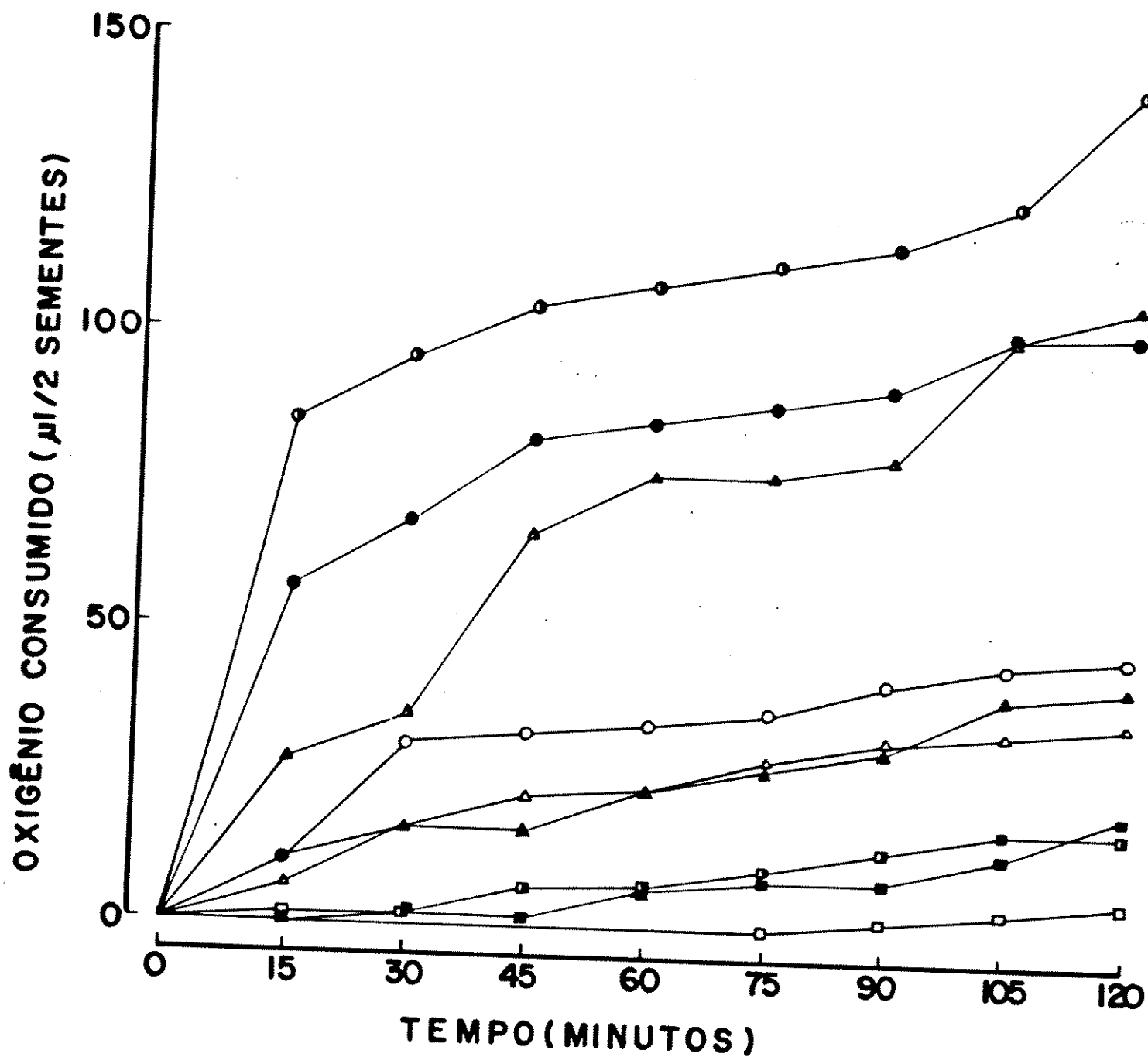
Classe 3. Eixos e cotilédones não uniformemente coloridos, apresentando muitas áreas sem coloração.

Classe 4. Eixos e cotilédones não coloridos.

FIGURA 14. Volume de O_2 ($\mu l/2$ sementes) absorvido por sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, durante 120 minutos.

○. 24CF2 0 hora △. 24AN2 0 hora □. 48AN1 0 hora
●. 24CF2 6 horas ▲. 24AN2 6 horas ■. 48AN1 6 horas
⊙. 24CF2 12 horas ▴. 24AN2 12 horas ▢. 48AN1 12 horas

FIGURA 14



consumo de O_2 em relação a sementes sem embeber.

11. Análise de água de lavagem das sementes

11.1. Curva espectral da água de lavagem

a FIGURA 15 mostra o espectro de absorção da água de lavagem de sementes do lote 2 recém-colhidas.

A água de lavagem de sementes recém-colhidas, do lote 3 (N3) apresentou um aumento contínuo de 0,09 até 0,72 na absorbância entre 10 e 60 minutos de embebição (FIGURA 16).

O armazenamento por 6 meses, quer em câmara fria (6CF2) quer em ambiente natural (6CF2) pouco modificou a absorbância da água de lavagem de sementes entre 10 e 60 minutos (FIGURA 16). Já o armazenamento por 30 meses em ambiente natural determinou um aumento na absorbância dessa água tanto a 10 (0,40) quanto a 60 minutos (1,77) e nos tempos intermediários (FIGURA 16).

11.2. Efluxo de eletrólitos

A análise da água de lavagem de sementes (FIGURA 17A) revelou que após 5 minutos de embebição das sementes houve efluxo de eletrólitos, medido pela condutividade (μS), em sementes recém-colhidas (lote 5), em sementes armazenadas por 24 meses (lote 2) em câmara fria e em ambiente natural e em sementes estocadas por 48 meses em ambiente natural (lote 1) e que à medida que aumentou o tempo de embebição até 12 horas (FIGURA 17B), houve aumento no efluxo de eletrólitos na água de lavagem.

A condição de armazenamento exerceu influência no efluxo de eletrólitos das sementes. Destarte, em sementes estocadas

FIGURA 15. Espectro de absorção da água de lavagem de sementes do lote 2 recém-colhidas, entre 230 e 530 nm, após 30 minutos de embebição.

FIGURA 16. Absorbância a 264 nm da água de lavagem de sementes recém-colhidas (N3), estocadas por 6 meses em câmara fria (6CF2) e em ambiente natural (6AN2) e de sementes estocadas por 30 meses em ambiente natural (30AN1)

●. 6CF2	○. 6AN2
□. 30AN1	◇. N3

FIGURA 15

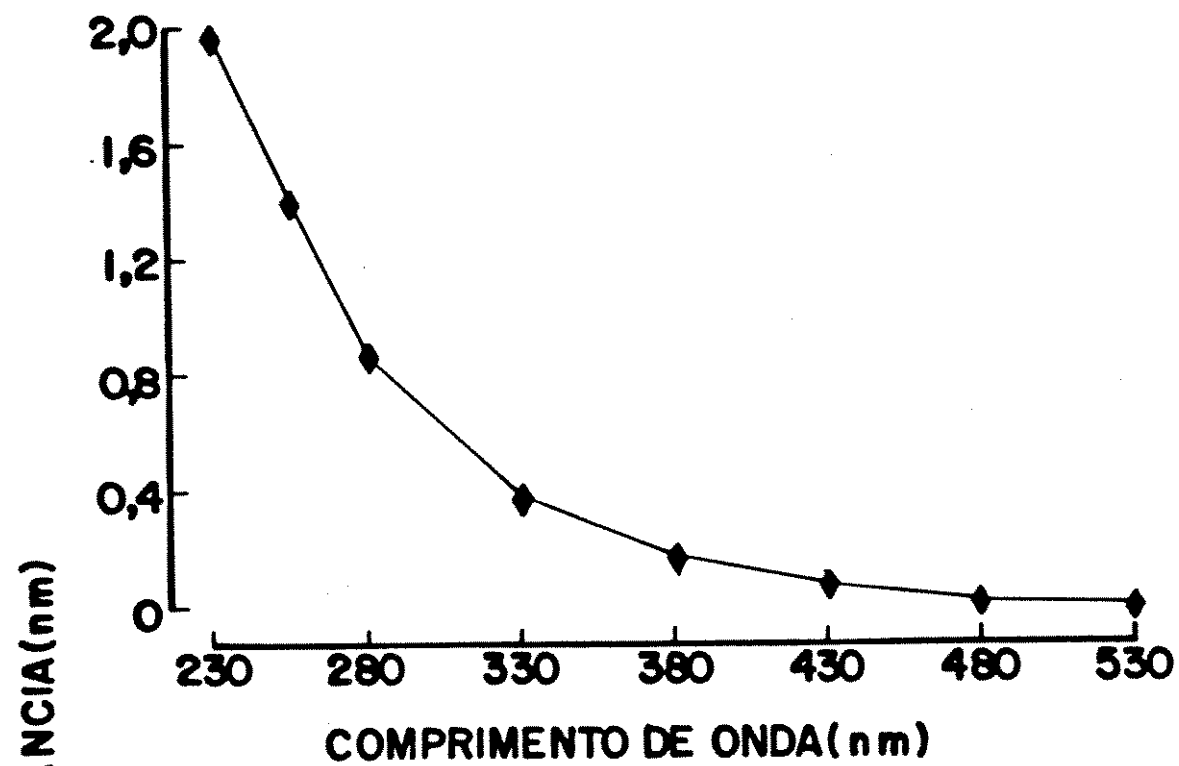


FIGURA 16

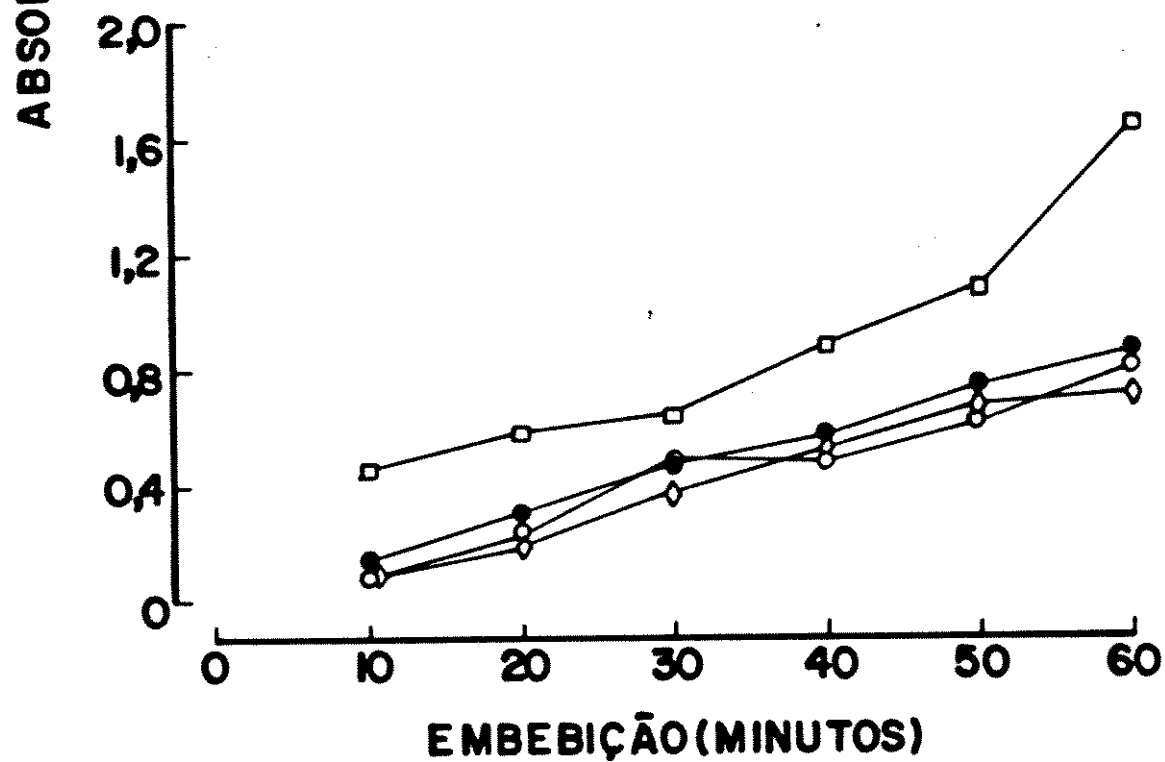


FIGURA 17. Efluxo de eletrólitos de sementes (μS) na água de lavagem de sementes recém-colhidas (N5), estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2) e de sementes estocadas por 30 meses em ambiente natural (30AN1).

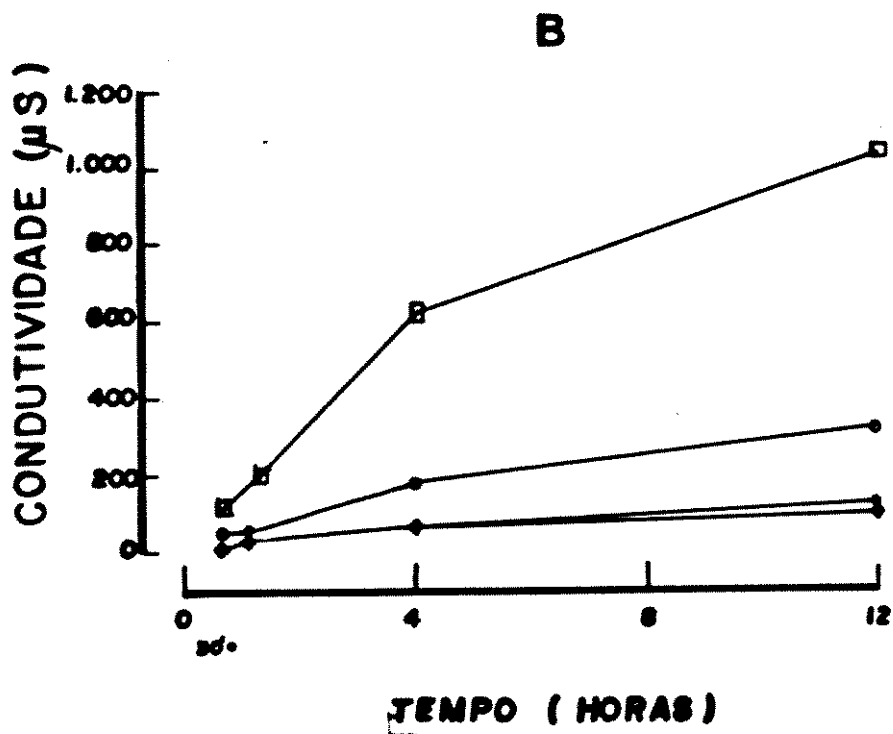
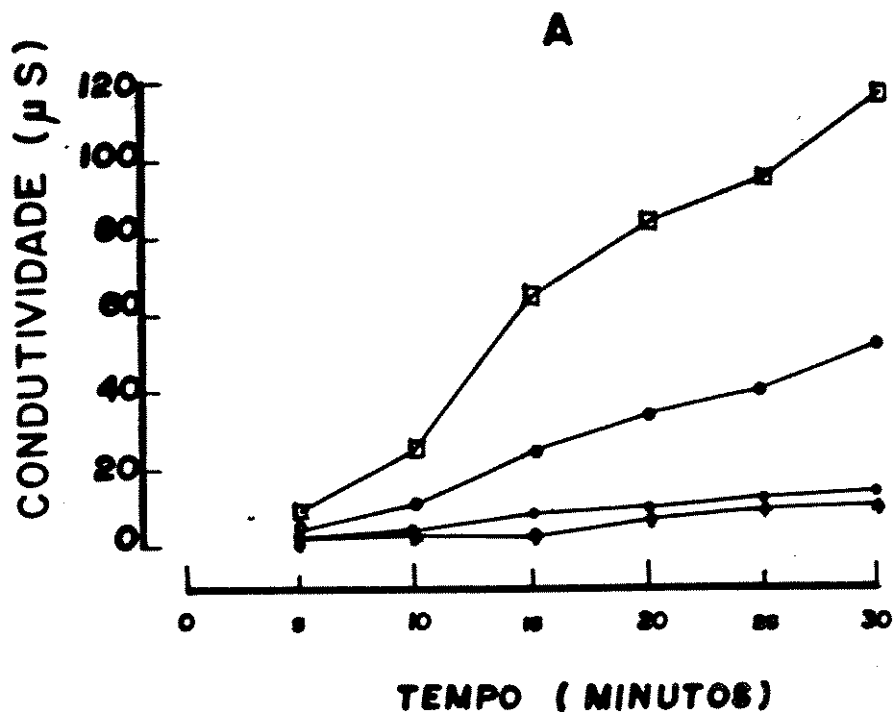
●. 24CF2 ○. 24AN2

□. 30AN1 ◇. N5

A. Sementes embebidas por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos

B. Sementes embebidas por 1/2, 1, 4, e 12 horas

FIGURA 17



em ambiente natural por 48 meses (lote 1) o efluxo de eletrólitos foi maior do que em outros lotes de sementes, seguindo-se sementes do lote 2 armazenadas em ambiente natural e câmara fria e sementes recém-colhidas (lote 5).

11.3. Aminoácidos livres

A análise da água de lavagem de sementes (FIGURA 18A) revelou que após 5 minutos de embebição das sementes, houve efluxo de aminoácidos em sementes recém-colhidas (lote 5), em sementes armazenadas por 24 meses (lote 2) em câmara fria e ambiente natural e em sementes estocadas por 48 meses (lote 1) e que à medida que aumentou o tempo de embebição até 720 horas, houve aumento no conteúdo de aminoácidos liberados na água de embebição (FIGURA 18B).

A condição de armazenamento exerceu influência na saída de aminoácidos das sementes. Assim, em sementes armazenadas em ambiente natural por 48 meses (lote 1), em todas as dosagens realizadas, os teores de aminoácidos foram maiores do que em outros lotes de sementes, seguindo-se sementes do lote 2 estocadas em ambiente natural. Em água de lavagem de sementes recém-colhidas detectou-se maior conteúdo de aminoácidos em relação ao encontrado para sementes do lote 2 armazenadas em câmara fria, com exceção do período de até após 4 horas.

11.4. Carboidratos solúveis em água

As FIGURAS 19A e B mostram o conteúdo de carboidratos solúveis em água de lavagem de sementes recém-colhidas (lote 5),

FIGURA 18. Conteúdo de aminoácidos livres (μ moles/semente) na água de lavagem de sementes recém-colhidas (N5), de sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2) e sementes estocadas por 48 meses em ambiente natural (48AN1).

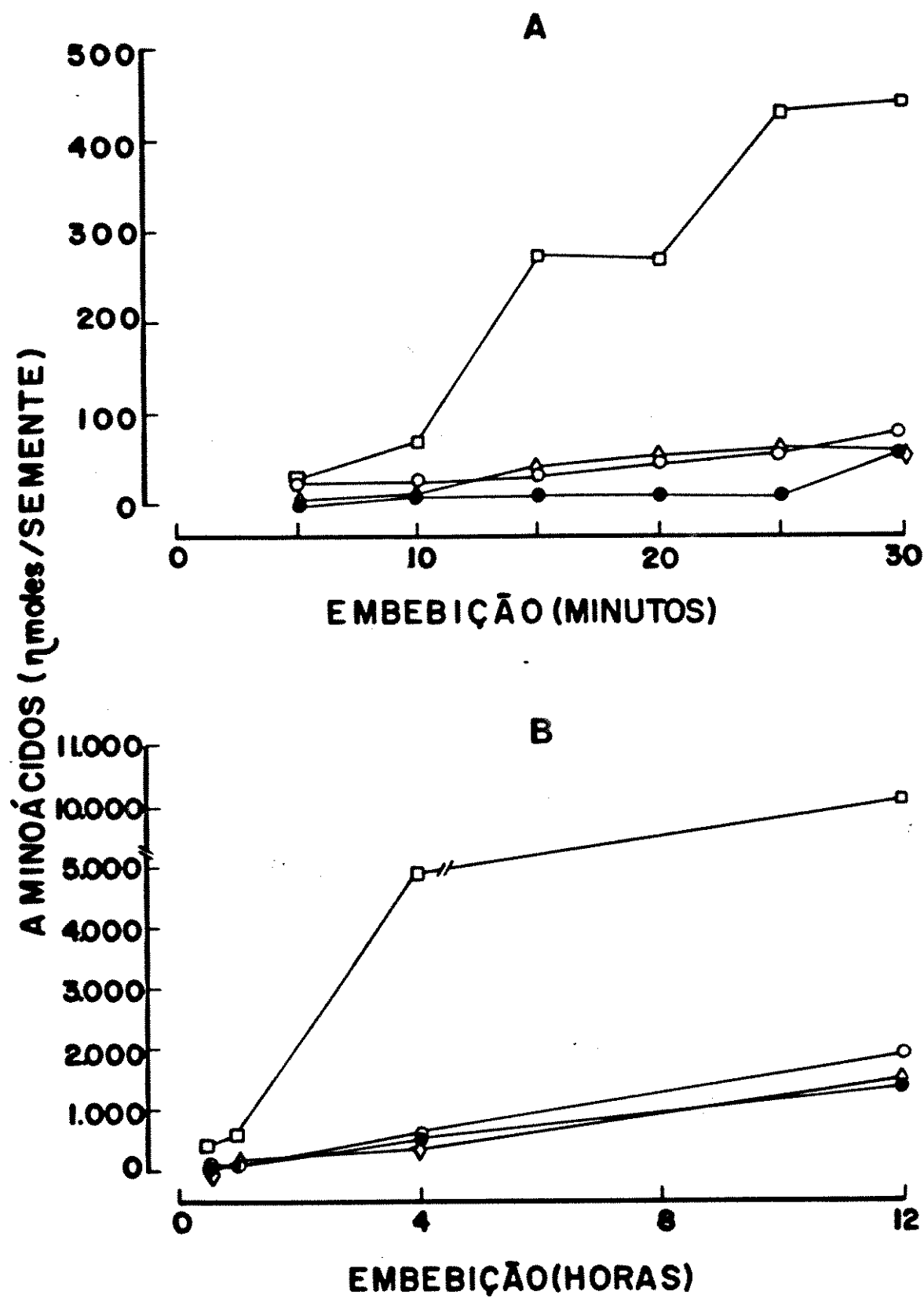
●. 24CF2 ○. 24AN2

□. 48AN1 ◇. N5

A. Sementes embebidas por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos

B. Sementes embebidas por 1/2, 1, 4 e 12 horas

FIGURA 18



de sementes do lote 2 armazenadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e de sementes do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural.

O efluxo de carboidratos solúveis foi verificado em sementes do lote 1, armazenadas em ambiente natural (FIGURA 19A), após 5 minutos de embebição e em sementes recém-colhidas, após 10 minutos; enquanto em sementes do lote 2, estocadas em câmara fria e em ambiente natural o início da saída de carboidratos só foi verificada após 15 minutos de embebição.

Maior conteúdo de carboidratos liberados foi verificado em água de lavagem de sementes do lote 1 armazenadas em ambiente natural por 48 meses em todo o experimento.

Em sementes do lote 2, a condição de armazenamento em ambiente natural determinou maior saída de carboidratos para a água de lavagem do que a condição de estocagem em câmara fria, tendo contudo esses valores sido menores do que os de sementes do lote 1, ao passo que para sementes recém-colhidas tanto houve início de saída de carboidratos a partir de 10 minutos de embebição como esses teores foram bastante semelhantes aos de sementes do lote 2 armazenadas em ambiente natural até após 1 hora de embebição, revelando valores mais altos após 4 horas e menores após 12 horas (FIGURA 19B).

12. Determinações bioquímicas

12.1. Aminoácidos livres

A TABELA 6 mostra o conteúdo de aminoácidos livres nas diferentes partes de sementes recém-colhidas e em sementes inteiri-

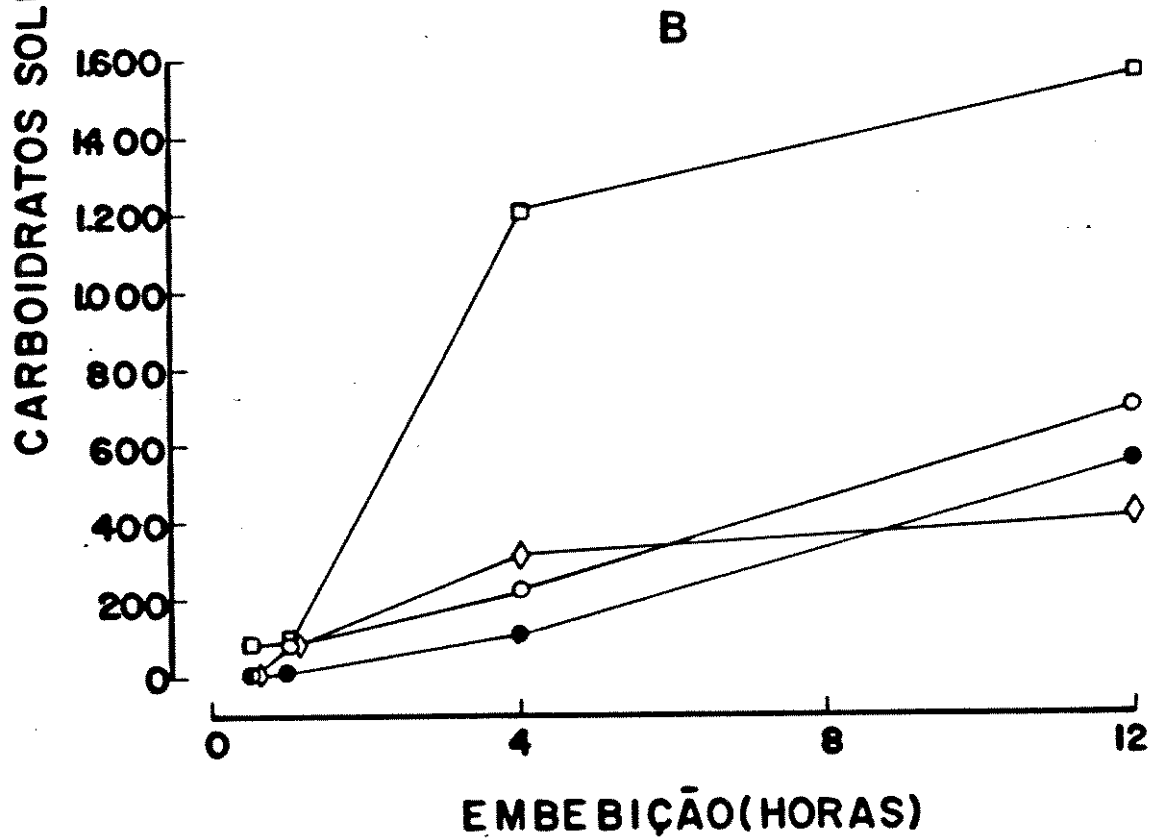
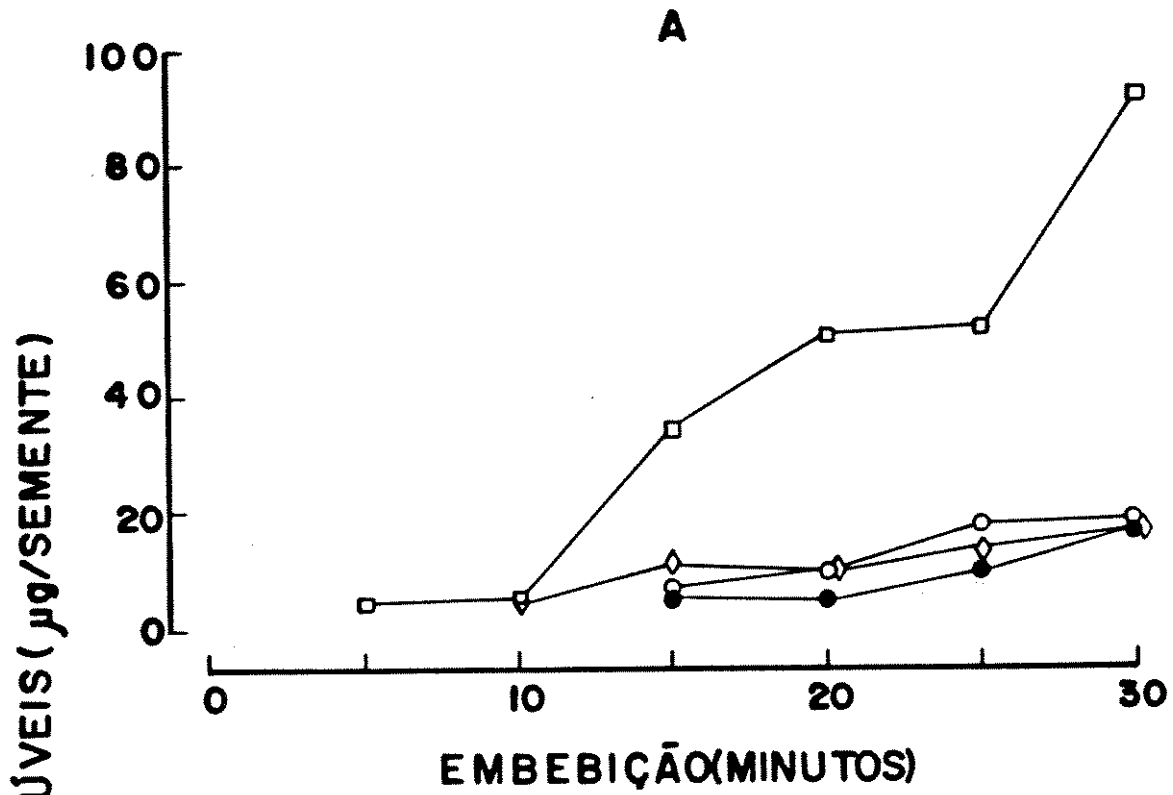
FIGURA 19. Conteúdo de carboidratos solúveis (μg /semente) na água de lavagem de sementes recém-colhidas (N5), de sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2) e sementes estocadas por 48 meses em ambiente natural (48AN1).

●. 24CF2 ○. 24AN2

□. 48AN1 ◇. N5

A. Sementes embebidas por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos

B. Sementes embebidas por 1/2, 1, 4 e 12 horas



ras. O tegumento apresenta 0,39 μ moles de aminoácidos, o eixo embrionário 0,19 μ moles e os cotilédones 8,57 μ moles. Uma semente inteira, que possui uma massa de cerca de 148,14 mg de matéria seca, contém cerca de 9,61 μ moles de aminoácidos.

Os teores de aminoácidos apresentaram poucas variações em eixos embrionários de sementes não embebidas com o tempo de estocagem e com o tipo de estocagem (TABELA 7). Em cotilédones (TABELA 7 e FIGURA 20), enquanto o tempo de armazenamento parece não ter afetado claramente o conteúdo de aminoácidos, o armazenamento em ambiente natural tendeu a elevar o conteúdo de aminoácidos nos cotilédones de sementes do lote 2, em todas as dosagens realizadas, sendo esta elevação significativa no experimento realizado com 34 meses de armazenamento.

A embebição das sementes por 24 horas (TABELA 7) provocou, em eixos de sementes armazenadas em câmara fria (lote 2), aumento nos conteúdos de aminoácidos, em todos os tempos de armazenamento estudados. Em sementes do lote 2, armazenadas em ambiente natural, a embebição por 24 horas elevou o conteúdo de aminoácidos em estocagens por 24 e 32 meses mas pouco afetou os níveis de aminoácidos em estocagens mais longas por períodos de 33 a 36 meses. Em eixos de sementes do lote 1 armazenadas em ambiente natural com 48 meses houve um pequeno aumento no teor de aminoácidos com a embebição. A partir de 56 meses de armazenamento até 60 meses, houve sempre redução no conteúdo de aminoácidos, com uma tendência a maiores reduções em maiores tempos de armazenamento. Em cotilédones de sementes armazenadas em câmara fria a embebição levou a um aumento nos níveis de aminoácidos.

TABELA 6. Conteúdo de aminoácidos ($\mu\text{mol}/\text{semente}$) em sementes recém-colhidas, sem embebição.

	aminoácidos ($\mu\text{mol}/\text{semente}$)
tegumento	0,39
eixo	0,19
cotilédones (2)	8,57
semente inteira	9,61

TABELA 7. Conteúdo de aminoácidos ($\mu\text{mol}/\text{semente}$) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.

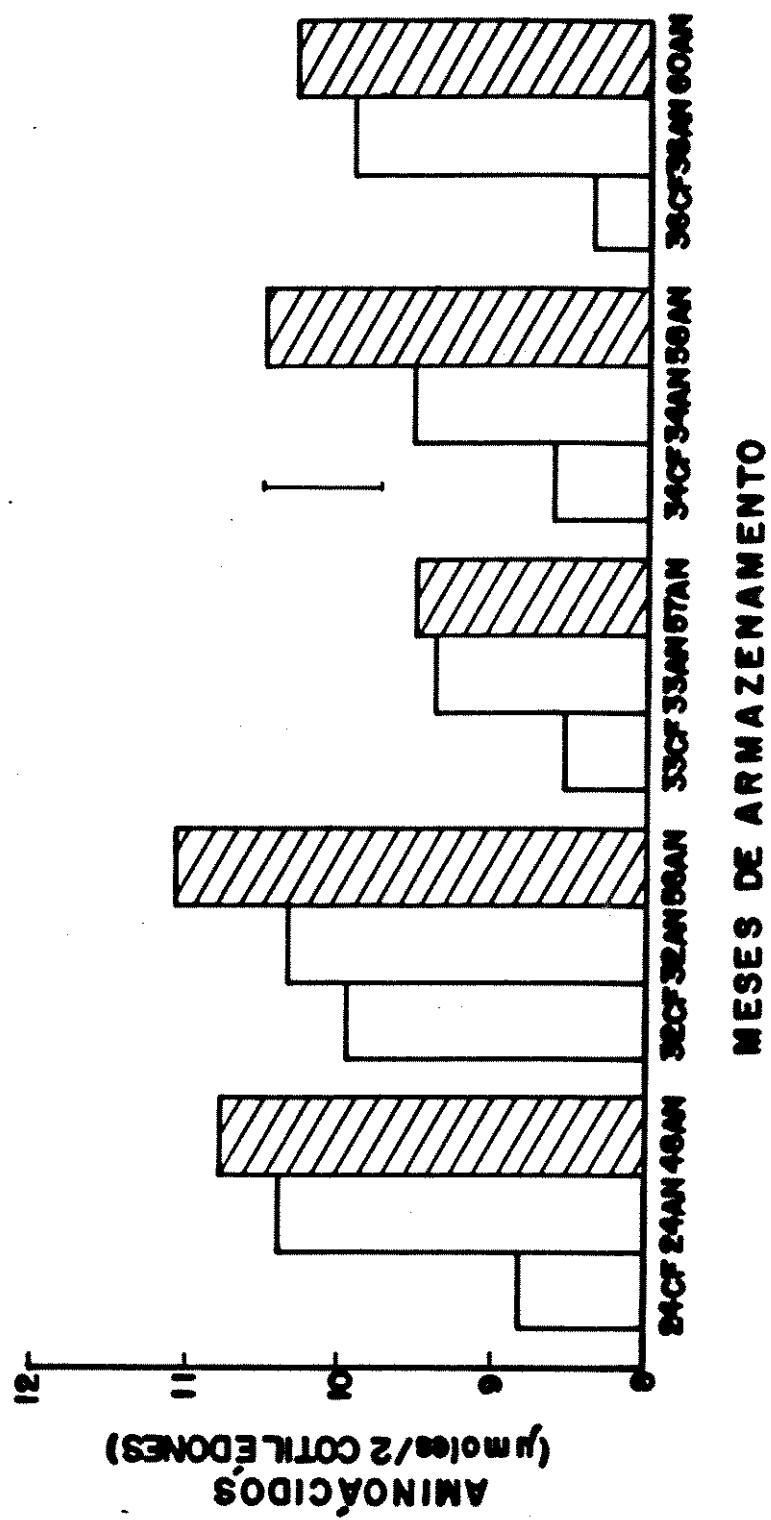
condições	eixos		cotilédones	
de	e m b e b i ç ã o (horas)			
armazenamento	0	24	0	24
24CF2	0,89	1,63	8,81	14,00
24AN2	0,62	1,33	10,39	11,52
48AN1	0,70	0,91	10,76	7,13
32CF2	0,89	1,75	9,96	16,16
32AN2	0,87	1,59	10,33	13,05
56AN1	0,92	0,59	11,05	3,43
33CF2	0,94	1,26	8,54	11,80
33AN2	0,86	0,89	9,38	9,77
57AN1	1,09	0,26	9,50	4,02
34CF2	0,79 aB	1,18 aA	8,61 cA	11,74 aA
34AN2	0,76 aA	0,80 bA	9,51 bA	8,79 bA
58AN1	0,83 aA	0,23 cB	10,49 aA	3,36 cB
DMS	0,137	0,079	0,79	0,25
CV (%)	7,82	5,83	6,90	1,48
36CF2	0,81	1,31	8,36	12,08
36AN2	0,81	0,79	9,92	9,12
60AN1	0,83	0,19	10,30	2,91

NOTA: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, referentes à 4ª dosagem não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

FIGURA 20. Conteúdo de aminoácidos (μ moles/semente) em cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embeber.

□. lote 2 ■. lote 1

FIGURA 20



Em sementes do lote 2 armazenadas em ambiente natural a embebição levou a um aumento no conteúdo de aminoácidos em cotilédones de 24 a 33 meses, enquanto em sementes com 34 e 36 meses de armazenamento a embebição por 24 horas pouco afetou o conteúdo de aminoácidos nos cotilédones. Já nas sementes do lote 1 estocadas em ambiente natural (sementes mais velhas) a embebição levou sempre a uma redução no nível de aminoácidos, sendo essa redução acentuada com o tempo de armazenamento desse lote de sementes.

A FIGURA 21 mostra o conteúdo de aminoácidos em eixos embrionários e cotilédones de sementes do lote 2 armazenadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e de sementes do lote 1 armazenadas por 48 meses em ambiente natural antes e após embebição por 6, 12, 18 e 24 horas. O teor de aminoácidos em eixos (FIGURA 21A) de sementes estocadas em câmara fria por 24 meses praticamente não sofreu alterações após 6 horas de embebição e elevou-se gradativamente entre 6 e 24 horas. Em eixos de sementes do lote 2 armazenadas em ambiente natural verificou-se aumento gradativo até o período de 18 horas de embebição; após 24 horas houve redução. Eixos embrionários de sementes do lote 1 estocadas em ambiente natural (sementes mais velhas) apresentaram pequenas oscilações no conteúdo de aminoácidos com embebição entre 6 e 24 horas, sem contudo haver aumento ou redução nítidos. Em cotilédones (FIGURA 21B) de sementes armazenadas em câmara fria a embebição até 24 horas provocou aumento no teor de aminoácidos. Nas sementes do lote 2 armazenadas em ambiente natural a embebição praticamente não alterou o nível de aminoácidos enquanto em cotilédones de sementes do lote 1 armazenadas em ambiente natural

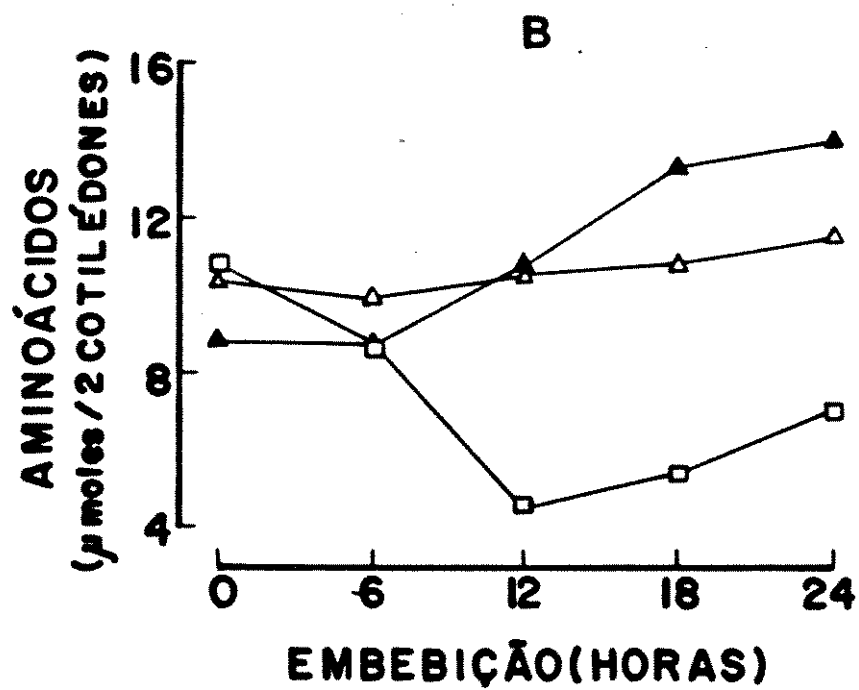
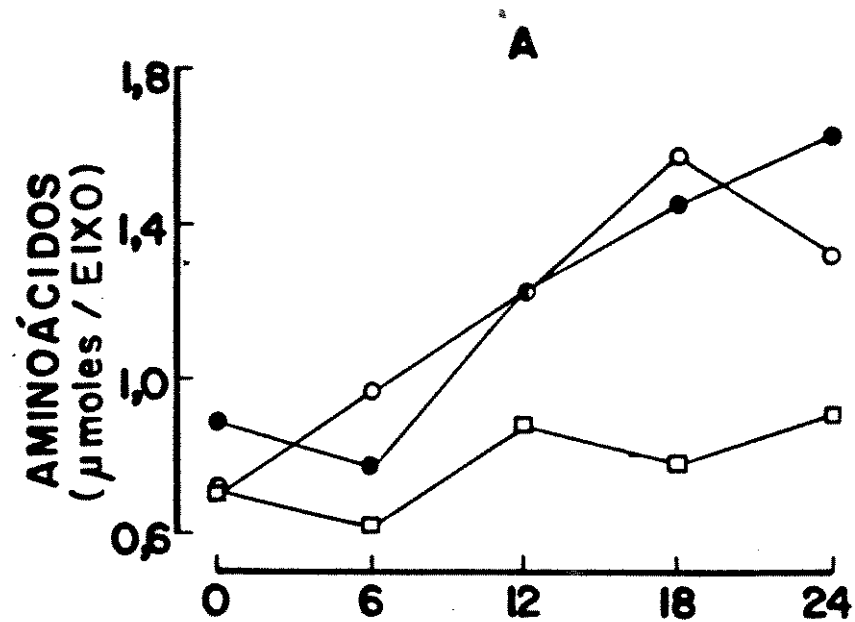
FIGURA 21. Conteúdo de aminoácidos (μ moles/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e ambiente natural (24AN2) e do lote 1 por 48 meses em ambiente natural (48AN1), sem embeber e após 6, 12, 18 e 24 horas de embebição.

●. 24CF2 ○. 24AN2 □. 48AN1

A. Eixos

B. Cotilédones

FIGURA 21



a embebição até 12 horas provocou redução gradativa no teor de aminoácidos e após 18 e 24 horas de embebição houve pequena tendência a elevar-se esse conteúdo.

A germinação de sementes do lote 2, armazenadas por 18 e 21 meses, após período de 24 a 120 horas de embebição provocou aumento nos teores de aminoácidos em eixos embrionários (FIGURA 22A) e redução nos cotilédones (FIGURA 22B), nos dois tratamentos de armazenamento de sementes. Entre 24 e 120 horas de embebição os níveis de aminoácidos tanto em eixos como em cotilédones mantiveram-se sempre maiores quando as sementes haviam sido armazenadas em câmara fria.

12.2. Açúcares solúveis totais

A TABELA 8 mostra que o conteúdo de açúcares solúveis em eixos embrionários de sementes sem embebição apresentou pouca oscilação com o tempo de armazenamento em um mesmo tratamento e também pouco oscilou com o tipo de armazenamento em sementes com a mesma idade.

O armazenamento das sementes em ambiente natural (TABELA 8 e FIGURA 23), resultou em uma tendência a reduzir os níveis de açúcares solúveis nos cotilédones de sementes não embebidas, em relação ao armazenamento em câmara fria (lote 2), quer o armazenamento em ambiente natural tenha sido pelo mesmo (sementes do lote 2) ou por maior (sementes do lote 1) número de meses do que o armazenamento em câmara fria. Na 4ª dosagem (sementes do lote 1 com 58 meses e do lote 2 com 34 meses) a análise estatística dos dados revelou uma redução significativa, ao nível de 5%, no con-

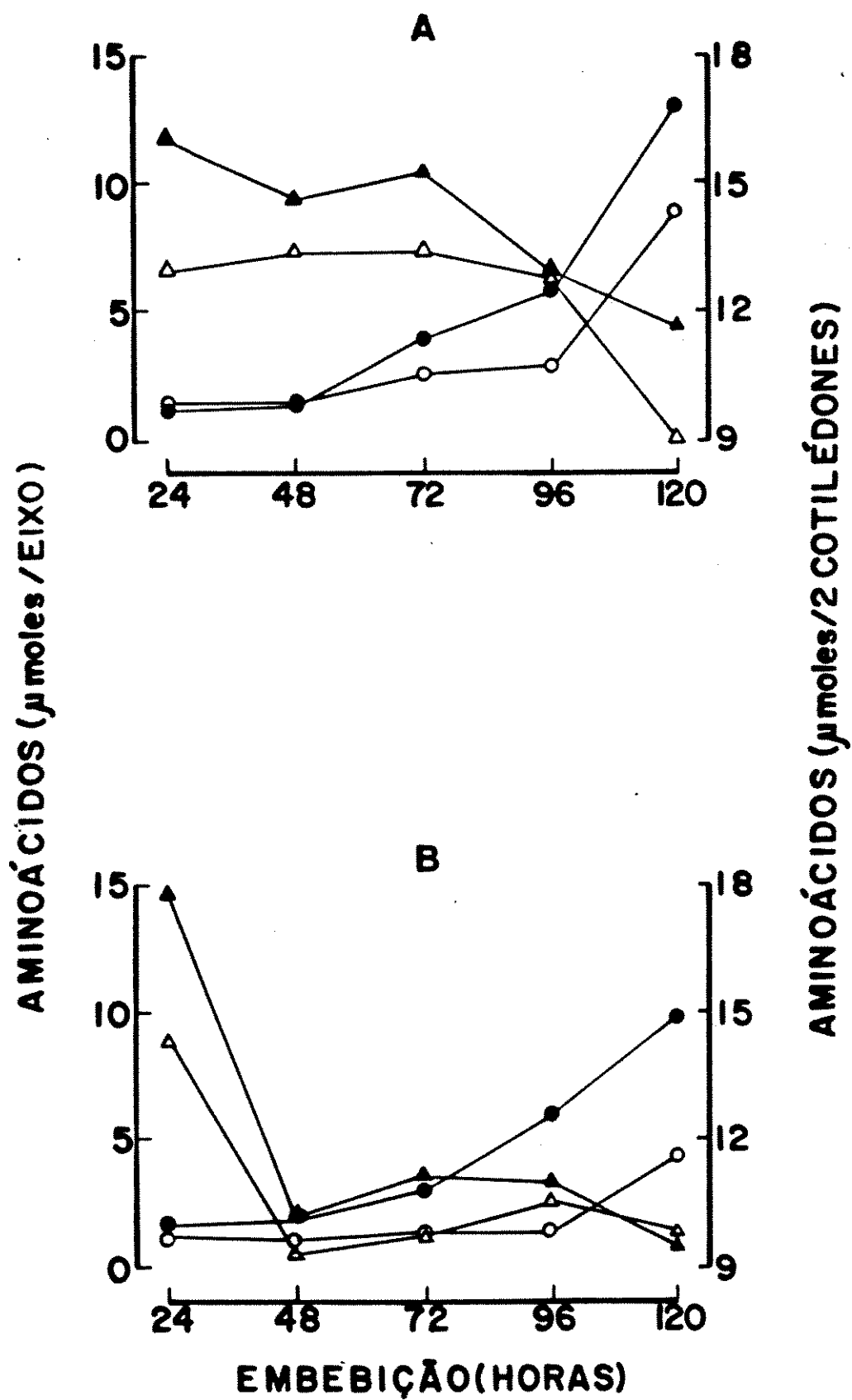
FIGURA 22. Conteúdo de aminoácidos (μ moles/semente) em eixos e cotilédones de sementes, estocadas em câmara fria (CF2) e ambiente natural (AN2), 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o início da embebição.

●. ECF2 ○. EAN2 ▲. CCF2 △. CAN2

A. Sementes estocadas por 18 meses

B. Sementes estocadas por 21 meses

FIGURA 22



teúdo de açúcares solúveis no tratamento de 58 meses em ambiente natural em relação ao tratamento de 34 meses em câmara fria (TABELA 8 e FIGURA 23).

A embebição de sementes por 24 horas (TABELA 8 e FIGURA 24A) aumentou os teores de açúcares solúveis nos eixos de sementes mais novas (lote 2) e reduziu em semente mais velhas (TABELA 8 e FIGURA 24A)). Maiores aumentos foram sempre encontrados em eixos de sementes do lote 2 armazenadas em câmara fria do que nas armazenadas em ambiente natural.

Dosagens de açúcares solúveis em sementes com 24 meses (lote 2) e com 48 meses (lote 1), durante o período de embebição de 0 a 24 horas (FIGURA 24A), mostraram que com 6 horas de embebição ocorreram aumentos nos teores de açúcares solúveis em eixos embrionários de sementes do lote 2 tanto em câmara fria quanto em ambiente natural e reduções em eixos de sementes do lote 1 (ambiente natural); entre 6 e 24 horas de embebição ocorreram poucas variações nos conteúdos de açúcares solúveis dos eixos.

Em cotilédones, a embebição por 24 horas (TABELA 8 e FIGURA 24B) provocou reduções nos conteúdos de açúcares solúveis em todos os tratamentos de armazenamento, sendo que em cotilédones de sementes do lote 2 armazenadas em ambiente natural as reduções foram maiores do que em cotilédones de sementes armazenadas em câmara fria. Em sementes do lote 1 (sementes mais velhas), estocadas em ambiente natural, a embebição por 24 horas provocou reduções maiores nos níveis de açúcares solúveis do que em sementes do lote 2 em todas as dosagens.

TABELA 8. Conteúdo de açúcares solúveis (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.

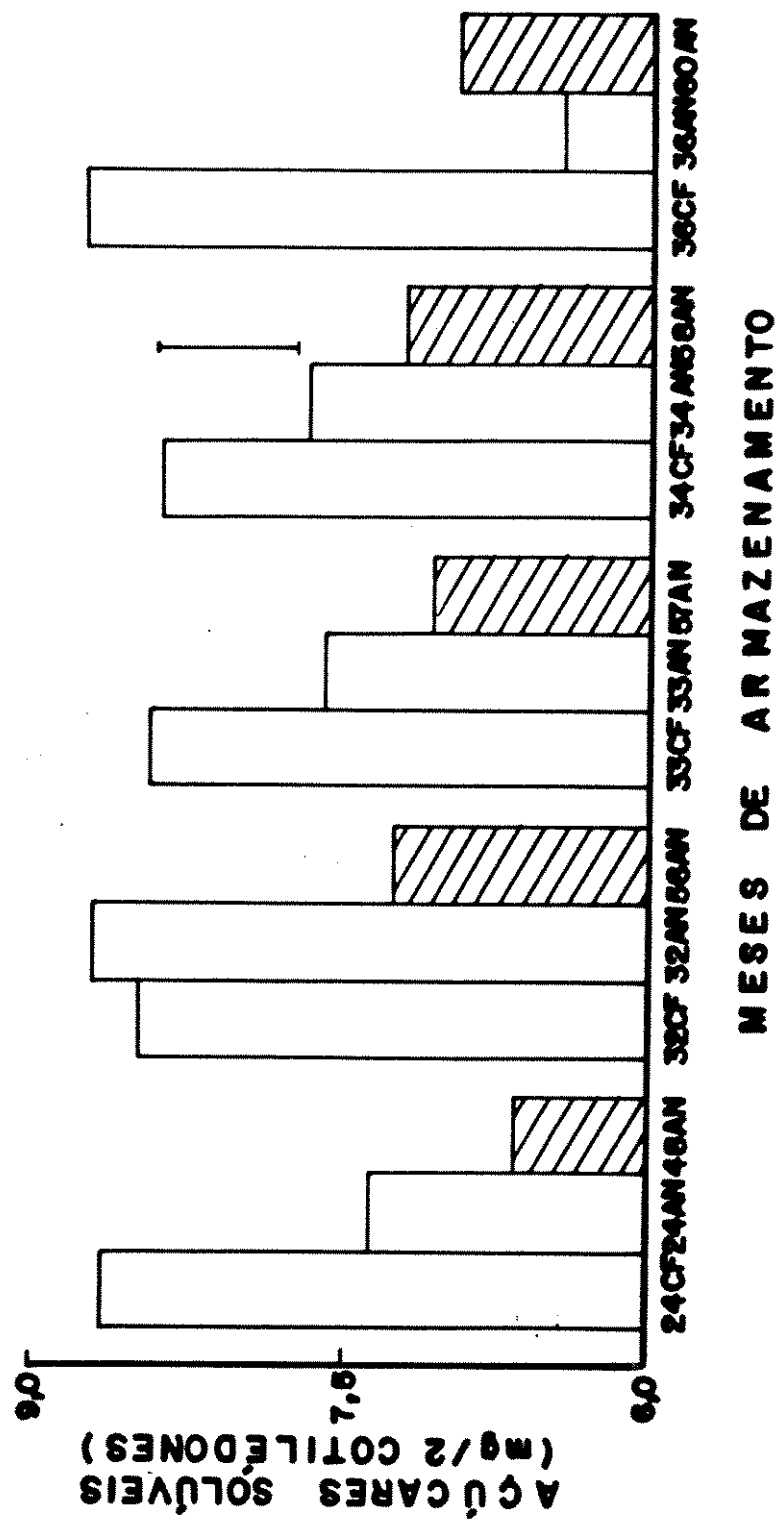
condições	eixos		cotilédones	
de	e b e b i ç ã o (horas)			
armazenamento	0	24	0	24
24CF2	0,43	0,70	8,68	6,48
24AN2	0,41	0,59	7,38	4,43
48AN1	0,44	0,35	6,65	3,38
32CF2	0,49	0,73	8,50	5,49
32AN2	0,50	0,59	8,73	5,14
56AN1	0,46	0,20	7,27	1,43
33CF2	0,50	0,69	8,44	6,83
33AN2	0,48	0,56	7,59	5,35
57AN1	0,46	0,23	7,06	1,81
34CF2	0,54 aB	0,77 aA	8,40 a A	6,69 aB
34AN2	0,52 aB	0,70 aA	7,69 abA	6,13 bB
58AN1	0,51 aA	0,21 bB	7,20 b A	2,14 cB
DMS	0,25	0,20	0,69	0,45
CV (%)	24,14	17,86	4,46	4,49
36CF2	0,52	0,63	8,76	8,54
36AN2	0,50	0,53	6,42	5,43
60AN1	0,44	0,20	6,94	1,44

NOTA: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, referentes à 4ª dosagem não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

FIGURA 23. Conteúdo de açúcares solúveis totais (mg/semente) em cotilédones de sementes, estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embeber.

□. lote 2 ■. lote 1

FIGURA 23



Em cotilédones, (FIGURA 24B) ocorreram reduções gradativas nos níveis de açúcares solúveis de sementes com 24 meses armazenadas tanto em câmara fria quanto em ambiente natural, enquanto em sementes com 48 meses ocorreu uma redução mais rápida até 12 horas de embebição e pouca variação entre 12 e 24 horas de embebição.

As análises de açúcares solúveis feitas em sementes em germinação entre 24 a 120 horas após o início da embebição utilizando-se sementes do lote 2 armazenadas em câmara fria e em ambiente natural estão mostradas na FIGURA 25.

Eixos embrionários de sementes do lote 2 armazenadas por 18 meses (FIGURA 25A) em câmara fria e em ambiente natural, tiveram seus níveis de açúcares solúveis aumentados paulatinamente entre 48 e 120 horas de germinação. Com 21 meses de armazenamento (FIGURA 25A), os eixos de sementes de câmara fria apresentaram um pequeno aumento gradativo nos níveis de açúcares solúveis de 24 a 96 horas de germinação e um aumento maior de 96 a 120 horas, enquanto em eixos de sementes armazenadas em ambiente natural o aumento nos níveis de açúcares solúveis só se verificou a partir de 96 horas de germinação. Em cotilédones de sementes com 18 meses de armazenamento (FIGURA 25B), verificou-se nos dois tipos de armazenamento uma redução gradativa nos conteúdos de açúcares solúveis até 96 horas de germinação; e uma manutenção deste nível em sementes com 120 horas; quando as sementes foram estocadas por 21 meses, essa redução ocorreu somente até 72 horas de germinação.

FIGURA 24. Conteúdo de açúcares solúveis totais (mg/semente) em sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e ambiente natural (24AN2) e do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural (48AN1), sem embeber e após 6, 12, 18 e 24 horas de embebição.

●. 24CF2 ○. 24 AN2 □. 48AN1

A. Eixos

B. Cotilédones

FIGURA 24

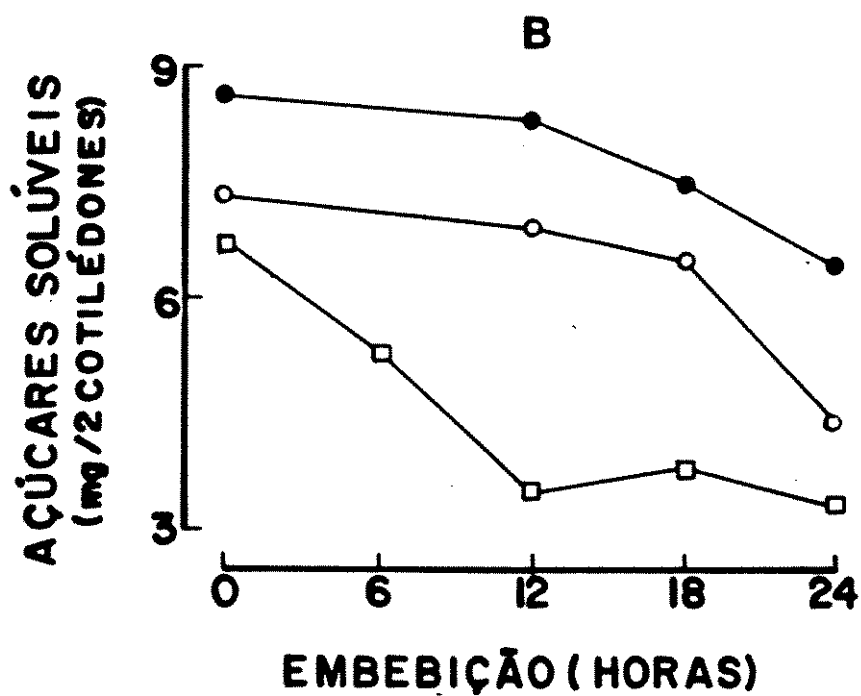
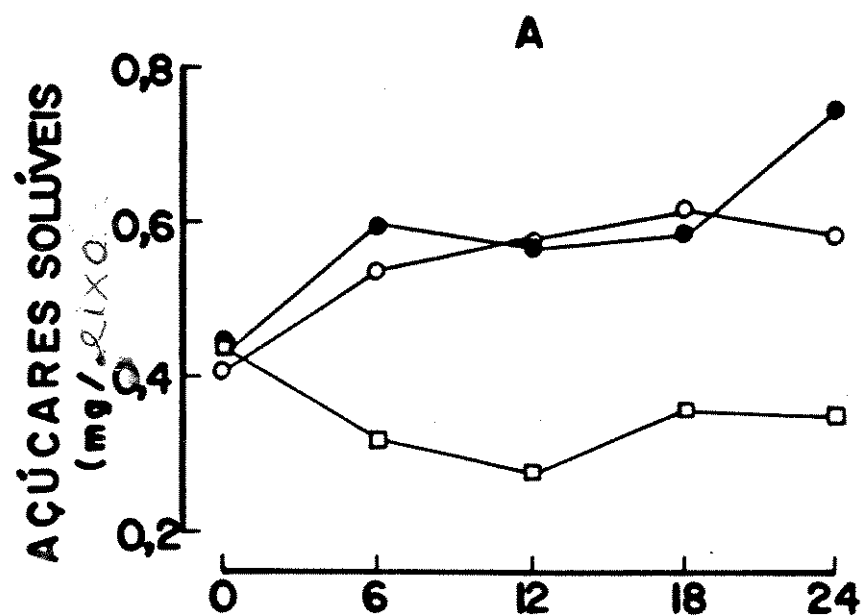


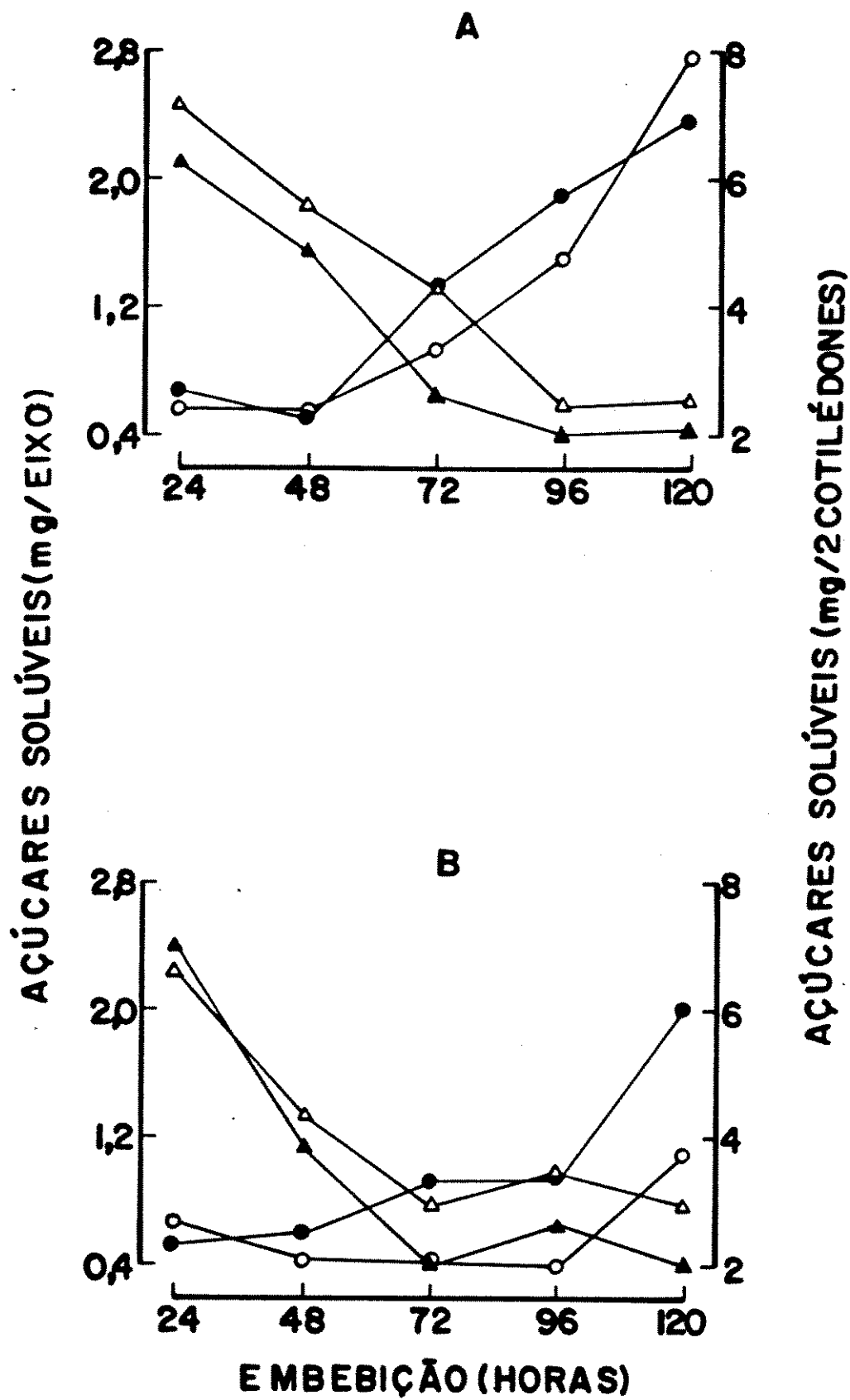
FIGURA 25. Conteúdo de açúcares solúveis totais (mg/semente) eixos e cotilédones de sementes, estocadas em câmara fria (CF2) e em ambiente natural (AN2), 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o início da embebição.

●. ECF2 ○. EAN2 ▲.CCF2 △.CAN2

A. Sementes estocadas por 18 meses

B. Sementes estocadas por 21 meses

FIGURA 25



12.3. Proteínas

A TABELA 9 mostra a distribuição de proteínas nas diferentes partes de sementes recém-colhidas e em sementes inteiras. O tegumento apresenta 0,54 mg de proteínas, o eixo embrionário 0,33 mg e os cotilédones 39,30 mg. Uma semente inteira que possui uma massa de cerca de 148,14 mg de matéria seca, contém cerca de 41,43 mg de proteínas.

O conteúdo de proteínas em eixos de sementes sem embebição pouco variou com o tempo de armazenamento em um mesmo tratamento e também pouco variou com o tipo de armazenamento em sementes com a mesma idade (TABELA 10).

O conteúdo de proteínas em cotilédones sofreu certa oscilação com o tempo de armazenamento numa mesma condição de estocagem (FIGURA 26 e TABELA 10); nos diversos tempos de armazenamento, a condição de ambiente natural tendeu a reduzir o conteúdo de proteínas no mesmo lote de sementes, embora esta redução não tenha sido significativa quando extraídos cotilédones de sementes com 34 meses. As sementes do lote 1 (mais velhas) armazenadas em ambiente natural (AN1) apresentaram em todas as dosagens teores mais baixos de proteínas do que as sementes do lote 2 (mais novas), com exceção da última dosagem onde o conteúdo de proteínas em cotilédones de sementes mantidas em ambiente natural foi próximo nos lotes 1 e 2.

A embebição das sementes por 24 horas provocou aumento nos teores de proteínas em eixos embrionários e redução em cotilédones (TABELA 10).

TABELA 9. Conteúdo de proteínas (mg/semente) em sementes recém-colhidas, sem embebição.

	proteína (mg/semente)
tegumento	0,54
eixo	0,33
cotilédones (2)	39,43
semente inteira	41,43

TABELA 10. Conteúdo de proteínas (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.

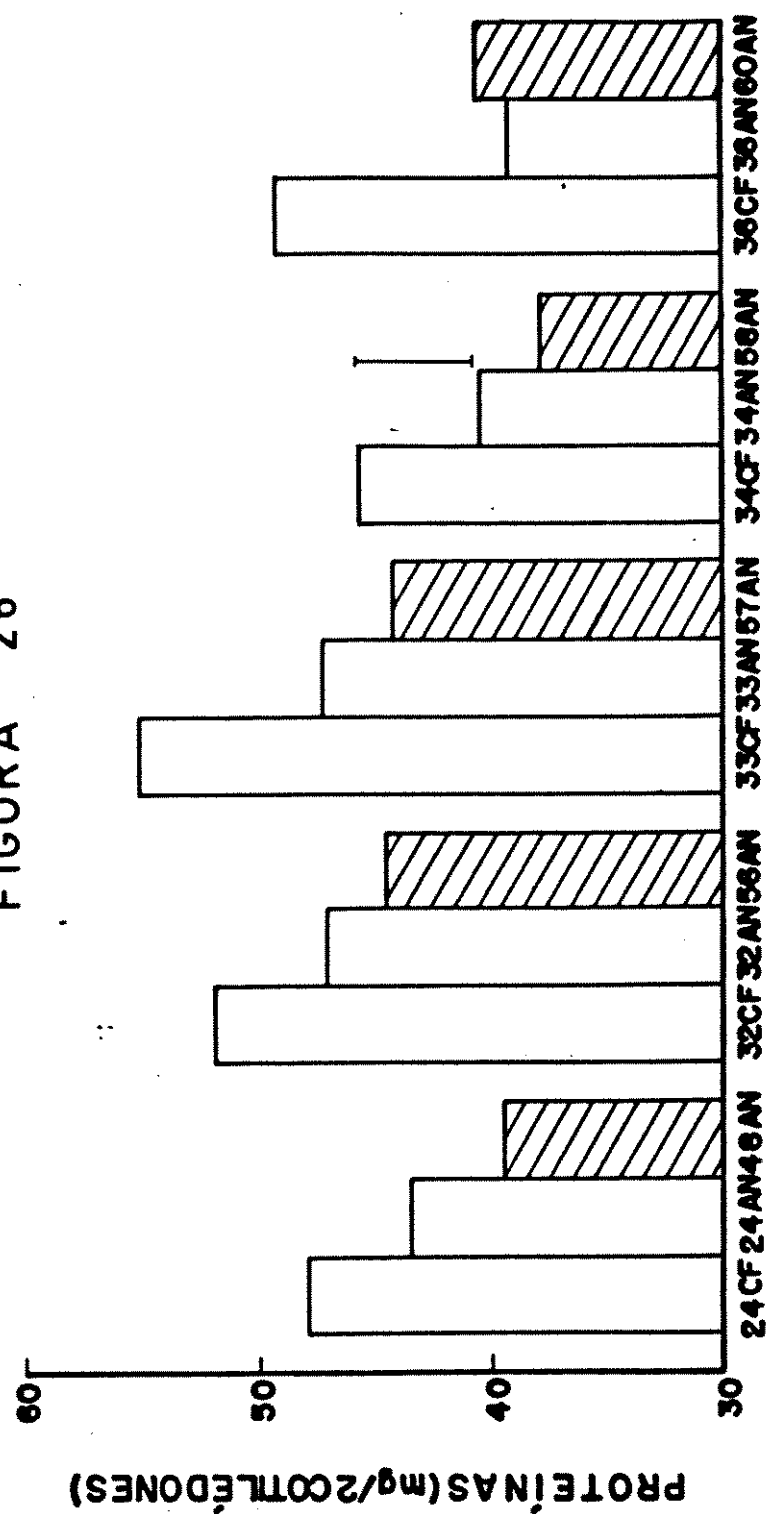
condições de armazenamento	eixos		cotilédones	
	e m b e b i ç ã o (horas)			
	0	24	0	24
24CF2	0,65	0,94	47,99	37,61
24AN2	0,52	0,83	43,54	38,13
48AN1	0,54	0,74	39,43	35,81
32CF2	0,55	0,89	51,86	44,68
32AN2	0,52	0,87	47,22	39,46
56AN1	0,54	0,70	44,60	41,98
33CF2	0,63	0,91	55,13	44,98
33AN2	0,62	0,80	47,32	38,40
57AN1	0,64	0,66	44,24	37,99
34CF2	0,62 aB	0,88 a A	45,68 a A	42,76 aA
34AN2	0,60 aA	0,73 abA	41,08 abA	36,30 bB
58AN1	0,59 aA	0,64 b A	37,90 b A	34,93 bB
DMS	0,06	0,224	5,01	6,31
CV (%)	3,73	11,93	4,74	6,63
36CF2	0,52	0,86	49,31	46,88
36AN2	0,50	0,66	39,20	37,34
60AN1	0,39	0,62	41,67	37,70

NOTA: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, referentes à 4ª dosagem não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

FIGURA 26. Conteúdo de proteínas (mg/semente) em cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embeber.

□. lote 2 ▣. lote 1

FIGURA 26



MESES DE ALMACENAMIENTO

Eixos embrionários de sementes armazenadas em câmara fria e em ambiente natural apresentaram durante o período de germinação entre 24 e 120 horas após o início da embebição aumento no conteúdo de proteínas, tanto após 18 (FIGURA 27A) como após 21 (FIGURA 27B) meses de armazenamento. Os cotilédones apresentaram reduções ao longo do período de germinação entre 24 e 120 horas após o início da embebição (FIGURA 27A e B). Não houve relação entre o tratamento de armazenamento e o aumento ou redução no conteúdo de proteínas em eixos ou cotilédones.

12.4. Polissacarídeos solúveis em água (WSP).

O conteúdo de polissacarídeos solúveis em água em eixos embrionários de sementes sem embebição praticamente não foi afetado pela duração ou pelo tipo de armazenamento (TABELA 11).

Em cotilédones de sementes não embebidos, os níveis de polissacarídeos solúveis parecem não ter sido afetados pelo tempo de armazenamento em uma mesma condição. A condição de ambiente natural tendeu a determinar níveis mais baixos de polissacarídeos em cotilédones, embora as diferenças não tenham sido significativas ao nível de 5% (TABELA 11 e FIGURA 28) no caso da terceira dosagem realizada (lote 2 com 34 meses e lote 1 com 58 meses).

Em sementes armazenadas em câmara fria (TABELA 11) a embebição por 24 horas promoveu no eixo um aumento nos teores de polissacarídeos solúveis em água nas 3 dosagens. Eixos de sementes do lote 2, armazenadas em ambiente natural, tiveram seus níveis de polissacarídeos solúveis praticamente inalterados pela embebição por 24 horas enquanto em eixos de sementes do lote 1

FIGURA 27. Conteúdo de proteínas (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes, estocadas em câmara fria (CF2) e em ambiente natural (AN2), 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o início da embebição.

Eixos ●.24CF2 ○. 24AN2

Cotilédones ▲.24CF2 △. 24AN2

A. Sementes estocadas por 18 meses

B. Sementes estocadas por 21 meses

FIGURA 27

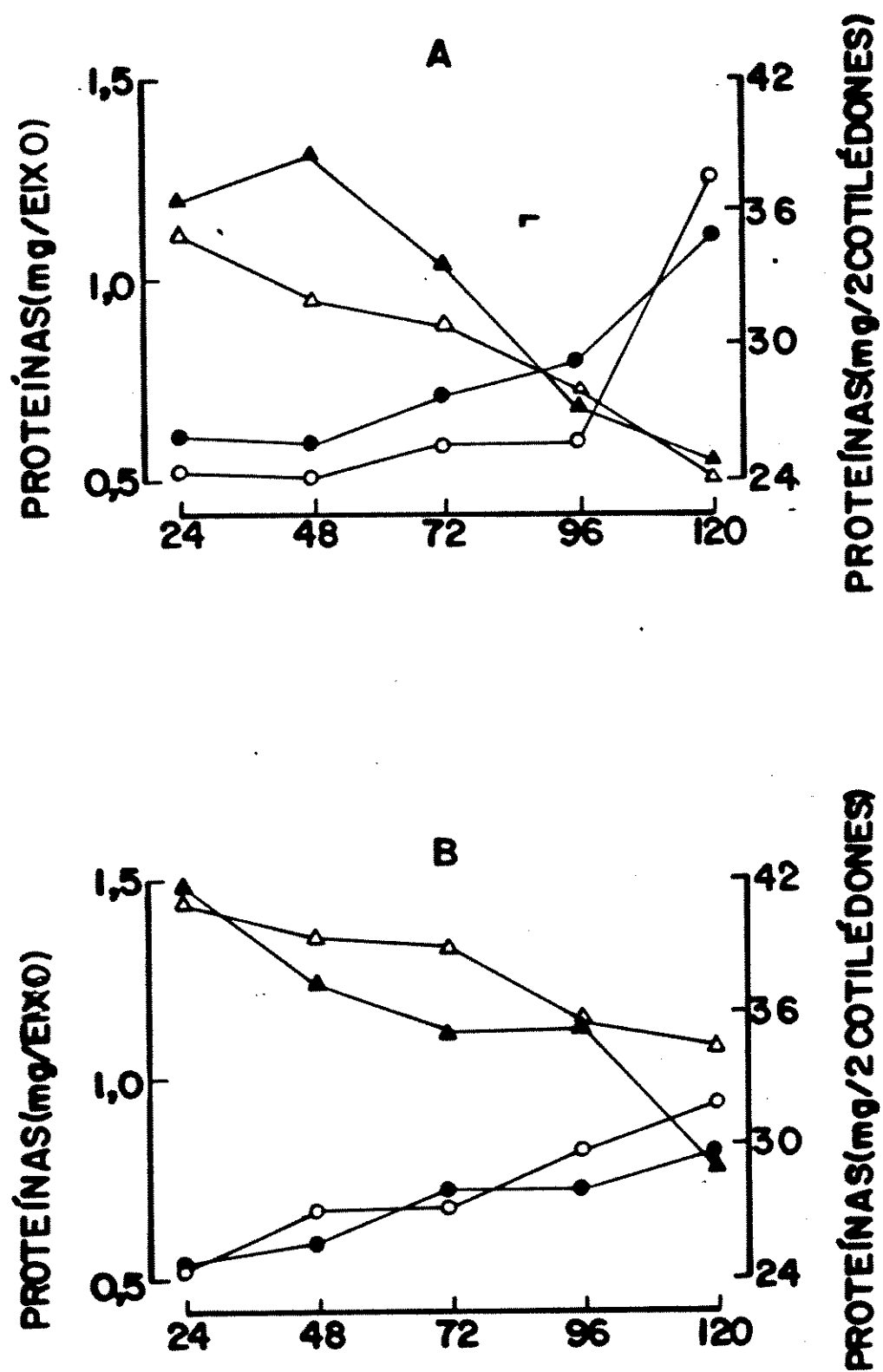


TABELA 11. Conteúdo de polissacarídeos solúveis em água - WSP - (mg/semente), em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.

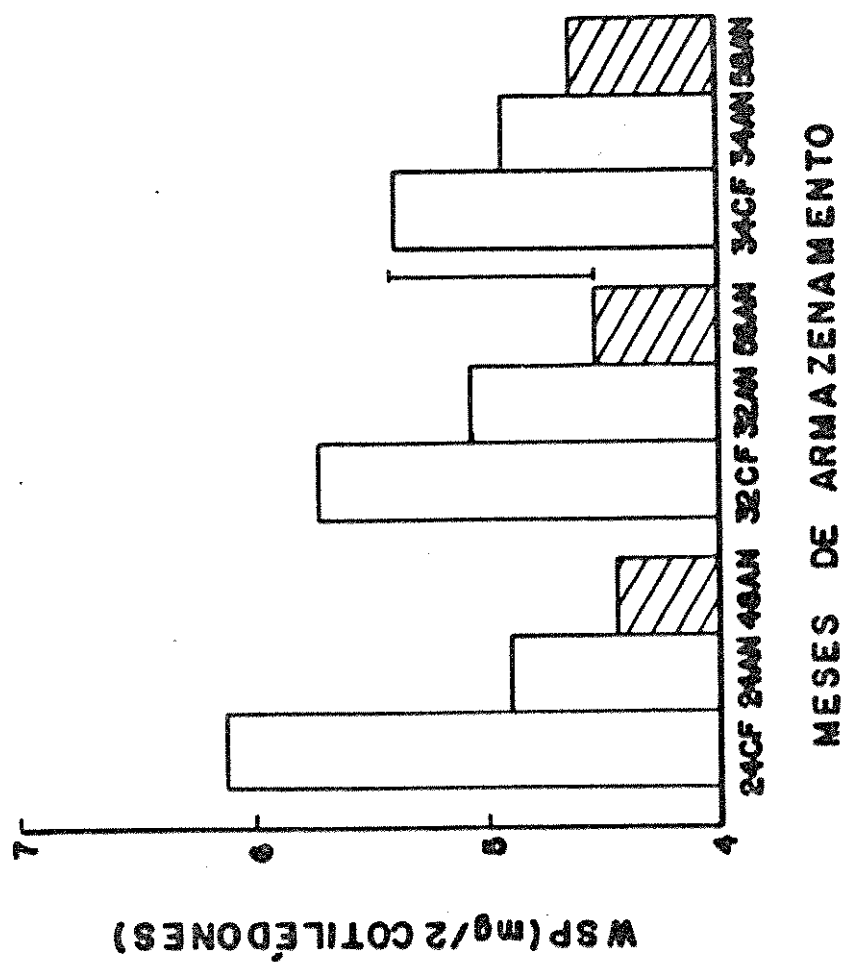
condições	eixos		cotilédones	
de	e m b e b i ç ã o (horas)			
armazenamento	0	24	0	24
24CF2	0,07	0,11	6,12	3,84
24AN2	0,06	0,08	4,89	3,85
48AN1	0,07	0,06	4,43	2,11
32CF2	0,07	0,12	5,72	3,87
32AN2	0,07	0,07	5,06	3,99
56AN1	0,06	0,04	4,52	1,93
34CF2	0,09 aB	0,14 aA	5,38 aA	3,63 aB
34AN2	0,08 aA	0,07 bA	4,93 aA	3,20 aB
58AN1	0,07 aA	0,02 cB	4,63 aA	2,29 bB
DMS	0,025	0,035	1,890	0,610
CV (%)	3,60	18,37	7,51	14,05

NOTA: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, referentes à 3ª dosagem não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

FIGURA 28. Conteúdo de polissacarídeos solúveis em água - WSP - (mg/semente) em cotilédones de sementes, estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embeber.

□. lote 2 ■. lote 1

FIGURA 28



(sementes mais velhas), houve uma tendência a redução no teor de polissacarídeos.

A embebição de sementes por 24 horas provocou nos cotilédones (TABELA 11) uma redução nos teores de polissacarídeos em todos os tratamentos de armazenamento, sendo esta maior em cotilédones de sementes do lote 1 (sementes mais velhas), em todos os experimentos.

A TABELA 11 mostra que na 3ª dosagem (34 meses de armazenamento do lote 2 e 58 meses do lote 1), o conteúdo de polissacarídeos após 24 horas de embebição foi significativamente menor nas sementes mais velhas (lote 1) do que nas mais novas (lote 2).

A FIGURA 29 mostra o conteúdo de polissacarídeos solúveis em água em eixos e cotilédones de sementes com 24 (lote 2) e com 48 meses (lote 1), não embebidas e embebidas por 6, 12, 18 e 24 horas. Eixos de sementes com 24 e com 48 meses de armazenamento em ambiente natural (FIGURA 29A), apresentaram uma redução inicial nas primeiras 6 ou 12 horas respectivamente nos teores de polissacarídeos, seguida de um leve aumento até 24 horas de embebição. Eixos embrionários de sementes do lote 2 armazenadas em câmara fria com 24 meses também apresentaram uma redução inicial e um aumento com 24 horas embora os resultados intermediários tenham apresentado oscilações (FIGURA 29A). Em cotilédones (FIGURA 29B), nos três tratamentos de estocagem, houve uma redução nos níveis de polissacarídeos até 12 horas de embebição e, um aparente aumento posterior até 24 horas de embebição.

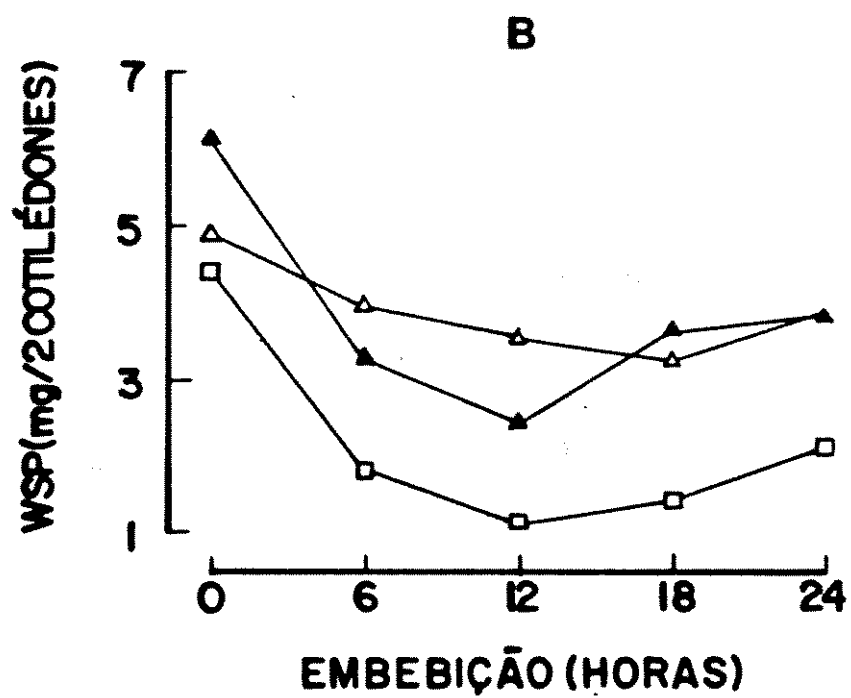
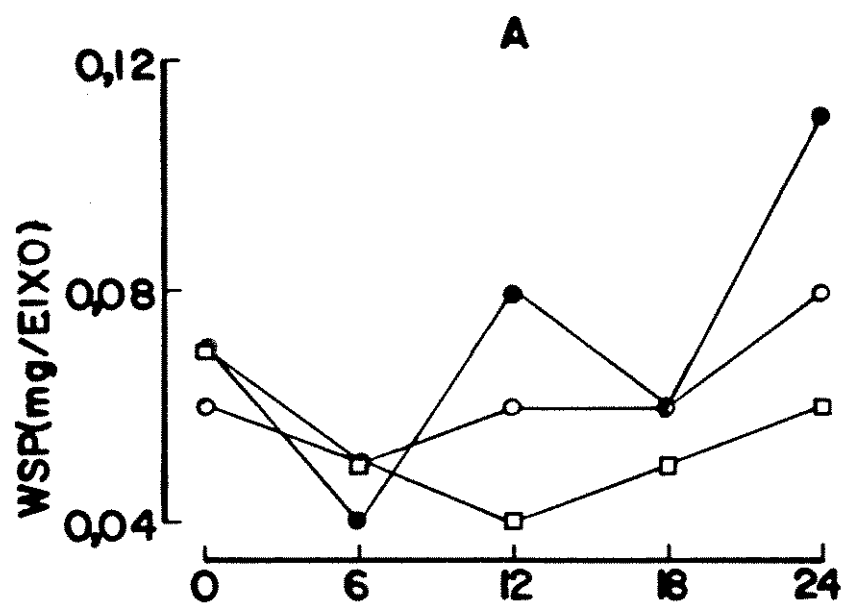
FIGURA 29. Conteúdo de polissacarídeos solúveis em água -WSP- (mg/semente) em sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e ambiente natural (24AN2) e do lote 1 por 48 meses em ambiente natural (48AN1), sem embeber e após 6, 12, 18 e 24 horas de embebição.

●. 24CF2 ○. 24AN2 □. 48AN1

A. Eixos

B. Cotilédones

FIGURA 29



12.5. Amido

O teor de amido (TABELA 12) em eixos de sementes de feijão não embebidas foi pouco afetado pelo tempo de armazenamento entre 24 e 34 meses e entre 48 e 58 meses quando mantidos em condições naturais de armazenamento. Já em condições de câmara fria, parece ter havido uma tendência a um aumento no teor de amido com o tempo de armazenamento entre 24 e 34 meses.

A condição de armazenamento das sementes parece determinar pouca variação no conteúdo de amido dos eixos, não tendo havido diferenças significativas entre os valores da 3ª dosagem (lote 2 com 34 meses de estocagem). Em todas dosagens realizadas, os menores teores de amido foram encontrados nas sementes mais velhas (lote 1) ^{sendo, que} ~~porém~~ na 3ª dosagem, os valores encontrados ~~não~~ ^{foram} estatisticamente diferentes *ao de câmara fria*.

O teor de amido em cotilédones (TABELA 12 e FIGURA 30) tendeu a elevar-se com a duração da estocagem independentemente da condição de armazenamento (ambiente natural e câmara fria), da idade das sementes (24 a 34 meses e 48 a 58 meses) ou com o lote de sementes (1 e 2). A estocagem em ambiente natural tendeu a reduzir os níveis de amido nos cotilédones, em relação à realizada em câmara fria, sendo ~~esta~~ ^{esta redução} estatisticamente significativa na 3ª dosagem (sementes com 34 meses).

Em sementes do lote 2 estocadas em câmara fria por 24, 32 e 34 meses a embebição por 24 horas levou a um aumento marcante no conteúdo de amido do eixo, enquanto em sementes do lote 1 e 2 armazenadas em ambiente natural, a embebição por 24 horas pouco afetou os teores de amido em eixos nas mesmas épocas analisadas.

Em cotilédones (TABELA 12), a embebição das sementes por 24 horas levou a uma redução acentuada no conteúdo de amido nas sementes armazenadas em câmara fria por 24 meses; com o aumento do período de armazenamento para 32 e 34 meses essa redução foi menos acentuada. Em cotilédones de sementes do lote 2 armazenadas em ambiente natural também houve redução nos teores de amido com a embebição da semente por 24 horas em todas as dosagens, entretanto, essas reduções foram um pouco menores. Em cotilédones de sementes do lote 1, com 48 e 56 meses de estocagem em ambiente natural houve um padrão de redução semelhante ao de cotilédones de sementes do lote 2 estocadas em ambiente natural enquanto com 58 meses de armazenamento não foi observada alteração no teor de amido (TABELA 12). A FIGURA 31 mostra o conteúdo de amido em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas em câmara fria e em ambiente natural e de sementes do lote 1 estocadas em ambiente natural, antes e após embebição por 6, 12, 18 e 24 horas. O conteúdo de amido em eixos (FIGURA 31A) de sementes estocadas em câmara fria por 24 meses ficou praticamente inalterado após 6 horas e elevou-se acentuadamente entre 12 e 24 horas de embebição. Embriões de sementes dos lotes 1 e 2 armazenadas em ambiente natural por 48 e 24 meses respectivamente, tiveram poucas variações nos conteúdos de amido durante as primeiras 24 horas de embebição (FIGURA 31A). Em cotilédones (FIGURA 31B) de sementes estocadas em câmara fria a embebição provocou uma redução marcante no teor de amido após 6 horas de embebição e pouca alteração nas horas seguintes, até 24 horas de embebição. Nas sementes dos lotes 1 e 2 armazenadas em ambiente natural houve reduções nos teores de

TABELA 12. Conteúdo de amido (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.

condições	eixos		cotilédones	
de	e m b e b i ç ã o (horas)			
armazenamento	0	24	0	24
24CF2	0,13	0,42	60,78	46,40
24AN2	0,16	0,17	52,13	49,60
48AN1	0,12	0,19	53,15	47,56
32CF2	0,17	0,29	69,52	63,77
32AN2	0,16	0,19	63,56	58,29
56AN1	0,14	0,16	64,74	61,46
34CF2	0,23 aB	0,39 aA	72,96 aA	68,23 aA
34AN2	0,15abA	0,19 bA	68,10 bA	65,87 aA
58AN1	0,12 cB	0,18 bA	66,85 bA	67,78 aA
DMS	0,078	0,083	2,240	2,790
CV (%)	34,11	23,08	6,21	3,20

NOTA: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, referentes à 3ª dosagem não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

FIGURA 30. Conteúdo de amido (mg/semente) em cotilédones de sementes, estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embeber.

□. lote 2 ■. lote 1

FIGURA 30

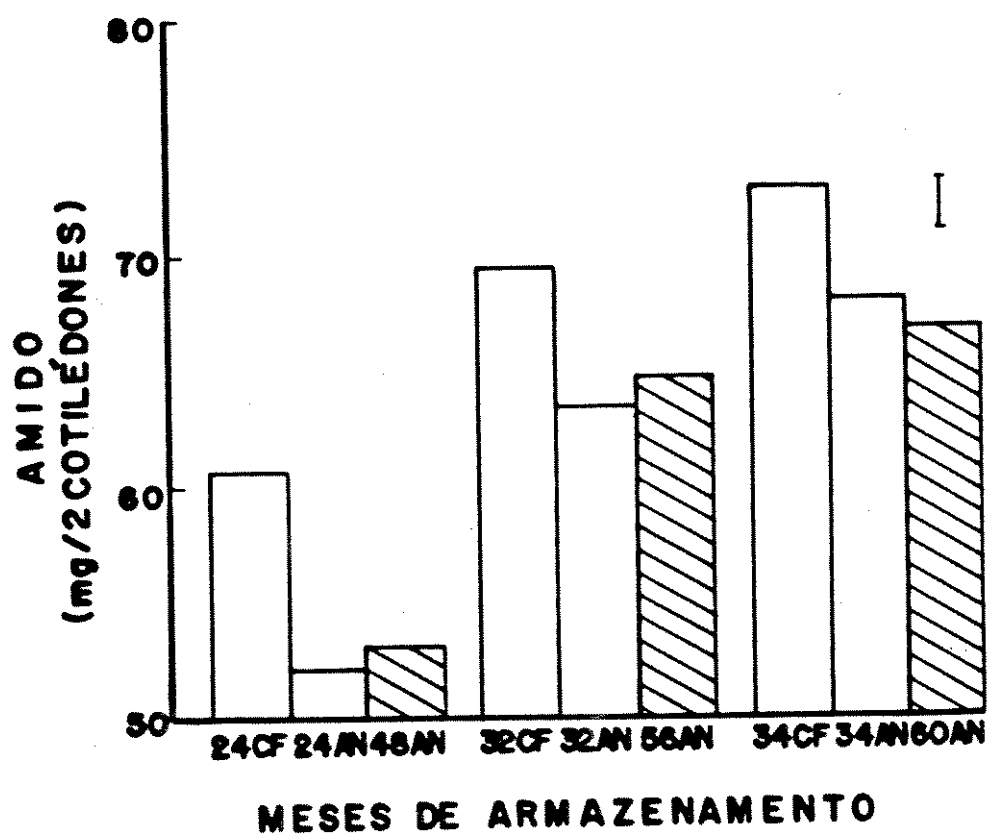


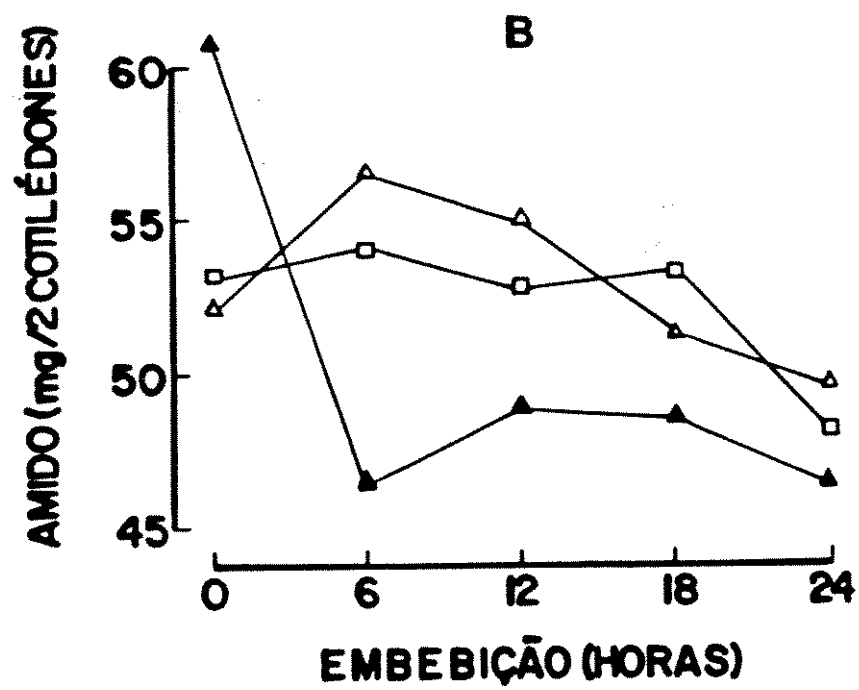
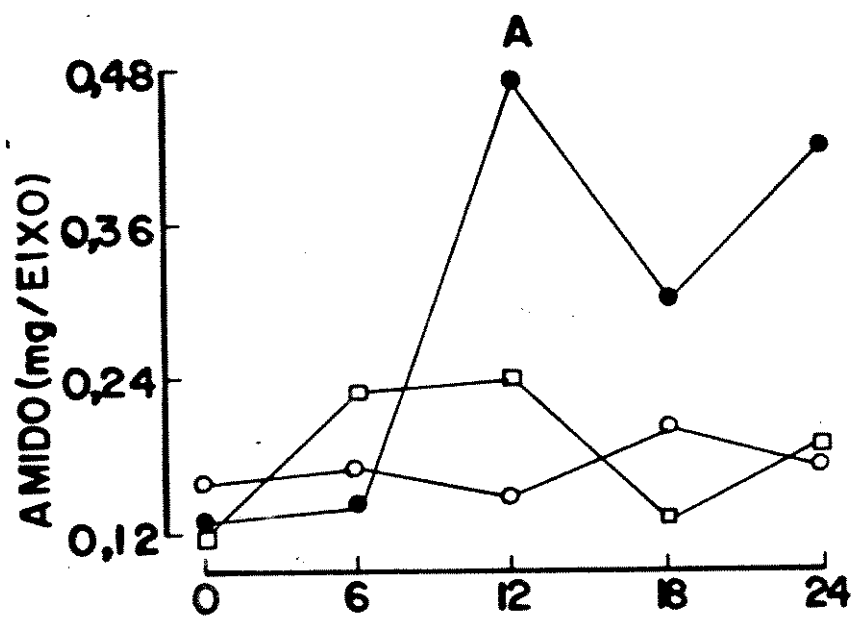
FIGURA 31. Conteúdo de amido (mg/semente) em sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e ambiente natural (24AN2) e do lote 1 por 48 meses em ambiente natural (48AN1), sem embeber e após 6, 12, 18 e 24 hora de embebição.

●. 24CF2 ○. 24 AN2 □. 48AN1

A. Eixos

B. Cotilédones

FIGURA 31



amido durante as 24 horas de embebição com algumas oscilações nos períodos intermediários (FIGURA 31B).

12.6. Lipídios

A FIGURA 32 mostra que o conteúdo de lipídios em sementes inteiras não embebidas armazenadas por 24 meses foi maior quando o acondicionamento foi feito em ambiente natural do que em câmara fria e que as sementes mais velhas, com 48 meses, tiveram conteúdo de lipídios maior do que as mais novas, com 24 meses, quando armazenadas em ambiente natural.

A FIGURA 33 confirma os resultados mostrados na FIGURA 31 com sementes armazenadas por 34 e 58 meses. Em sementes estocadas por 34 meses a condição de ambiente natural elevou os níveis de lipídios em eixos embrionários (FIGURA 33A) e em cotilédones (FIGURA 33B) em relação à estocagem em câmara fria. A estocagem por 58 meses (lote 1) elevou o conteúdo de lipídios em relação à estocagem por 34 meses (lote 2) em ambiente natural em eixos (FIGURA 33A) e em cotilédones (FIGURA 33B).

A embebição das sementes por 24 horas provocou redução nos teores de lipídios em eixos em todos os tratamentos de armazenamento. (FIGURA 33A). Em cotilédones (FIGURA 33B) também houve redução nos níveis de lipídios, sendo que em cotilédones de sementes do lote 1 (sementes mais velhas), armazenadas em ambiente natural, essa redução foi mais drástica do que nos outros tratamentos.

FIGURA 32. Conteúdo de lipídios (mg/semente) em sementes do lote-
2 inteiras e estocadas por 24 meses em câmara fria
(24CF2) e ambiente natural (24AN2) e do lote 1 por 48
meses em ambiente natural (48AN1).

□. 24CF2 □. 24AN2 ▣. 48AN1

FIGURA 32

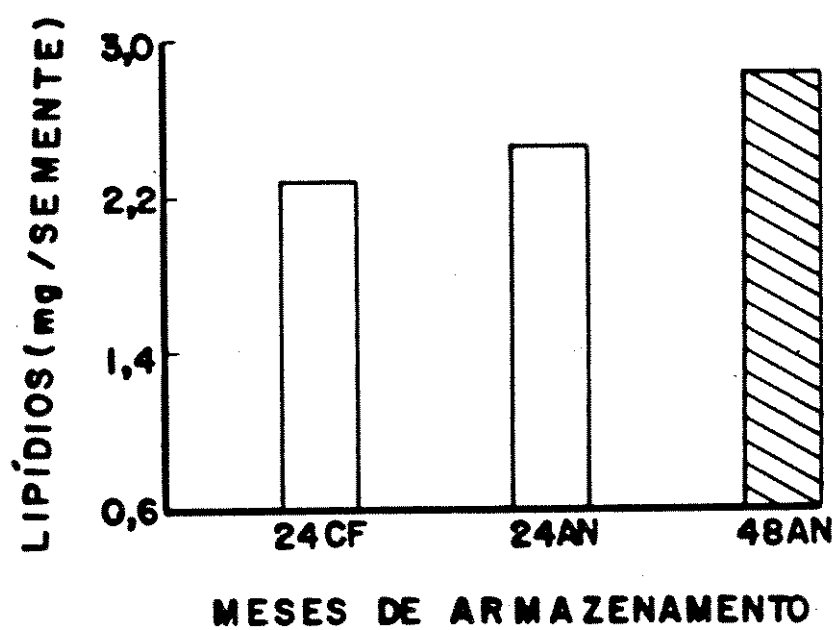


FIGURA 33. Conteúdo de lipídios (mg/semente) em sementes do lote 2 estocadas por 34 meses em câmara fria (34CF2) e ambiente natural (34AN2) e do lote 1 por 58 meses em ambiente natural (58AN1), sem embeber e após 24 horas de embebição.

□. Lote 2

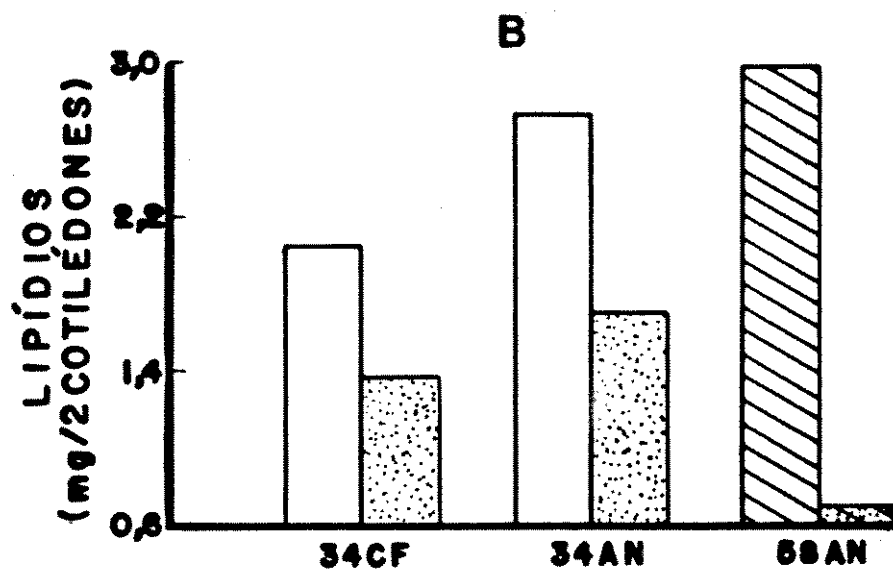
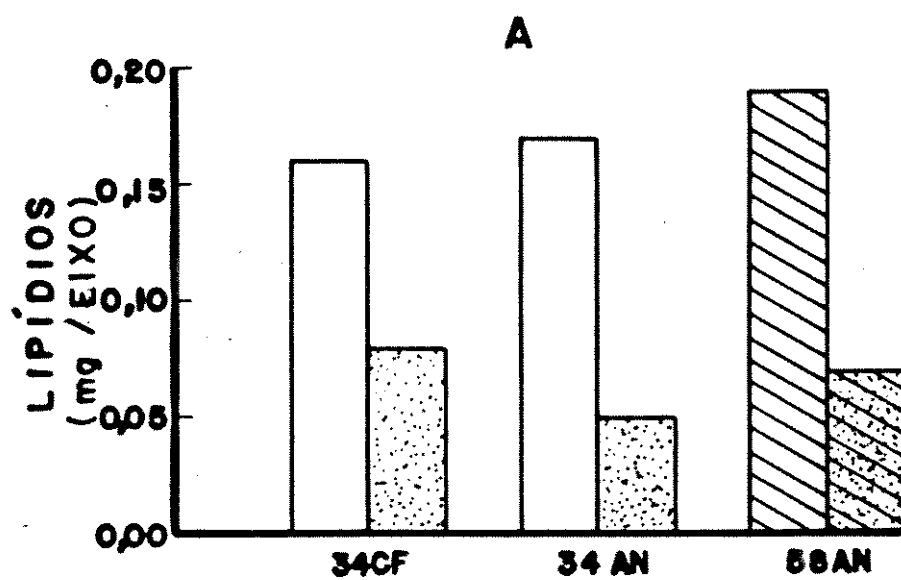
■. Lote 1

⊞. Embebição por 24 horas

A. Eixos

B. Cotilédones

FIGURA 33



MESES DE ALMACENAMIENTO

12.7. Ácidos graxos totais

A TABELA 13 mostra o conteúdo de ácidos graxos totais em eixos embrionários e cotilédones de sementes armazenadas por 34 meses em câmara fria e em ambiente natural (sementes do lote 2) e por 58 meses em ambiente natural (sementes do lote 1) sem embebição e após 24 horas de embebição.

Na fração de ácidos graxos totais (TABELA 13) de eixos de sementes não embebidas armazenadas em câmara fria por 34 meses o ácido graxo mais abundante foi o ácido linoléico, seguido do ácido linolênico, ácido palmítico, ácido oléico e o menos abundante foi o ácido esteárico. O armazenamento em ambiente natural pelo mesmo tempo (34 meses) teve pequeno efeito em relação aos níveis de ácidos graxos encontrados em eixos de sementes armazenadas em câmara fria, elevando os níveis de ácido linoléico e ácido linolênico e reduzindo o de ácido palmítico; os níveis de ácido oléico e ácido esteárico pouco foram afetados pela condição de armazenamento. Os níveis dos ácidos graxos, na fração de ácidos graxos totais de eixos não embebidos, foram elevados pelo aumento no tempo de armazenamento em ambiente natural de 34 para 58 meses, com exceção do nível de ácido linolênico que foi reduzido.

Na fração de ácidos graxos totais de cotilédones de sementes não embebidas armazenadas em câmara fria por 34 meses o ácido graxo mais abundante foi o ácido linolênico seguido do ácido palmítico, ácido linoléico, ácido oléico e o menos abundante foi o ácido esteárico.

O armazenamento em ambiente natural pelo mesmo tempo (34 meses) aumentou os níveis de ácidos graxos insaturados: lino-

TABELA 13. Conteúdo de ácidos graxos totais (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.

condições	ácidos	eixos		cotilédones	
de		e m b e b i ç ã o (horas)			
armazenamento	graxos	0	24	0	24
34CF2	palmitico	35,10	28,87	533,69	266,35
	esteárico	2,12	3,76	89,85	24,98
	oléico	19,56	15,20	280,40	143,05
	linoléico	62,35	19,04	459,28	489,44
	linolênico	41,62	12,07	684,99	443,77
34AN2	palmitico	28,88	10,58	428,02	399,87
	esteárico	2,24	1,10	49,78	34,43
	oléico	20,95	7,10	376,42	170,41
	linoléico	68,22	16,68	916,47	586,13
	linolênico	47,30	11,18	970,53	519,11
58AN1	palmitico	40,93	23,56	714,48	298,51
	esteárico	4,28	1,65	41,13	11,45
	oléico	36,60	12,42	541,57	155,70
	linoléico	73,46	22,43	959,86	167,68
	linolênico	29,73	5,90	708,95	64,76

linolênico, linoléico e oléico e reduziu os níveis de ácidos graxos saturados: ácido palmítico e ácido esteárico em relação aos níveis encontrados em câmara fria.

Os níveis de ácidos graxos na fração de ácidos graxos totais em cotilédones de sementes não embebidas foram modificados pelo aumento no tempo de armazenamento em ambiente natural de 34 para 58 meses: foram aumentados os níveis de ácido linoléico, ácido oléico e ácido palmítico e reduzidos os níveis de ácido linolênico e ácido esteárico.

A embebição das sementes por 24 horas promoveu na fração de ácidos graxos totais uma redução nos conteúdos dos ácidos linoléico, linolênico, oléico, palmítico e esteárico em todos os tratamentos de armazenamento, com exceção do teor de ácido esteárico em eixos de sementes do lote 2 estocadas em câmara fria. Em cotilédones, a embebição das sementes provocou redução nos teores dos ácidos graxos, com exceção do ácido linoléico em estocagem em câmara fria. Em cotilédones de sementes mais velhas (lote 1) estocadas em ambiente natural, observou-se uma redução mais acentuada nos conteúdos dos ácidos linoléico e linolênico do que as reduções encontradas nos outros casos.

foram ainda encontrados traços de ácido palmitoléico e araquidônico.

12.8. Ácidos graxos livres

A TABELA 14 mostra o conteúdo, em porcentagem do total, dos cinco principais ácidos graxos livres presentes na fração de lipídios extraída de eixos e cotilédones de sementes armazenadas

por 34 meses em câmara fria e em ambiente natural (sementes do lote 2) e por 58 meses em ambiente natural (sementes do lote 1) não embebidas e após 24 horas de embebição.

Na fração de ácidos graxos livres (TABELA 14) de eixos de sementes não embebidas armazenadas em câmara fria por 34 meses o ácido graxo que apareceu em maior concentração foi o ácido linoléico, seguido do ácido palmítico, ácido linolênico, ácido oléico e ácido esteárico. A estocagem das sementes em ambiente natural por 34 meses praticamente não afetou os teores de ácidos graxos livres encontrados em lipídios extraídos de eixos quando comparados com os níveis encontrados em eixos de sementes estocadas em câmara fria, exceções feitas aos ácidos linoléico que apresentou pequena redução e linolênico um pequeno aumento. O aumento do tempo de armazenamento em ambiente natural de 34 para 58 meses reduziu a porcentagem do ácido linoléico bem como do ácido linolênico e aumentou as porcentagens dos ácidos esteárico e oléico, sem entretanto provocar variação no teor do ácido palmítico presente no óleo de eixos sem embebição.

Na fração de lipídios extraída de cotilédones de sementes não embebidas armazenadas em câmara fria por 34 meses o ácido graxo livre que apareceu em maior porcentagem foi o ácido linoléico seguido do ácido linolênico, ácido palmítico, ácido oléico e o menos abundante foi o ácido esteárico. O armazenamento das sementes em ambiente natural pelo mesmo período (34 meses) provocou redução nas porcentagens dos ácidos graxos livres insaturados linoléico e linolênico e aumento nos teores dos ácidos graxos livres saturados palmítico e esteárico e na porcentagem do ácido

TABELA 14. Conteúdo de ácidos graxos livres (%) em eixos e cotilédones de sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.

condições de armazenamento	ácidos graxos	eixos e m b e b i ç ã o (horas)		cotilédones	
		0	24	0	24
34LFE	palmitico	25,79	44,82	23,43	31,62
	estearico	1,97	6,96	5,29	1,67
	oléico	15,86	24,32	12,00	10,07
	linoléico	38,52	15,85	31,09	29,32
	linolênico	17,86	8,05	28,20	27,39
34AN2	palmitico	26,71	46,90	28,82	30,37
	estearico	1,92	3,65	6,98	1,31
	oléico	14,34	23,58	21,83	9,09
	linoléico	34,77	20,85	24,86	33,08
	linolênico	22,26	5,07	17,51	26,15
58AN1	palmitico	26,33	47,37	35,52	52,37
	estearico	2,40	4,50	5,03	5,10
	oléico	24,72	25,56	27,66	23,74
	linoléico	31,96	18,65	20,10	13,04
	linolênico	14,59	3,93	11,69	5,75

oléico. Em sementes armazenadas em ambiente natural por 58 meses, essas diferenças foram mais acentuadas, com exceção do ácido esteárico cuja porcentagem foi reduzida em relação àquela encontrada em sementes com 34 meses de armazenamento em ambiente natural.

A embebição de sementes por 24 horas provocou alterações nas proporções de ácidos graxos livres de lipídios de eixos e de cotilédones de sementes de todos os tratamentos de estocagem (TABELA 14). Em eixos houve aumento nas porcentagens de ácidos graxos saturados ácido palmítico e ácido esteárico e do ácido oléico e redução nos teores dos ácidos insaturados linoléico e linolênico, sendo que a redução no ácido linolênico foi mais acentuada em lipídios de eixos de sementes armazenadas em ambiente natural (lotes 1 e 2).

Em lipídios extraídos de cotilédones de sementes armazenadas em câmara fria a embebição por 24 horas levou a um aumento na porcentagem de ácido palmítico e redução na de ácido esteárico. Os ácidos oléico, linoléico e linolênico praticamente mantiveram as mesmas proporções encontradas em lipídios extraídos de cotilédones de sementes não embebidas.

Em sementes armazenadas em ambiente natural pelo mesmo tempo (34 meses) a embebição aumentou as porcentagens dos ácidos linoléico e linolênico; a proporção de ácido palmítico praticamente não se alterou e os ácidos oléico e esteárico apresentaram redução em suas porcentagens. Em cotilédones de sementes estocadas em ambiente natural por 58 meses os níveis de ácido linoléico e linolênico de lipídios extraídos apresentaram uma redução acentuada; de ácido oléico, uma pequena redução, enquanto o nível de

ácido esteárico não se alterou e o de ácido palmítico aumentou.

12.9. *Peróxidos*

Os níveis de óleo e de peróxidos em sementes inteiras do lote 2 armazenadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 armazenadas por 48 meses em ambiente natural são mostrados na TABELA 15. O conteúdo de óleo e de peróxido em sementes aumentou significativamente quando o armazenamento foi feito em ambiente natural em relação ao feito em câmara fria e também com o tempo de estocagem em ambiente natural.

Em sementes não embebidas do lote 2 armazenadas em câmara fria e em ambiente natural por 34 meses e em sementes do lote 1 armazenadas em ambiente natural por 58 meses, eixos embrionários apresentaram aumento significativo nos teores de peróxidos com a mudança no tipo de armazenamento de câmara fria para ambiente natural e com o aumento do tempo de estocagem em ambiente natural (TABELA 16). Em cotilédones, o padrão de aumento no índice de peróxido foi semelhante ao encontrado em eixos; porém, o índice de peróxido encontrado nos cotilédones de sementes armazenadas por 34 meses em ambiente natural não diferiu significativamente dos outros dois.

A embebição das sementes promoveu redução nos teores de peróxidos encontrados em eixos e em cotilédones de sementes de todos os tratamentos, sendo esta redução mínima em eixos das sementes mais velhas, lote 1 (TABELA 16).

TABELA 15. Conteúdo de óleo e índice de peróxido em sementes inteiras, com diferentes períodos de armazenamento.

condições de armazenamento	teor de óleo (mg/semente)	índice de peróxido (neq./semente)
24CF2	2,31 c	21,07 c
24AN2	2,48 b	70,08 b
48AN1	2,85 a	173,99 a
DMS	0,15	18,33
CV (%)	1,40	4,80

NOTA: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 16. índice de peróxidos (neq./semente) em eixos e cotilédones de sementes sob diferentes condições, por diferentes períodos, sem embebição e após 24 horas de embebição.

condições de armazenamento	eixos		cotilédones	
	e m b e b i ç ã o (horas)			
	0	24	0	24
34CF2	28,75 c	13,30 b	326,52 b	138,08 c
34AN2	45,91 b	16,45 b	780,07 ab	293,89 b
58AN1	85,77 a	83,55 a	1324,14 a	413,03 a
DMS	13,00	11,82	660,00	35,40
CV (%)	9,70	12,75	30,76	5,05

Nota: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

13. Efeito da mudança no teor relativo de água

13.1. Protrusão de radícula após 1 dia

O aumento no teor de umidade inicial de sementes armazenadas em câmara fria não modificou a protrusão quando as estocagens foram feitas por até 24 meses; estocagens por períodos mais longos reduziram este parâmetro (FIGURA 34A). Já em sementes armazenadas em ambiente natural o aumento no teor de umidade só não afetou a protrusão em estocagens feitas até 12 meses; estocagens mais longas determinaram reduções gradativas significativas até o final do experimento.

A redução no teor de umidade inicial de sementes estocadas em câmara fria até o 6^o mês não determinou variações significativas na porcentagem de protrusão da radícula; no 9^o mês de armazenamento a redução no teor de umidade das sementes determinou redução significativa na protrusão da radícula após 1 dia, redução esta que se manteve praticamente inalterada até o final do experimento. Em sementes estocadas em ambiente natural a redução no teor de umidade inicial só não reduziu a protrusão até o 3^o mês de estocagem, a partir deste tempo de armazenamento até o 36^o mês de armazenamento este tratamento determinou uma redução gradativa significativa na protrusão após 1 dia da semeadura.

Sementes armazenadas em ambiente natural, cujo o nível de umidade inicial não foi modificado, apresentaram redução significativa na protrusão de radícula em relação às sementes armazenadas em câmara fria a partir do 12^o mês de armazenamento até o 36^o mês. Quando o teor de umidade inicial foi elevado em sementes mantidas em câmara fria e em ambiente natural verificou-se que as

sementes de ambiente natural só apresentaram redução significativa na protrusão de radícula a partir do 15^o mês enquanto com o abaixamento no teor de umidade, a redução causada por ambiente natural foi antecipada para o 6^o mês, sendo significativa no 6^o mês e a partir do 15^o mês até o final do experimento.

13.2. Protrusão de radícula após 3 dias

O aumento no teor de umidade inicial de sementes armazenadas em câmara fria não determinou alterações significativas na protrusão de radícula após 3 dias (FIGURA 34B) durante os 36 meses de estocagem. Em sementes armazenadas em ambiente natural não houve redução significativa na protrusão até o 18^o mês. A partir do 21^o mês de estocagem até o 36^o mês, as reduções foram estatisticamente significativas.

A redução no teor de umidade inicial da semente armazenada em câmara fria, até o período de 36 meses não provocou alterações significativas na protrusão após 3 dias, com exceção do 24^o mês, enquanto em sementes armazenadas em ambiente natural até o 18^o mês não houve variações significativas e a partir deste mês, até o final do experimento houve redução gradativa e significativa na porcentagem de protrusão após 3 dias.

A condição de ambiente natural determinou uma redução significativa na porcentagem de protrusão de radícula após 3 dias do início da embebição, a partir de 15 meses de estocagem, em relação à condição de câmara fria em sementes cujo teor inicial de

FIGURA 34. Efeitos do teor relativo de água na protrusão de radícula (arco seno $\sqrt{P}$) em sementes estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos.

■. CFU □. ANU ▲. CFS

△. ANS ●. CF ○. AN

A. Após 1 dia da semeadura

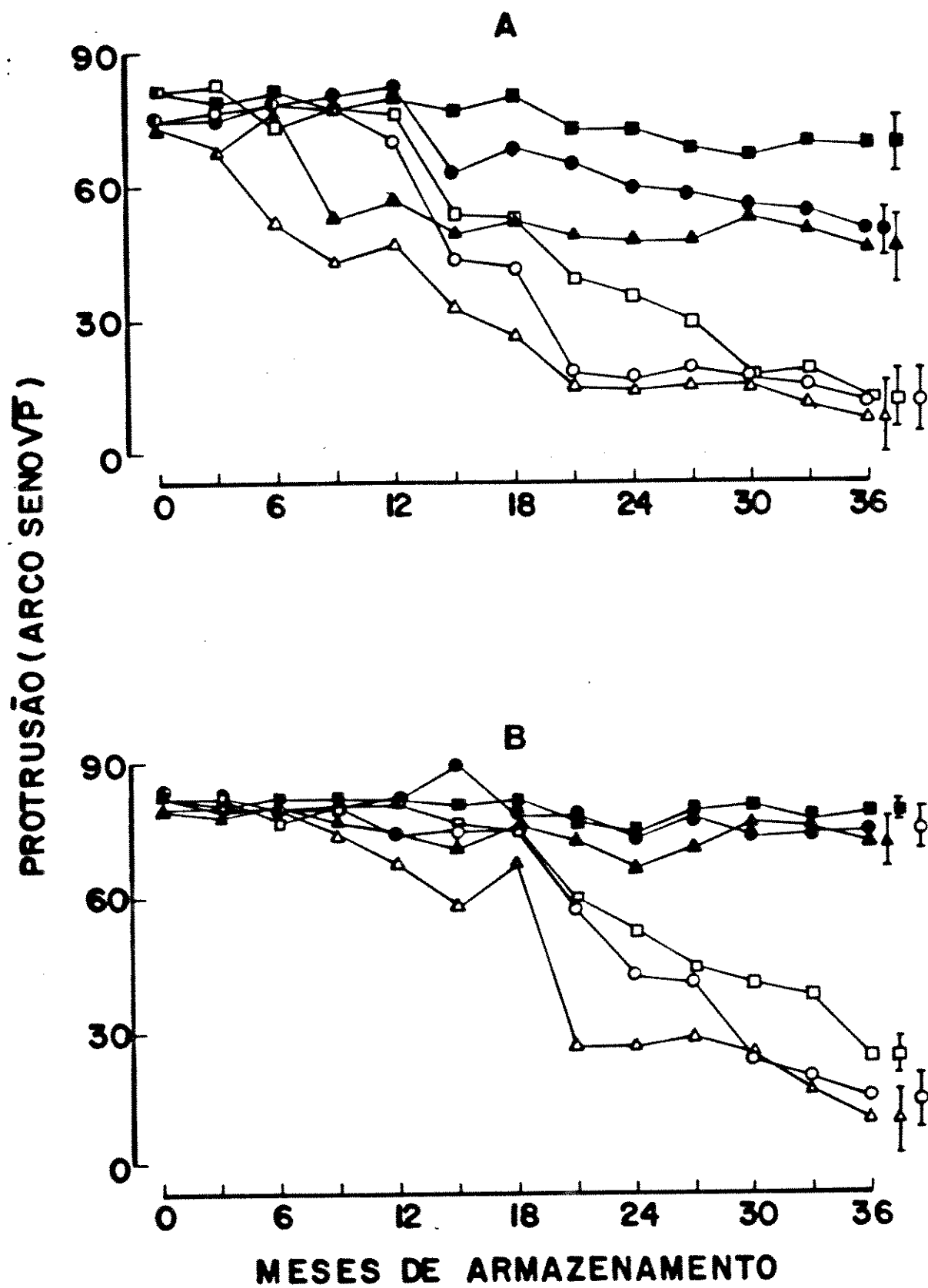
B. Após 3 dias da semeadura

CFU e ANU. Sementes com teor de umidade elevado

CFS e ANS. Sementes com teor de umidade reduzido

CF e AN. Sementes cujo teor de umidade não foi modificado

FIGURA 34



água não foi modificado e a partir de 21 meses em sementes com alto teor de umidade inicial e a partir de 12 meses quando a protrusão de radícula foi estudada em sementes com baixo teor de umidade.

A elevação no teor de umidade das sementes armazenadas em câmara fria e em ambiente natural elevou a protrusão de radículas 1 e 3 dias (FIGURAS 34A e B) após a semeadura, em alguns meses de armazenamento; já o efeito da redução no teor de umidade das sementes foi reduzir significativamente a protrusão de radículas de sementes armazenadas em câmara fria e em ambiente natural em alguns meses de armazenamento.

14. Efeito do tratamento com temperatura e umidade relativa altas

14.1. Germinação e vigor

14.1.1 Protrusão da radícula após 1 dia

O tratamento com alta temperatura e umidade relativa por 24 e 48 horas não provocou alterações estatisticamente significativas na porcentagem de protrusão da radícula (FIGURA 35A) em sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e em sementes recém-colhidas (lote 5); quando esse tratamento foi mantido até 72 horas, houve redução significativa na protrusão de radícula em sementes do lote 2 e recém-colhidas, sendo que em sementes do lote 2 estocadas em ambiente natural não houve protrusão.

O armazenamento em ambiente natural determinou uma redução estatisticamente significativa ao nível de 5% na porcentagem de protrusão da radícula em comparação com a condição de câ-

FIGURA 35. Protrusão de radícula (arco seno $\sqrt{P}$) em sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas, após 1 dia da semeadura.

●. 24CF ○. 24AN2 ◇. N5

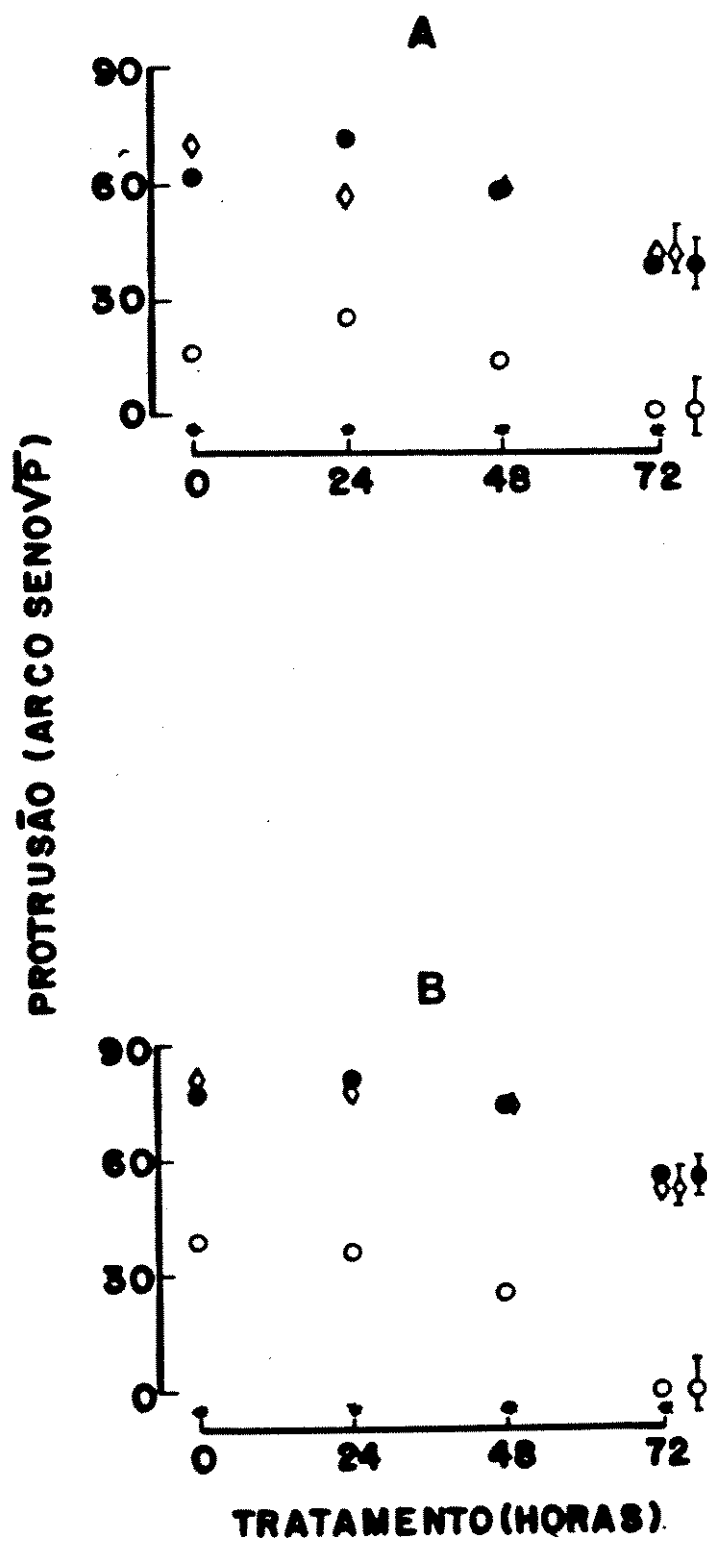
A. Após 1 dia da semeadura

3. Após 3 dias da semeadura

As barras representam as DMS entre os tratamentos com temperatura e umidade relativa altas

* N e CF diferem significativamente ao nível de 5% de AN

FIGURA 35



mara fria e com sementes recém-colhidas tanto no tempo zero como nos demais tempos de tratamento com temperatura e umidade relativa altas.

14.1.2. Protrusão da radícula após 3 dias

O tratamento das sementes com alta temperatura e umidade relativa por períodos de 24 e 48 horas não exerceu influência na protrusão da radícula após 3 dias (FIGURA 35B) em sementes estocadas em câmara fria e sementes recém-colhidas tendo entretanto determinado redução após 72 horas de tratamento. Em sementes armazenadas em ambiente natural houve redução apenas após 48 horas de tratamento, sendo que após 72 horas não houve protrusão.

O armazenamento em ambiente natural determinou redução significativa na protrusão após 3 dias, em relação ao armazenamento em câmara fria e às sementes recém-colhidas, tanto na ausência como na presença dos tratamentos com alta temperatura e umidade relativa.

14.1.3. Germinação de sementes após 5 dias

De acordo com a FIGURA 36A, em sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria e em sementes recém-colhidas (lote 5), a condição de temperatura e umidade relativa elevadas até após 24 e 48 horas não afetou significativamente a germinação após 5 dias. Quando o tratamento foi mantido por 72 horas houve redução significativa na porcentagem de germinação. Em sementes estocadas em ambiente natural a porcentagem de germinação foi reduzida após 48 horas de tratamento e nula após 72 horas de trata-

mento com alta temperatura e umidade relativa.

A condição de ambiente natural determinou redução significativa na germinação de sementes em relação à condição de câmara fria e de sementes recém-colhidas em todos os tratamentos; entre sementes recém-colhidas e sementes armazenadas em câmara fria não houve diferença significativa na porcentagem de germinação com 5 dias após a semeadura.

14.1.4. Germinação de sementes após 9 dias

O tratamento de sementes estocadas em câmara fria e sementes recém-colhidas com alta temperatura e umidade relativa, por períodos de 24 e 48 horas não afetou significativamente a porcentagem de germinação após 9 dias (FIGURA 36B), quando o tratamento foi conduzido por 72 horas, houve redução estatisticamente significativa na porcentagem de germinação tanto em sementes estocadas em câmara fria como em sementes recém-colhidas e, entre as duas não houve diferença significativa.

Sementes estocadas em ambiente natural quando tratadas por 24 horas apresentaram um aumento significativo na porcentagem de germinação. O tratamento por 48 horas não determinou alterações significativas e, por 72 horas, reduziu a zero a germinação com 9 dias.

A condição de ambiente natural determinou uma redução significativa na porcentagem de germinação após 9 dias em relação às sementes estocadas em câmara fria tanto antes como após o tratamento com alta temperatura e umidade relativa.

FIGURA 36. Germinação (arco seno $\sqrt{p}$) de sementes recém-colhidas

(N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas, após 5 dias da semeadura.

● - 24CF ○ - 24AN2 ◇ - N5

A. Após 5 dias da semeadura

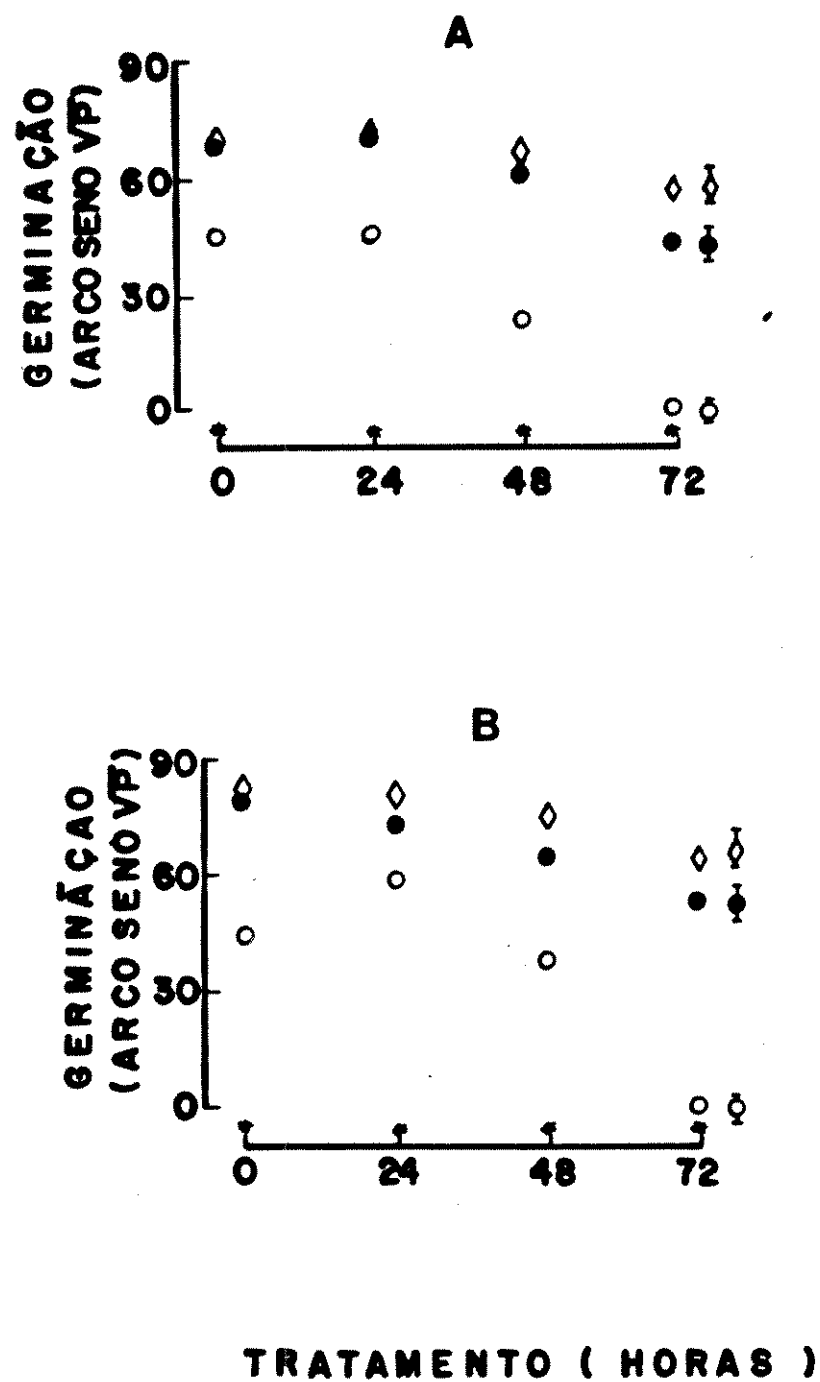
B. Após 9 dias da semeadura

As barras representam as DMS entre os tratamentos com temperatura e umidade relativa altas

* N e CF diferem significativamente ao nível de 5% de

AN

FIGURA 36



Sementes do lote 2 estocadas em ambiente natural, sem tratamento e após 24 e 48 horas de tratamento com alta temperatura e umidade relativa, apresentaram maior porcentagem de plântulas anormais do que sementes estocadas em câmara fria, e sementes recém-colhidas apresentaram menor porcentagem de plântulas anormais nos três tratamentos. Quando o tratamento foi mantido até o período de 72 horas, houve redução na porcentagem de plântulas anormais em sementes armazenadas, em sementes recém-colhidas praticamente não houve alteração (FIGURA 37A).

O tratamento de sementes estocadas em câmara fria e em ambiente natural com alta temperatura e umidade relativa determinou sempre a ocorrência de maior porcentagem de sementes deterioradas (FIGURA 37B) no teste de germinação após 9 dias do que em sementes recém-colhidas, sendo essa porcentagem bem maior em sementes estocadas na condição de ambiente natural. A duração do tratamento por 48 e 72 horas provocou aumento na porcentagem de sementes deterioradas nos dois lotes de sementes.

14.1.5. Velocidade de emergência

A FIGURA 38 mostra que o tratamento das sementes com alta temperatura e umidade relativa por 24, 48 e 72 horas, determinou uma redução significativa no índice de velocidade de emergência de plântulas provenientes de sementes estocadas em câmara fria e sementes recém-colhidas. Em sementes estocadas em ambiente natural o tratamento com alta temperatura e umidade relativa só determinou diferenças significativas após 48 horas, sendo que após 72 horas não houve emergência de plântulas.

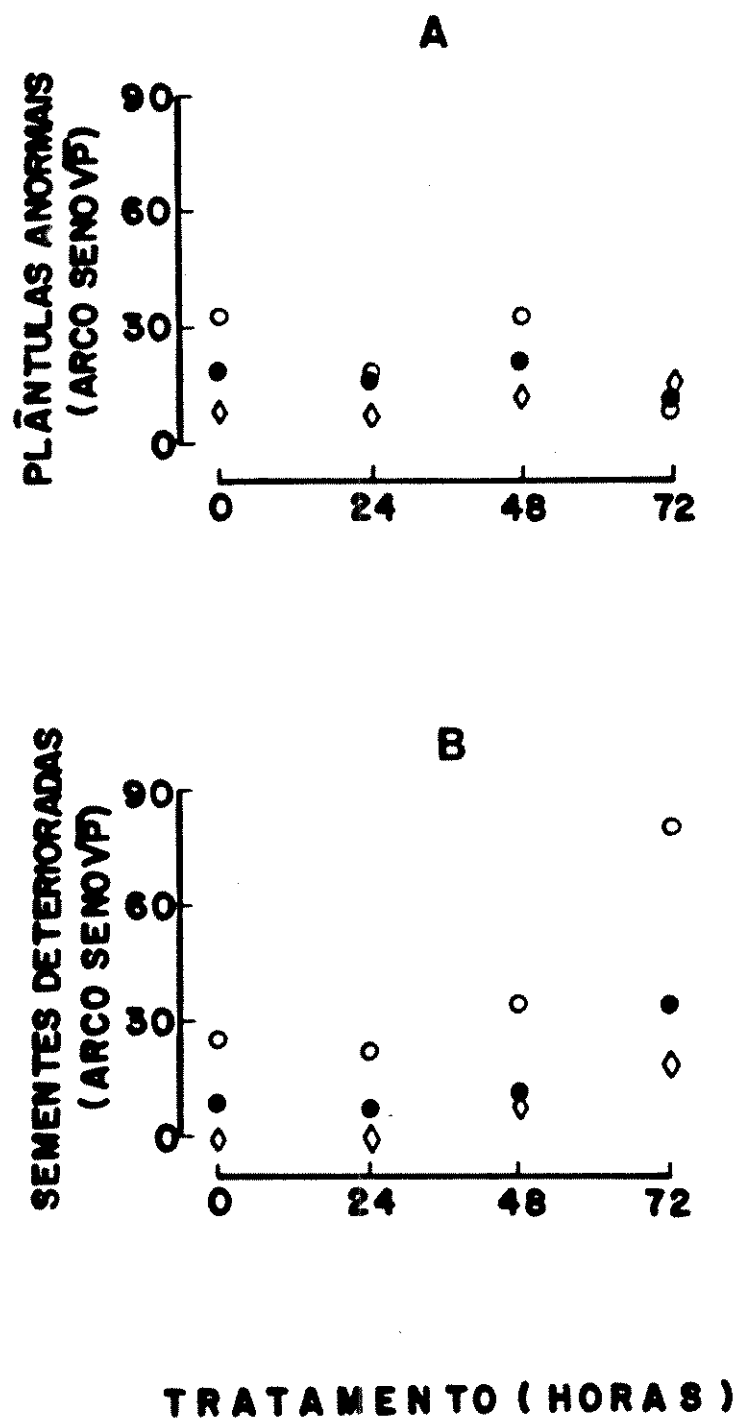
FIGURA 37. Plântulas anormais e sementes deterioradas (arco seno VP) oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas, após 9 dias da semeadura.

● . 24CF ○ . 24AN2 ◇ . N5

A. Plântulas anormais

B. Sementes deterioradas

FIGURA 37



A condição de ambiente natural determinou redução significativa no índice de velocidade de emergência, em relação ao armazenamento em câmara fria e a sementes recém-colhidas, tanto na ausência como na presença dos tratamentos com alta temperatura e umidade relativa (FIGURA 38).

14.1.6. População final após 14 dias

De acordo com a FIGURA 39, o tratamento das sementes dos lote 2 e 4 com alta temperatura e umidade relativa por 24 e 48 horas, não provocou alterações significativas na população final de plântulas após 14 dias. Quando o tratamento foi mantido por 72 horas, provocou redução significativa na população final de plântulas oriundas de sementes estocadas em câmara fria e de sementes recém-colhidas, sendo que para sementes estocadas em ambiente natural não houve formação de plântulas.

A estocagem em ambiente natural só determinou diferença estatisticamente significativa na população final após 14 dias em relação ao armazenamento em câmara fria e em sementes recém-colhidas após o tratamento com alta temperatura e umidade relativa por 24, 48 e 72 horas.

14.1.7. Comprimento da radícula de plântulas após 4 dias

A FIGURA 40 mostra que o comprimento da radícula de plântulas provenientes de sementes estocadas em câmara fria e de sementes recém-colhidas apresentaram um comportamento semelhante

FIGURA 38. Índice de velocidade de emergência de plântulas oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas.

●. 24CF ○. 24AN2 ◇. N5

As barras representam as DMS entre os tratamentos com temperatura e umidade relativa altas

* N e CF diferem significativamente ao nível de 5% de AN

FIGURA 39. População final (arco seno V_p) de plântulas oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas, após 14 dias da semeadura.

●. 24CF ○. 24AN2 ◇. N5

As barras representam as DMS entre os tratamentos com temperatura e umidade relativa altas

* N e CF diferem significativamente ao nível de 5% de AN

FIGURA 38

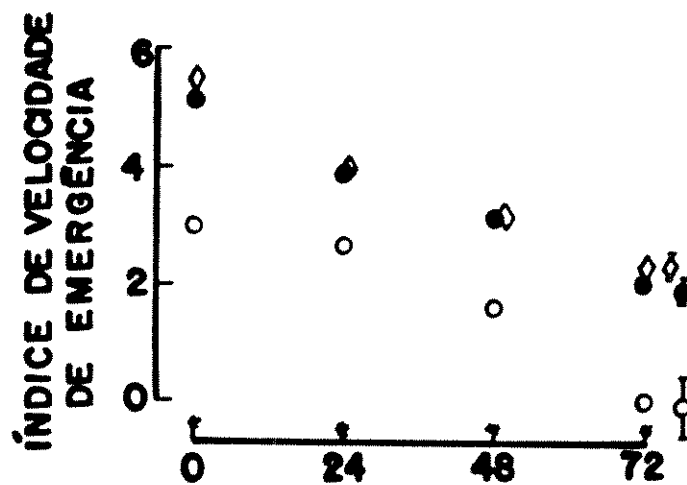
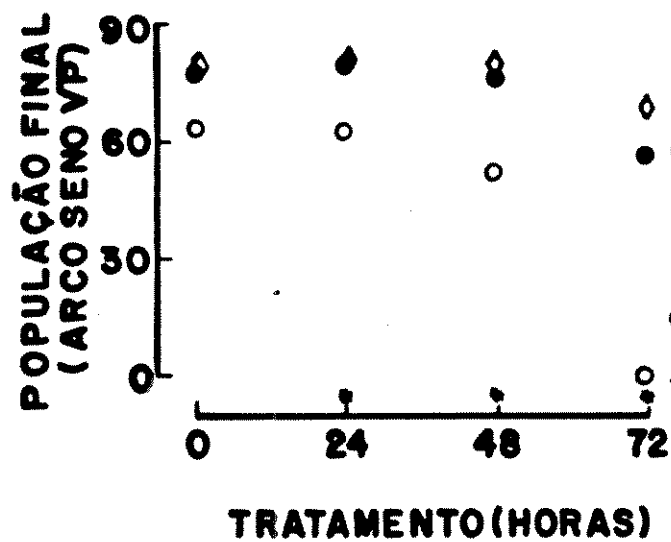


FIGURA 39



entre si quando tratadas com alta temperatura e umidade relativa, tendo ambas apresentado redução estatisticamente significativa após 24, 48 e 72 horas de tratamento.

O tratamento de sementes estocadas em ambiente natural só determinou redução significativa no comprimento da radícula após 48 horas de tratamento, sendo que após 72 horas não houve germinação de sementes.

A condição de ambiente natural quando comparada com a de câmara fria e sementes recém-colhidas determinou redução estatisticamente significativa no comprimento da radícula de plântulas tanto antes como após os tratamentos com altas temperaturas e umidades relativas.

14.1.8. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 8 dias

O peso da massa de matéria seca após 8 dias (FIGURA 41) de plântulas provenientes tanto de sementes armazenadas como de sementes recém-colhidas não sofreu alteração significativa quando as sementes foram tratadas com alta temperatura e umidade relativa por períodos de até 48 horas. Quando as sementes foram mantidas nessa condição por 72 horas, ocorreu redução estatisticamente significativa na matéria seca de plântulas oriundas de sementes armazenadas em câmara fria e recém-colhidas, e reduziu a zero a massa de matéria seca de sementes estocadas em ambiente natural.

O tratamento com alta temperatura e umidade relativa por 24 horas determinou maior conteúdo de matéria seca em plântulas oriundas de sementes recém-colhidas seguidas de sementes armazenadas em câmara fria e em ambiente natural, sendo que essas

diferenças foram estatisticamente significativas. O tratamento por 48 horas provocou redução significativa na massa de matéria seca de plântulas provenientes de sementes estocadas em ambiente natural em relação a de sementes recém-colhidas sem entretanto diferir matéria seca de plântulas oriundas de sementes estocadas em câmara fria. Quando o tratamento foi mantido por 72 horas o conteúdo de matéria seca de plântulas oriundas de sementes recém-colhidas foi maior do que o de sementes armazenadas em câmara fria e essa diferença foi estatisticamente significativa.

14.1.9. Peso da massa de matéria seca de plântulas após 14 dias

O peso das massas de matéria seca (FIGURA 42) de plântulas provenientes de sementes estocadas em câmara fria e recém-colhidas não apresentaram alterações significativas antes e após o tratamento com alta temperatura e umidade relativa por 24 e 48 horas. Quando o tratamento foi dado por 72 horas houve uma redução significativa nesse parâmetro.

A condição de ambiente natural determinou aumento significativo no peso de matéria seca após 24 horas de tratamento com alta temperatura e umidade relativa; após 48 horas a matéria seca foi estatisticamente semelhante à de plântulas provenientes de sementes não tratadas e, após 72 horas, não houve desenvolvimento de plântulas.

A redução na matéria seca de plântulas oriundas de sementes armazenadas em ambiente natural em relação às sementes estocadas em câmara fria e sementes recém-colhidas foi estatística-

FIGURA 40. Comprimento da radícula (mm) de plântulas oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa alta, após 4 dias da semeadura.

FIGURA 41. Peso da massa de matéria seca (mg/plântula) de plântulas oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa alta, após 8 dias da semeadura.

FIGURA 42. Peso da massa de matéria seca (mg/plântula) de plântulas oriundas de sementes recém-colhidas (N5) e estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa alta, após 14 dias da semeadura.

●. 24CF O. 24AN2 ◇. N5

As barras representam as DMS entre os tratamentos com temperatura e umidade relativa altas

* N e CF diferem significativamente ao nível de 5% de

AN

FIGURA 40

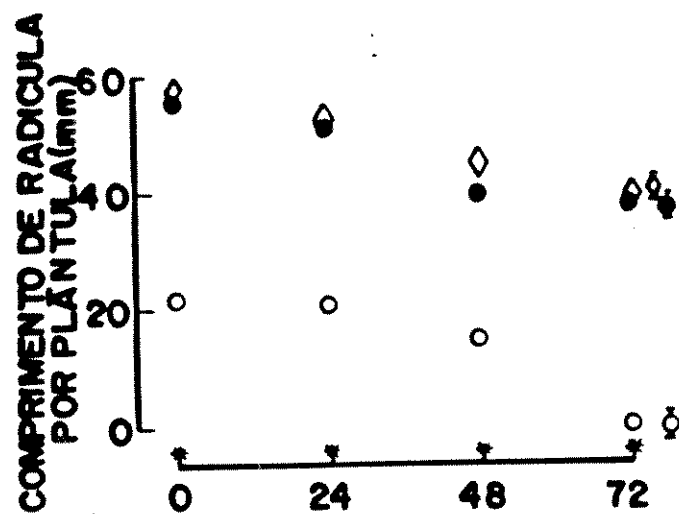


FIGURA 41

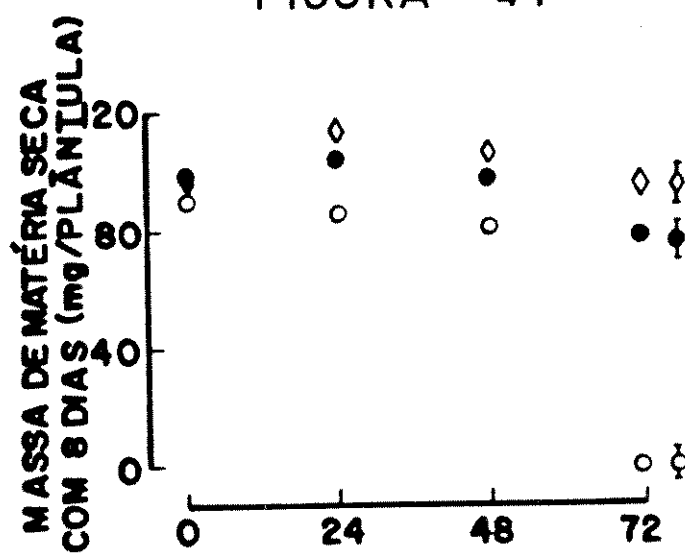
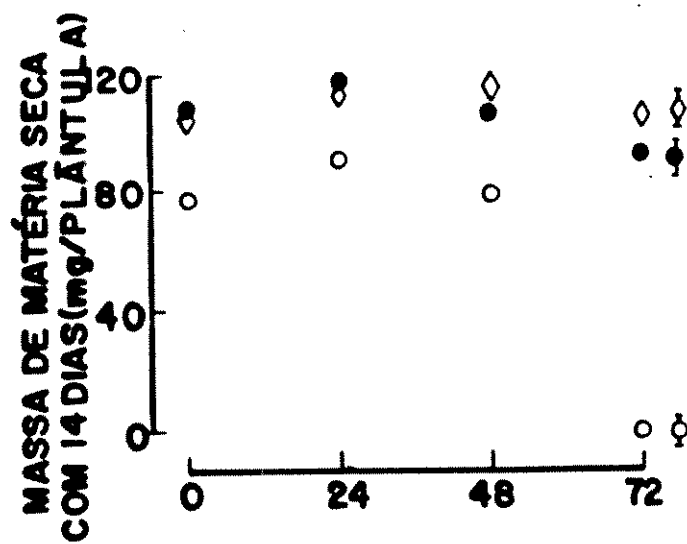


FIGURA 42



mente significativa após tratamentos por 24, 48 e 72 horas. Sementes armazenadas em câmara fria também apresentaram redução no conteúdo de matéria seca em relação a sementes recém-colhidas após 48 e 72 horas de tratamento com alta temperatura e umidade relativa.

14.2. Determinações bioquímicas

14.2.1. Aminoácidos livres.

Os teores de aminoácidos em eixos embrionários de sementes armazenadas em câmara fria e em ambiente natural (FIGURA 43A) apresentaram elevação após permanecerem 24 horas sob alta umidade relativa e temperatura elevada. Após 48 horas neste tratamento os eixos de sementes estocadas em câmara fria e de sementes recém-colhidas, (que foram dosadas só a partir de 24 horas nesse tratamento), apresentaram teores de aminoácidos que praticamente não se alteraram, tendo entretanto, apresentado tendência a redução após 72 horas. Em eixos de sementes armazenadas em ambiente natural o tratamento por 48 horas reduziu e, por 72 horas praticamente não modificou este conteúdo.

Em cotilédones (FIGURA 43B) de sementes armazenadas em câmara fria o tratamento por 24 horas determinou um aumento no conteúdo de aminoácidos e, após 48 e 72 horas de tratamento houve uma pequena redução nesse conteúdo tanto em cotilédones de sementes estocadas em câmara fria como de sementes recém-colhidas. Em cotilédones de sementes estocadas em ambiente natural o tratamento por até 48 horas praticamente não determinou alterações no

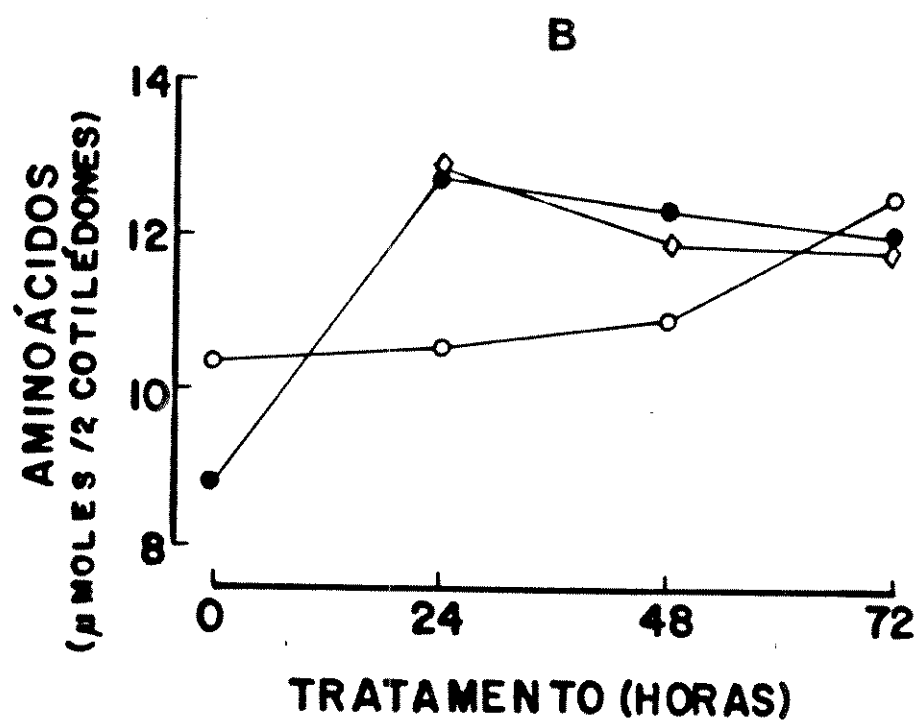
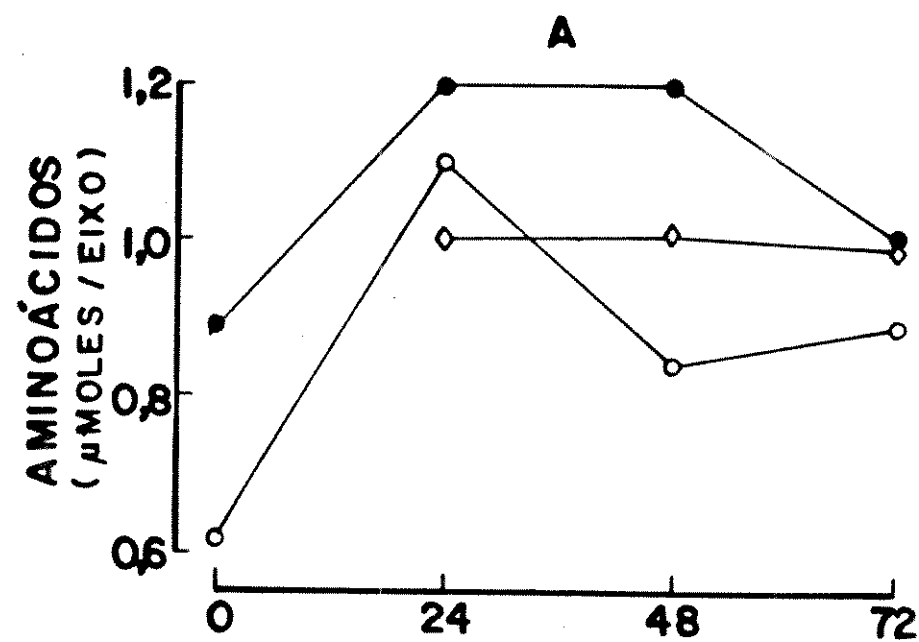
FIGURA 43. Conteúdo de aminoácidos (μ moles/semente) em sementes recém-colhidas (NS) e em sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas.

● . 24CF2 ○ . 24AN2 ◇ . NS

A. Elxos

B. Cotilédones

FIGURA 43



conteúdo de aminoácidos, tendo entretanto determinado uma pequena elevação nesse conteúdo após 72 horas de tratamento.

14.E.2. Açúcares solúveis totais.

A FIGURA 44 mostra que o tratamento de sementes com alta umidade relativa e temperatura elevada provoca alterações nos teores de açúcares solúveis em eixos e cotilédones tanto de sementes armazenadas em câmara fria e em ambiente natural. Em eixos (FIGURA 44A) de sementes armazenadas em câmara fria houve aumento no teor de açúcares livres com tratamento de até 48 horas, seguido por redução nesse conteúdo após 72 horas. Em eixos de sementes estocadas em ambiente natural 24 horas de tratamento também determinaram aumento no conteúdo de açúcares solúveis seguido por reduções após 48 e 72 horas de envelhecimento precoce. As extrações em eixos de sementes recém-colhidas após 24 e até 72 horas de tratamento mostraram poucas alterações nos níveis de açúcares solúveis.

Cotilédones (FIGURA 44B) de sementes estocadas em câmara fria mostraram aumento no teor de açúcares solúveis de 0 para 24 horas de envelhecimento precoce e redução paulatina até 72 horas. Em cotilédones de sementes estocadas em ambiente natural o envelhecimento precoce provocou, apesar de algumas oscilações, uma tendência a redução nesse conteúdo até 72 horas de tratamento, enquanto em sementes recém-colhidas o conteúdo de açúcares solúveis em cotilédones pouco variou.

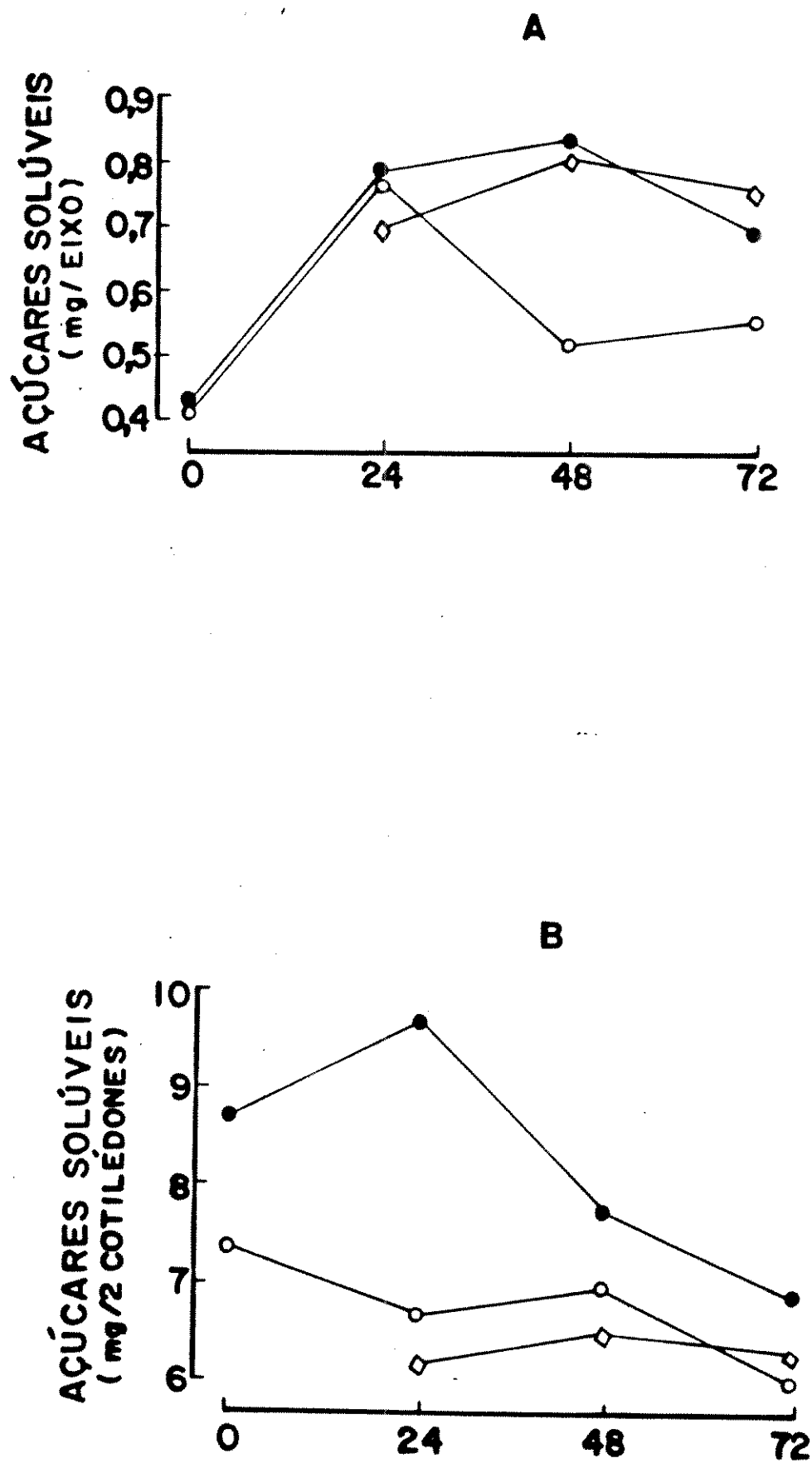
FIGURA 44. Conteúdo de açúcares solúveis totais (mg/semente) em sementes recém-colhidas (N5) e em sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas.

●. 24CF2 ○. 24AN2 ◇. N5

A. Eixos

B. Cotilédones

FIGURA 44



14.2.3. Proteínas

A FIGURA 45 mostra o conteúdo de proteínas em eixos e cotilédones de sementes recém-colhidas e de sementes armazenadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural, tratadas por diferentes períodos a temperatura e umidade relativa altas (temperatura de 42°C e umidade relativa de 100 %).

O conteúdo de proteínas em eixos (FIGURA 45A) de sementes armazenadas tanto em câmara fria como em ambiente natural apresentou oscilações, com uma tendência a redução à medida que aumentou o tempo de envelhecimento acelerado, enquanto em eixos de sementes recém-colhidas, essa redução não foi clara.

Após 24 horas de tratamento os cotilédones (FIGURA 45B) de sementes armazenadas em câmara fria e em ambiente natural apresentaram um pequeno aumento no conteúdo de proteínas e, após 48 horas houve uma tendência a terem esses teores reduzidos em ambos os tratamentos.

Em cotilédones de sementes recém-colhidas, as extrações feitas após 24 e 48 horas de tratamento mostraram conteúdos de proteínas semelhantes. Após 72 horas de tratamento, cotilédones de sementes das três amostras mantiveram seus conteúdos de proteínas praticamente inalterados em relação ao tratamento de 48 horas.

14.2.4. Polissacarídeos solúveis em água (WSP)

A FIGURA 46 mostra o conteúdo de polissacarídeos solúveis em água em eixos e cotilédones de sementes armazenadas em

FIGURA 45. Conteúdo de proteínas (mg/semente) em sementes recém-

colhidas (N5) e em sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa alta.

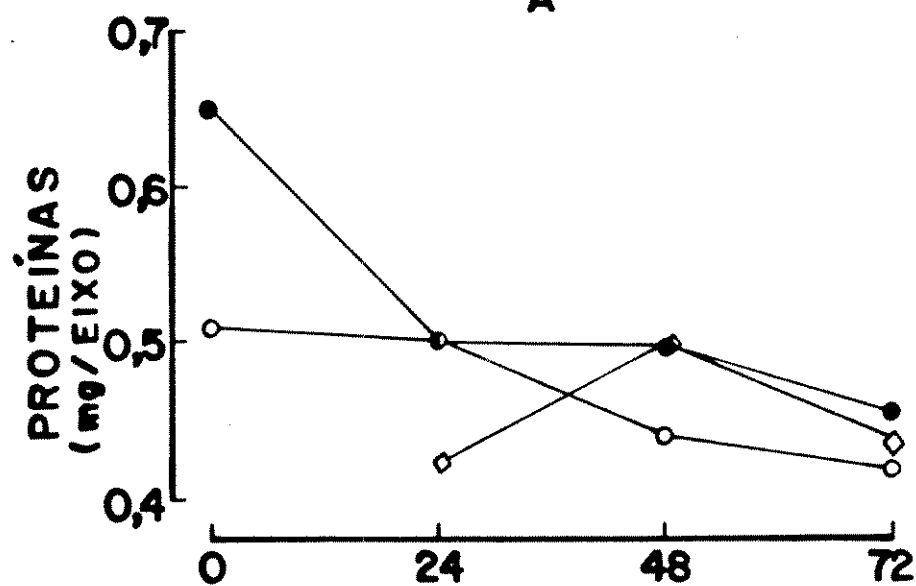
● . 24CF2 ○ . 24AN2 ◇ . N5

A. Eixos

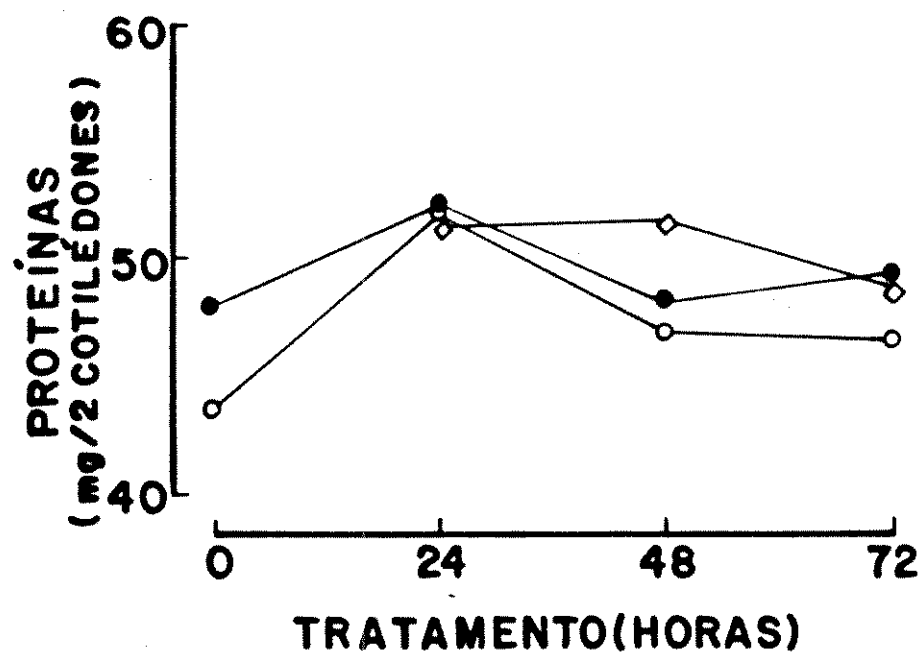
B. Cotilédones

FIGURA 45

A



B



câmara fria e em ambiente natural por 24 meses, tratadas com alta umidade relativa e temperatura elevada por período de 0, 24, 48 e 72 horas e de sementes recém-colhidas também tratadas por 24, 48 e 72 horas. Eixos (FIGURA 46A) de sementes com 24 meses de armazenamento em câmara fria e em ambiente natural apresentaram uma redução inicial até 24 horas de tratamento nos níveis de WSP. A partir de 48 horas de tratamento só eixos de sementes armazenadas em ambiente natural apresentaram redução nesse conteúdo até 72 horas, enquanto eixos de sementes armazenadas em câmara fria praticamente não sofreram alterações. Eixos de sementes recém-colhidas com 24 horas de tratamento apresentaram conteúdo de polissacarídeos solúveis em água semelhantes ao de sementes armazenadas tratadas pelo mesmo tempo, tendo entretanto aumentado esse conteúdo após tratamento de 48 horas e mantido esse nível até 72 horas de tratamento.

Em cotilédones (FIGURA 46B) tanto de sementes armazenadas em câmara fria e em ambiente natural como de sementes recém-colhidas o tratamento com alta temperatura e umidade relativa elevada provocou redução gradativa nos níveis de polissacarídeos até o período de 72 horas de tratamento.

14.2.5. Amido

O conteúdo de amido (FIGURA 47A) de eixos de sementes armazenadas em câmara fria e de sementes recém-colhidas aumentou quando essas sementes foram tratadas com umidade relativa e temperatura elevadas até 72 horas, enquanto eixos de sementes estocadas em ambiente natural apresentaram redução no teor de amido.

FIGURA 46. Conteúdo de polissacarídeos solúveis em água - WSP -
 (mg/semente) em sementes recém-colhidas (N5) e em se-
 mentes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2)
 e em ambiente natural (24AN2), antes e após trata-
 mentos com temperatura e umidade relativa altas.

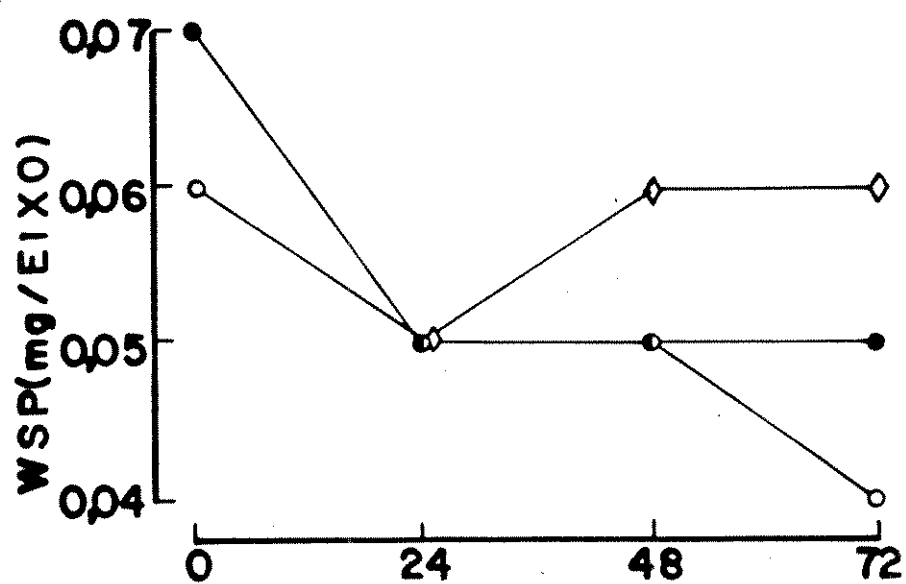
●. 24CF2 ○. 24AN2 ◇. N5

A. Eixos

B. Colíedones

FIGURA 46

A



B

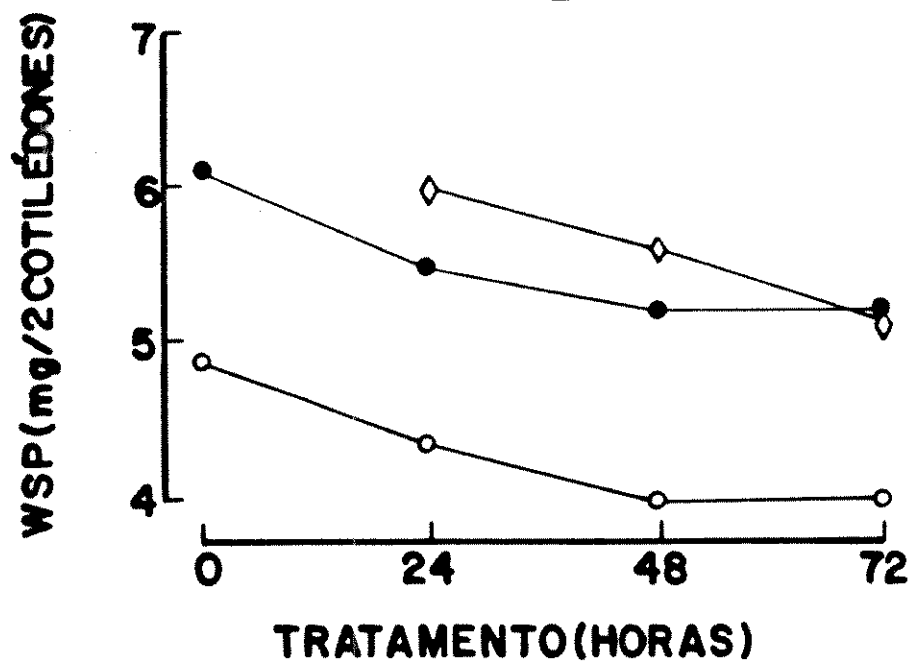


FIGURA 47. Conteúdo de amido (mg/semente) em sementes recém-

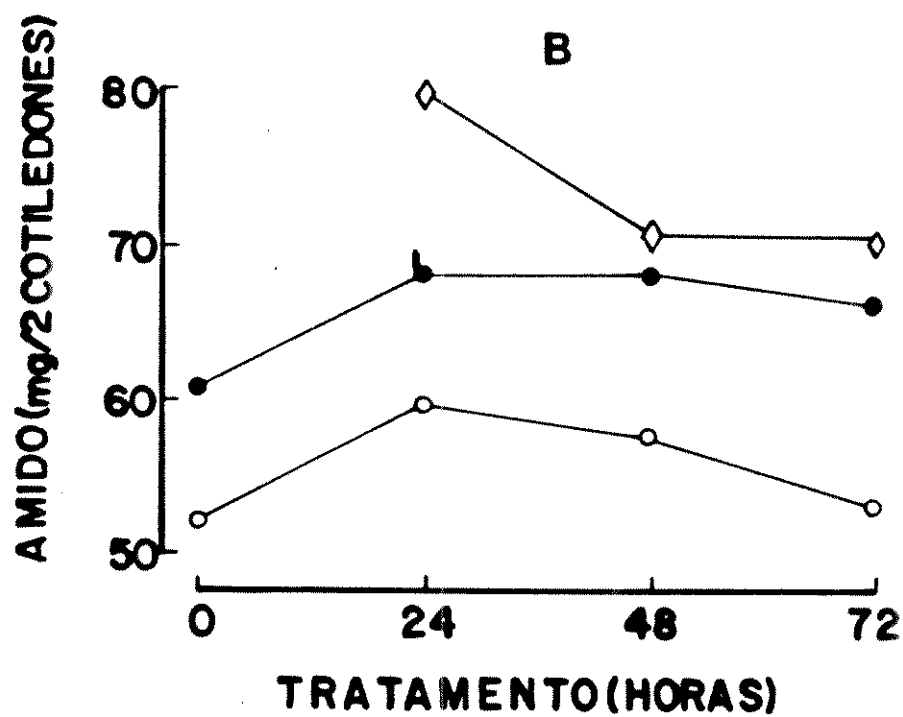
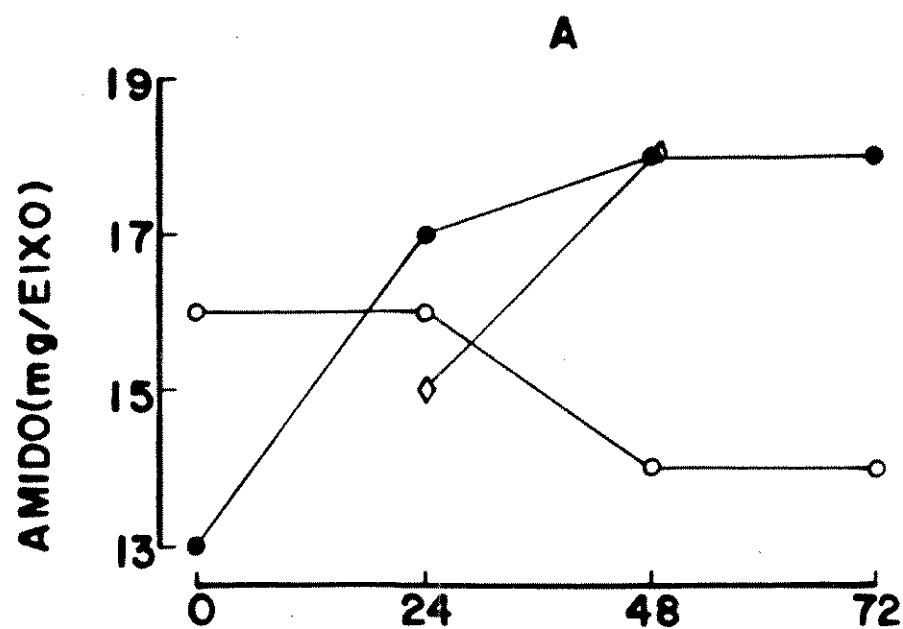
colhidas (NS) e em sementes estocadas por 24 meses em câmara fria (24CF2) e em ambiente natural (24AN2), antes e após tratamentos com temperatura e umidade relativa altas.

● . 24CF2 ○ . 24AN2 ◇ . NS

A. Eixos

B. Cotilédones

FIGURA 47



Em cotilédones (FIGURA 47B) de sementes estocadas em câmara fria e em ambiente natural, o tratamento por 24 horas provocou aumento nos conteúdos de amido, entretanto, quando os tratamentos foram estendidos a 48 e 72 horas houve tendência a uma redução nesses níveis de amido, inclusive em cotilédones de sementes recém-colhidas.

15. Estudos topoquímicos e citoquímicos

15.1. Cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE)

Eixos embrionários corados por este método tiveram suas paredes celulares coradas pela hematoxilina e o conteúdo citoplasmático, com aspecto granular, corado pela hematoxilina e eosina, circundando glóbulos não corados. No material estocado em ambiente natural, o conteúdo eosinófilo apresentou-se mais difuso, à medida que avançou o tempo de armazenamento.

Em cotilédones de sementes recém-colhidas (FIGURA 48) e cotilédones de sementes estocadas em câmara fria por 21 meses, (FIGURA 49), as paredes celulares apresentaram-se íntegras e coradas pela hematoxilina. O conteúdo citoplasmático apresentou uma série de grânulos não corados contendo ao seu redor material hematoxilina e eosina positivos. Delimitando e envolvendo esses grânulos, pôde ser observada a presença de material mais corado pela hematoxilina. No interior dos vasos foi constatada uma resposta positiva aos corantes (FIGURA 49).

O material estocado em ambiente natural por 40 meses (FIGURA 50) teve as mesmas estruturas já citadas evidenciadas por esse método. Entretanto, foram observadas muitas célu-

las com paredes rompidas e material citoplasmático com aspecto mais disperso e desarranjado. Cotilédones de sementes estocadas em ambiente natural por 21 meses (FIGURA 51) apresentaram resultados intermediários entre os apresentados nas FIGURAS 48 e 49 e a FIGURA 50.

15.2. Cortes corados pelo xylidine Ponceau (XP)

Os eixos embrionários corados pelo xylidine Ponceau (FIGURA 52) apresentaram material XP positivo com aspecto globular, envolvendo pequenos grânulos não corados. Nas células do sistema vascular, mais alongadas, não foi detectada a presença de grânulos não corados. As paredes celulares não foram evidenciadas por este método. Foi ainda constatada a presença de núcleos corados pelo XP, principalmente em eixos embrionários de sementes estocadas em câmara fria por 21 meses.

Os cotilédones de sementes estocadas em câmara fria por 21 meses e submetidos à reação com XP apresentaram seu conteúdo protéico corado (FIGURA 53). Uma observação mais detalhada desse conteúdo revelou sua natureza globular, apresentando ainda inúmeros grânulos sem afinidade pelo corante. Esses grânulos, como nos cortes corados pela HE, também se apresentam delimitados por uma região com maior afinidade pelo corante (FIGURA 54).

Para o material estocado em ambiente natural, foi observada uma perda gradativa no padrão de distribuição e uma aparente diminuição no material corado, que atingem o seu máximo nas sementes estocadas por 45 meses (FIGURA 55). O padrão globular

Fig.48-51: Cortes de cotiledones de sementes sem embebição, corados pela hematoxilina-eosina. As paredes celulares são coradas pela hematoxilina e o conteúdo citoplasmático apresenta grânulos não corados e material eosina-positivo. Aumento: 580 X. **Fig.48:** Sementes recém-colhidas. Nota-se o material eosinófilo distribuído ao redor dos grânulos não corados. **Fig.49:** Sementes estocadas em câmara fria durante 21 meses. O padrão de coloração é semelhante ao da figura anterior. Nos feixes vasculares (v), é detectada a presença de material eosina-positivo. **Fig.50:** Sementes estocadas em ambiente natural por 45 meses. O padrão morfológico apresenta-se comparativamente mais desordenado que na Fig. anterior. **Fig.51:** Sementes estocadas em ambiente natural por 21 meses. Pode ser notado um padrão morfológico intermediário com relação às figuras anteriores.

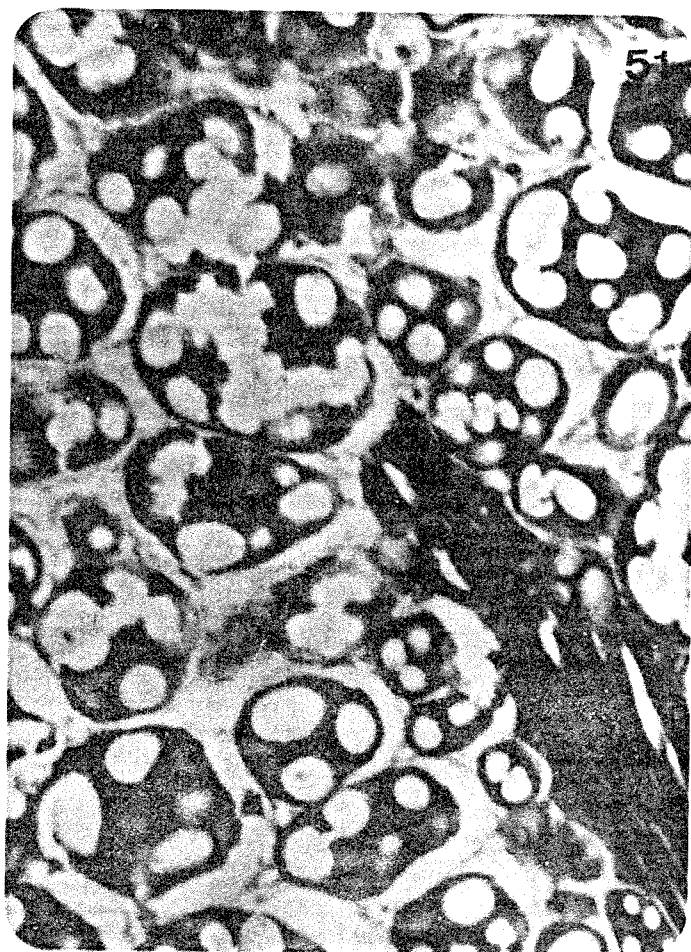
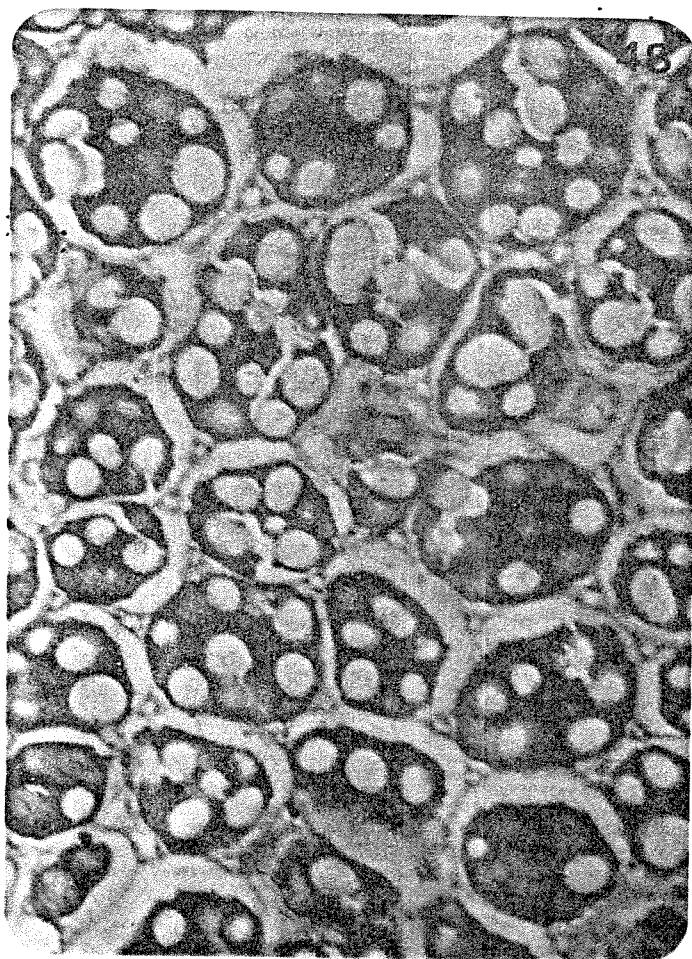


Fig.52: Corte de eixo embrionário de sementes sem embe-
bição estocadas em câmara fria por 21 meses, corado pelo
xylidino Ponceau a pH 2,5. Nota-se o material protéico
corado e com aspecto globular, tanto nas células paren-
quimáticas (P) quanto nas precursoras do sistema vascular
da radícula (V). Podem ainda serem notados alguns núcleos
XP-positivos (▲). Aumento: 740 X



anteriormente observado nos corpos proteicos, também vai sendo perdido à medida que avança o tempo de estocagem em ambiente natural, mas no limite dos grânulos, continua sendo observada uma maior afinidade pelo corante que se torna mais intensa à medida que aumenta o tempo de estocagem em condições naturais (FIGURA 56).

Cortes de cotilédones de sementes embebidas por 24 horas, corados pelo XP apresentaram um padrão mais difuso de coloração em relação ao material não embebido para todos os tratamentos de armazenamento analisados. As alterações observadas devidas a diferentes tempos e condições de estocagem também foram detectadas no material embebido (FIGURA 57 e 58).

15.3. Cortes corados com azul de toluidina (AT)

A coloração de eixos pelo azul de toluidina confirmou o padrão globular do conteúdo citoplasmático, das células do parênquima, obtido pelos métodos anteriores. As paredes celulares apresentaram-se metacromáticas e observou-se ainda a presença de núcleos e nucléolos corados em tom esverdeado (FIGURA 59).

No material estocado em ambiente natural por 45 meses (FIGURA 60), observou-se um aumento de metacromasia nas paredes celulares em relação ao material viável. Estas células apresentaram seu conteúdo citoplasmático mais homogêneo e ortocromático, situado ao redor do núcleo, não ocupando todo o espaço intracelular como no material estocado em câmara fria. Houve aparecimento de regiões com a cromatina mais compactada. Em muitas células pode ser observada a imagem negativa do nucléolo (FIGURA 60).

Fig.53-56: Cortes de cotilédones sem imbebição, corados pelo xylidine Ponceau a pH 2,5. As paredes celulares praticamente não se coram por esse método. Fig.53-54: Sementes estocadas em câmara fria por 20 meses. Fig.53: Vista geral de células cotilédones indicando a natureza proteica do material que circunda os grânulos citoplasmáticos não corados, confirmando o padrão de distribuição obtido nos cortes corados pela HE. Aumento: 580 X. Fig.54: Visão em maior aumento, mostrando a distribuição do material corado e dos grânulos não corados por todo o citoplasma da célula. Aumento: 2310 X. Fig.55-56: Sementes estocadas em ambiente natural por 45 meses. Fig.55: Vista geral de células cotilédones revelando um desarranjo do material corado, com aparente diminuição do mesmo. Aumento: 580 X. Fig.56: Detalhe mostrando o padrão mais difuso e desordenado do material proteico corado. Aumento: 2310X

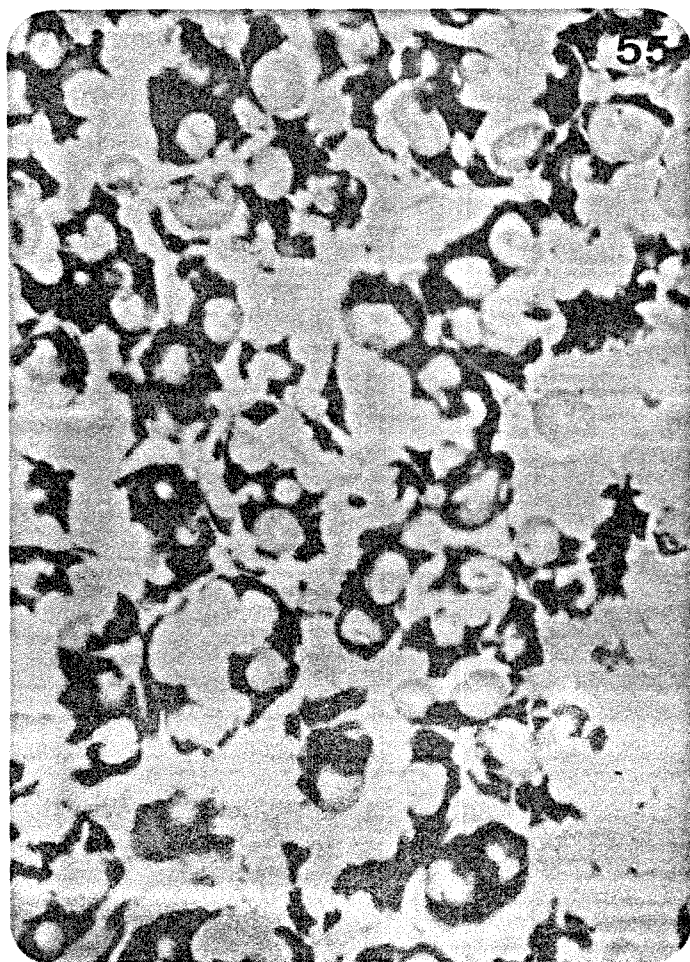
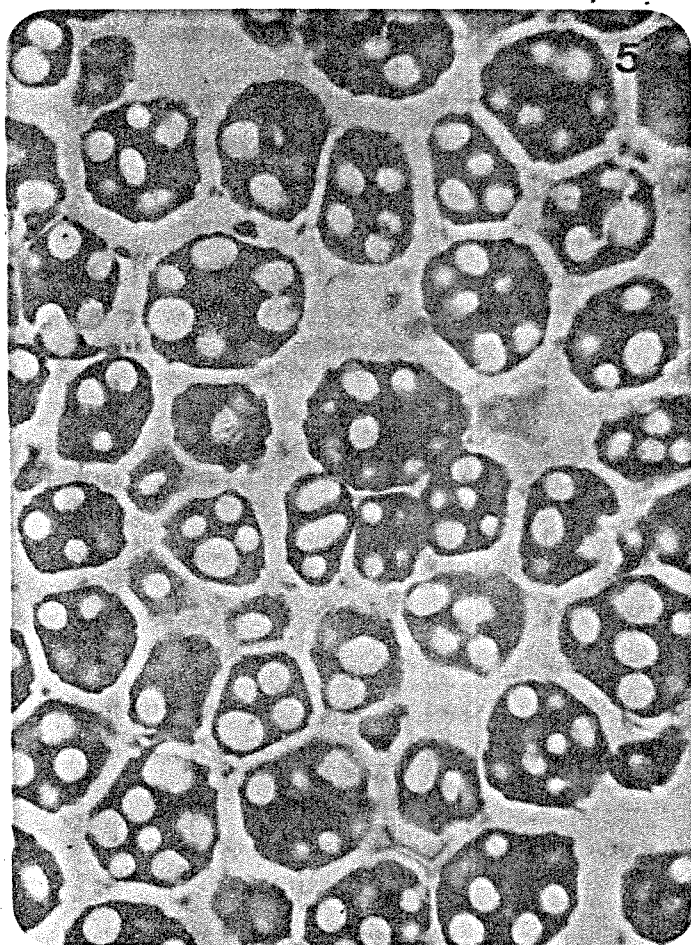
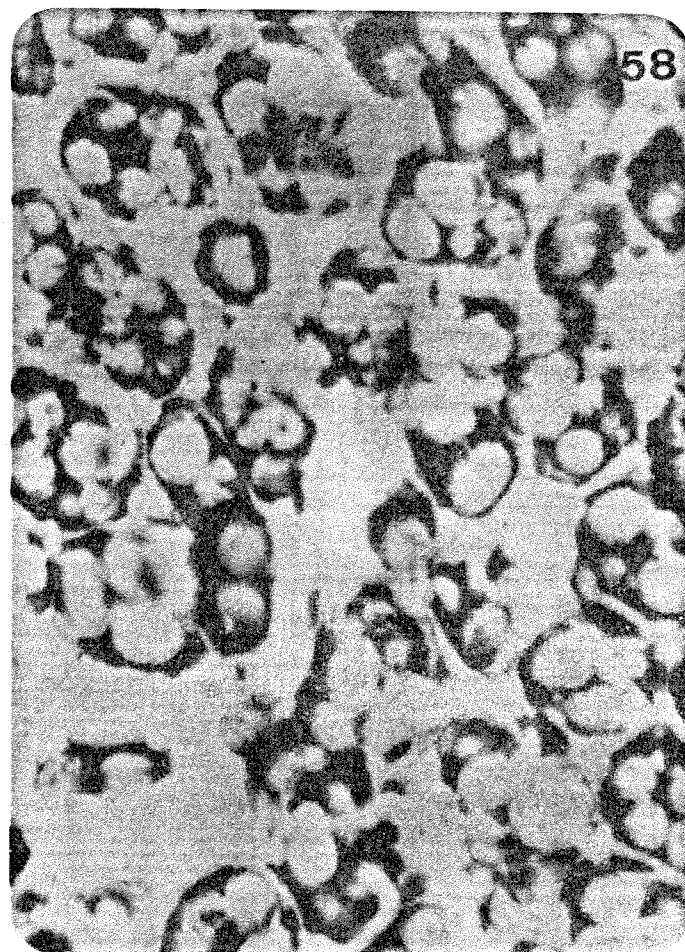


Fig.57-58: Cortes de cotilédones embebidos por 24 horas e corados pelo xylidine Ponceau a pH 2,5. Nota-se que a embebição acarreta uma maior dispersão do material protéico corado quando comparado ao material não embebido (Fig.53 e 55). Entretanto, o padrão morfológico mais ordenado para o material procedente de sementes estocadas em câmara fria por 21 meses (Fig.57) continua mais acentuado quando comparado ao material procedente de sementes estocadas em ambiente natural por 45 meses que novamente sugerem uma diminuição do conteúdo protéico corado (Fig.58). Aumento: 580 X.



Nos cotilédones as paredes celulares também apresentaram-se metacromáticas e o conteúdo protéico mostrou-se ortocromático (FIGURA 61 e 62). As diferenças morfológicas encontradas entre sementes armazenadas em câmara fria por 21 meses e sementes armazenadas em ambiente natural por 45 meses nos cortes corados por HE e XP foram confirmadas nos cortes corados pelo AI. Os limites mais corados dos grânulos existentes, foram mais evidenciados por este método, principalmente para o material estocado em ambiente natural por 45 meses (FIGURA 62). A utilização desse método tornou evidente o padrão globular do material protéico XP - positivo (FIGURA 63).

15.4. *Microscopia de polarização*

A visualização dos cortes em microscópio de polarização, com polarizador e analisador cruzados (90°C) revelou a birrefringência das paredes celulares e dos grãos de amido bastante numerosos e com forma característica em cruz de malta (FIGURA 64 e 65). Nos eixos observou-se uma maior concentração de amido na região do córtex. Essa quantidade diminui consideravelmente nas células próximas à epiderme (FIGURA 64). Em cotilédones os grãos de amido apresentaram-se maiores em relação aos existentes em eixos (FIGURA 65). Com a perda de viabilidade das sementes estocadas em ambiente natural por 45 meses, nota-se uma aparente redução dos grãos de amido presentes ao nível das células cotiledonares (FIGURA 66).

Fig.59-60: Cortes de eixos embrionários de sementes sem embebição, corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. Podem ser notadas as paredes celulares coradas e apresentando-se metacromáticas. Aumento: 1850X. Fig.59: Eixos Embrionários de sementes estocadas em câmara fria por 21 meses. Os limites do material proteico corado pelo XP apresentam-se na cor verde-azulada, salientando um formato globular. São também evidenciados núcleos e nucleolos (▲) corados com o mesmo padrão dos glóbulos. Fig.60: Eixos Embrionários de sementes estocadas em ambiente natural por 40 meses. Nota-se um aumento da metacromasia ao nível das paredes celulares e um aumento na ortocromasia do material citoplasmático. Vários núcleos apresentam-se com regiões cromatinicas mais compactadas (▲) e em muitos casos é notada a ausência de nucléolo (↑).

Fig.61-62: Cortes de cotiledões sem embebição corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. Notam-se evidenciadas as paredes celulares que apresentam metacromasia e o material proteico corado ortocromaticamente. Aumento: 580 X. Fig.61: Sementes estocadas em câmara fria por 21 meses. Este método confirma os padrões morfológicos do material citoplasmático, corado ortocromaticamente e distribuído ao redor dos grânulos não corados. As paredes celulares apresentam-se íntegras e metacromáticas. Fig.62: Sementes estocadas em ambiente natural por 45 meses. Nota-se um grande desarranjo do material citoplasmático e as paredes celulares rompidas.

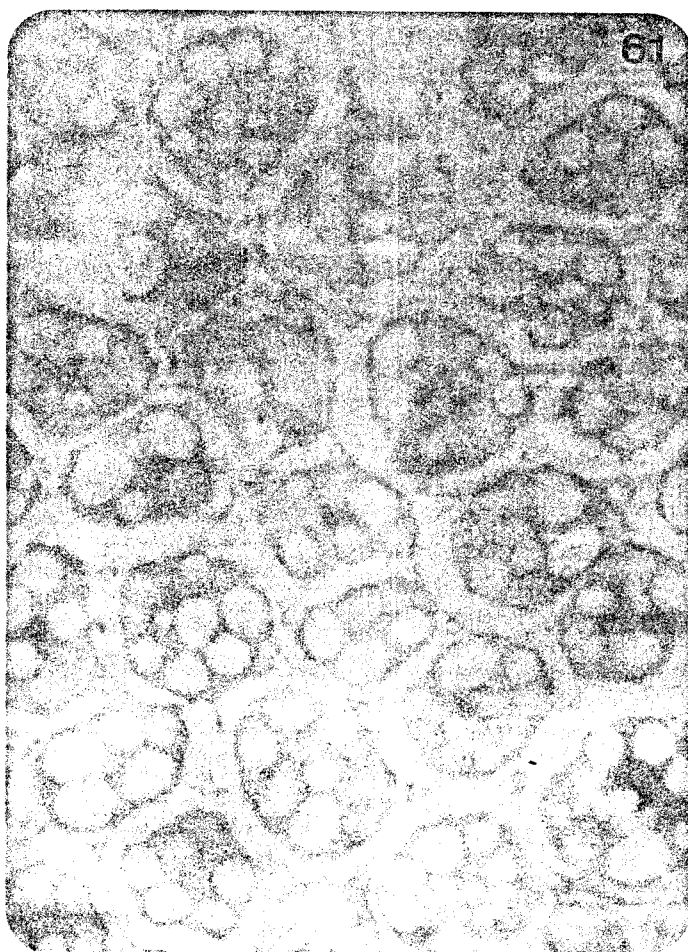
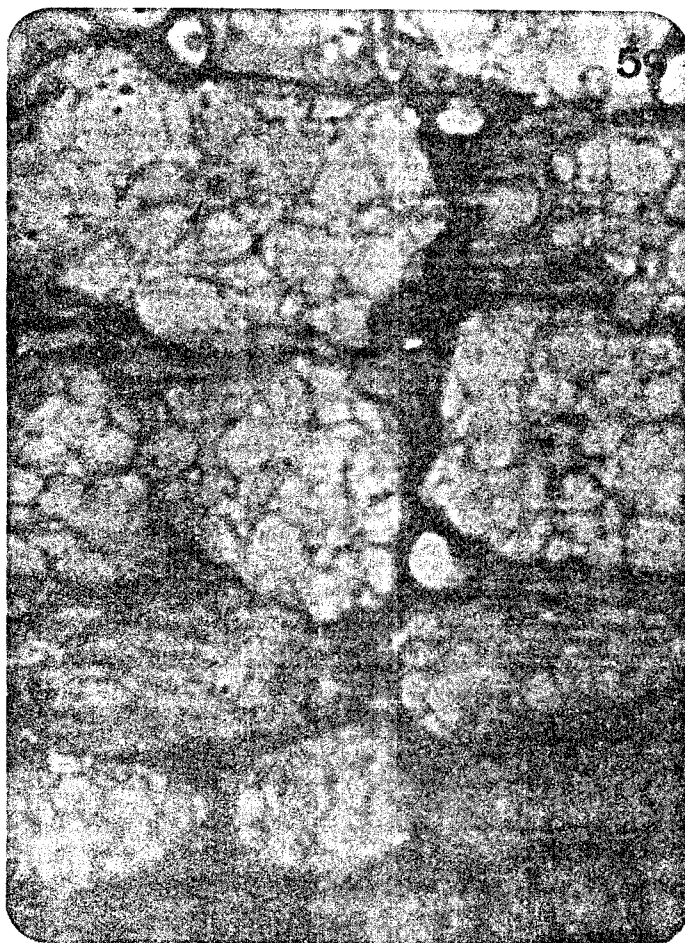


Fig.63: Corte de cotiledone sem embebição de semente estocada em câmara fria por 21 meses, corado pelo azul de toluidina a pH 4,0 e observado em maior aumento. No interior do citoplasma pode ser notada a coloração dos envoltórios do material proteico corado pelo Xyline Ponceau, confirmando seu formato globular (▲). Nota-se ainda a coloração mais acentuada dos envoltórios dos glóbulos não corados. Aumento: 1850 X.



Fig. 64: Corte de eixo embrionário de semente estocada em câmara fria por 21 meses, submetido a análise em microscópio de polarização com polarizador e analisador cruzados. Nota-se a birrefringência das paredes celulares e dos grãos de amido concentrados na região do córtex. No interior dos vasos não são detectados grãos de amido e próximo à epiderme, a quantidade desses grãos é consideravelmente menor. Aumento: 380 X.

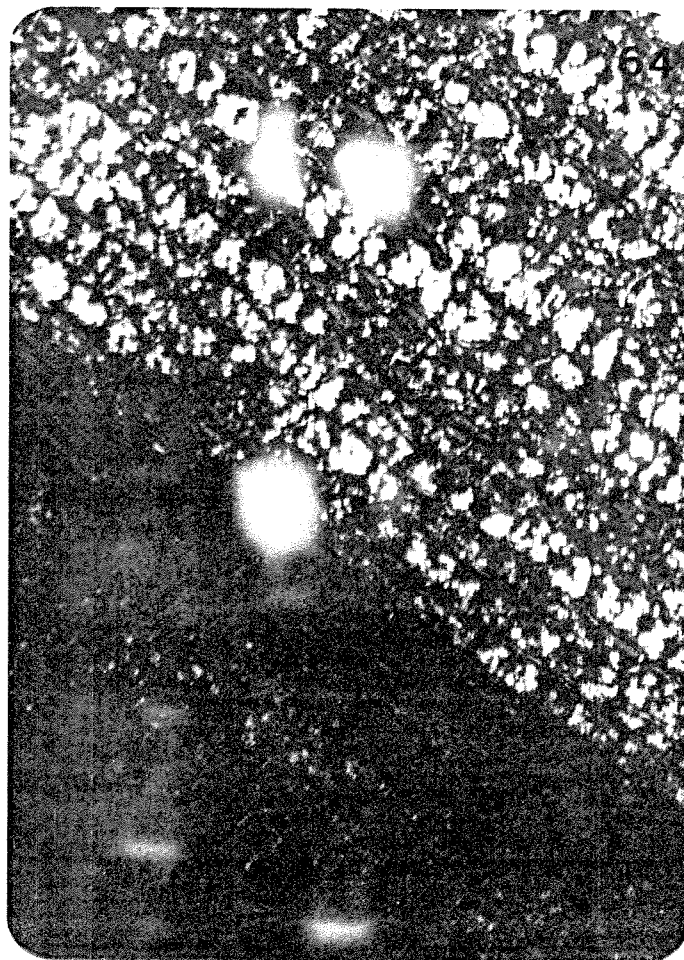
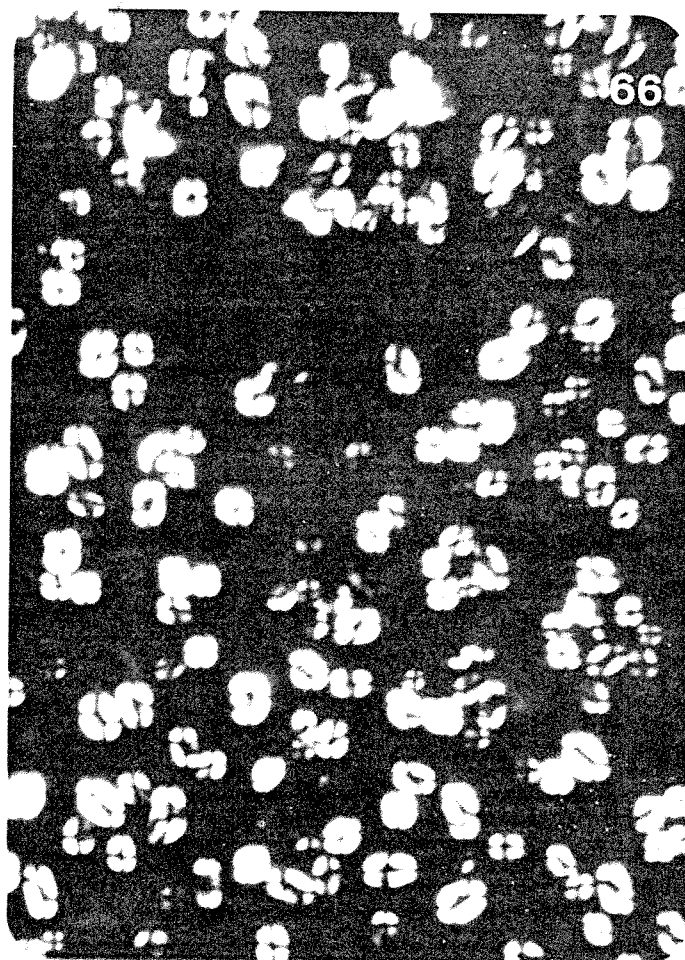
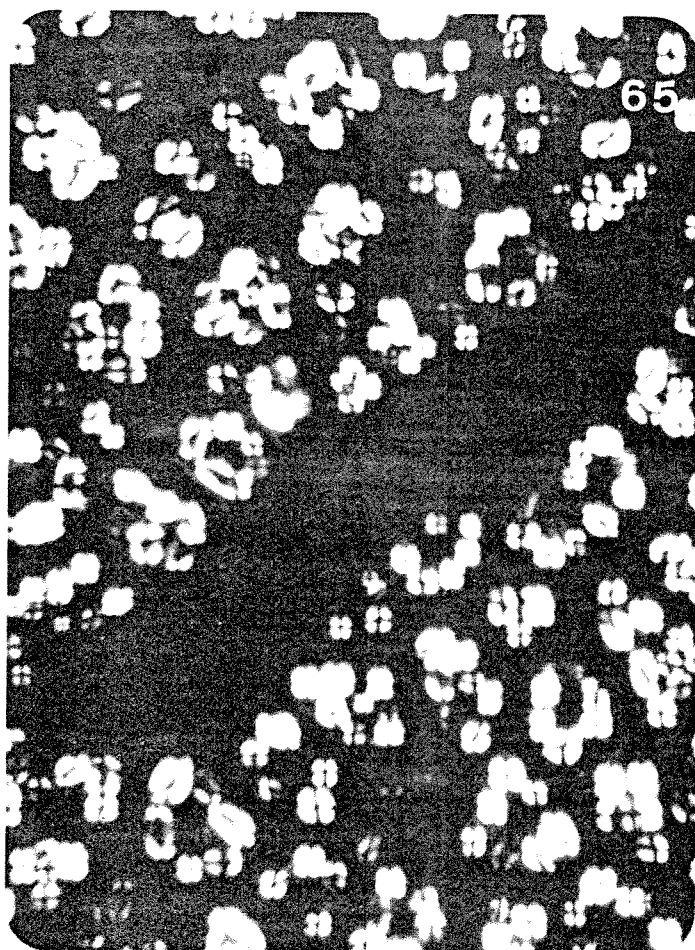


Fig.65-66: Cortes submetidos a análise em microscópio de polarização com polarizador e analisador cruzados. Aumento: 380 X. Fig.65: Corte de cotilédono de semente estocada em câmara fria por 21 meses. Nota-se a birrefringência das paredes celulares e dos grãos não corados pelos métodos utilizados, que se apresentam na forma de cruz-de-malta, significando assim tratar-se de grãos de amido. Fig.66: Corte de cotilédono de semente estocada em ambiente natural, mostrando a grande quantidade de grãos de amido também nesses materiais.



DISCUSSÃO

A semente de *Phaseolus vulgaris* apresenta dois cotilédones onde se encontra grande parte das reservas que vão ser utilizadas pelo eixo embrionário como fonte de energia e substâncias orgânicas para o crescimento. A semente de feijão é classificada como semente "exalbuminosa" por apresentar cotilédones bastante volumosos e por não ter endosperma (POPINIGIS, 1977) e como ortodoxa, pela faculdade de ser armazenada por longos períodos com baixo teor de umidade (ROBERTS, 1973).

As sementes podem apresentar respostas à luz na germinação, dependendo dentre outros fatores, das condições e tempo de armazenamento (MAYER & POLJAKOFF-MAYER, 1982). Nos testes iniciais de germinação não foram constatadas diferenças que pudessem ser atribuídas aos efeitos de luz na germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris*. Contudo, durante o período de armazenamento, foram conduzidos estudos com luz de diferentes comprimentos de onda para verificar se havia alguma associação do envelhecimento com a sensibilidade à luz, sendo que nos comprimentos testados praticamente não houve respostas significativas. A não exigência de efeito da luz na germinação caracteriza a semente de *Phaseolus vulgaris* como fotoblasticamente neutra ou não fotoblástica, de acordo com SMITH (1975).

A temperatura ótima para que uma semente germine é aquela que possibilita que ocorra maior número de sementes germinadas num espaço de tempo mínimo (SALGADO-LABORIAU, 1973). Foram testadas várias temperaturas, inclusive temperaturas alternadas. As maiores porcentagens de germinação em mais curto espaço de tempo foram verificadas em temperaturas entre 20 e 30°C, independente de serem ou não alternadas, sendo que a melhor temperatura verificada foi a de 25°C. Geralmente os limites ótimos de temperatura de germinação para sementes não dormentes oscilam entre 15 e 30°C (HENDRICKS & TAYLORSON, 1976). Isto se justifica pelo fato de que a temperatura tanto influencia a velocidade do processo de absorção de água como a velocidade das reações bioquímicas.

Em todos os lotes de sementes foram verificados altos níveis de vigor e germinação, cerca de 96 a 100 %, quando estas sementes estavam recém-colhidas. Entretanto, com o armazenamento houve redução significativa tanto no vigor como na germinação. As diferenças maiores foram observadas nas sementes armazenadas em ambiente natural, principalmente nas sementes do lote 1 que foram estocadas inicialmente nas condições de Alegre-ES, onde as oscilações de temperatura são bastante acentuadas e a umidade relativa muito elevada. Mesmo em sementes do lote 2 estocadas em ambiente natural nas condições de Campinas-Sp, onde as condições de temperatura e umidade relativa são menos drásticas às sementes, houve redução no vigor e na germinação das sementes com o tempo

de estocagem. A condição de câmara fria, ao contrário, manteve a semente com alto potencial de germinação e vigor durante toda a condução deste trabalho. Como todos os lotes de sementes apresentavam características genéticas semelhantes, pode-se deduzir que a redução ou perda de vigor e germinação nas sementes durante o período de armazenamento seja atribuída à condição do ambiente de estocagem.

O período de viabilidade da semente é dependente da temperatura, teor de umidade e pressão de oxigênio durante o armazenamento. Em sementes ortodoxas, como é o caso de *Phaseolus vulgaris*, uma redução em qualquer um destes fatores redonda em aumento de sua viabilidade durante o período em que ficarem armazenadas (ROBERTS, 1973). Segundo HARRINGTON (1972) a longevidade da semente pode chegar a ser máxima, desde que sejam mantidas em ambientes com umidade relativa entre 20 e 25 %.

A necessidade de baixo teor de umidade nas sementes para melhor preservação de sua viabilidade durante o período de armazenamento tem sido questionada por muitos autores, devendo este parâmetro, entretanto, ser analisado sempre associado à temperatura de armazenagem e embalagem de acondicionamento (SITTISKOUNG, 1970; HARRINGTON, 1972; DELOUCHE, 1973; 1975; LOPES, 1980; 1983).

O suprimento de água e o aumento de temperatura aceleram as atividades metabólicas nas sementes determinando sua germinação, quando colocadas em substrato apropriado para germinação. Se a semente é mantida sob condições que acelerem seu meta-

bolismo, condições de alta umidade relativa ou de alta temperatura, e não consegue germinar por falta de substrato apropriado, ocorre aumento na taxa de deterioração (CHING, 1972; FERRY, 1978; BEWLEY & BLACK, 1982).

Em sementes tratadas com temperatura e umidade relativa altas foi verificada uma alta porcentagem de deterioração. Entretanto, foi observado que os tratamentos durante 24 e 48 horas, não foram suficientes para inibir a germinação e tão pouco determinar redução no vigor das sementes, o que somente foi verificado com exposição das sementes a estas condições por 72 horas; este tratamento foi considerado como envelhecimento precoce ou envelhecimento acelerado das sementes (DELOUCHE *et alii*, 1968; MAEDA *et alii*, 1982).

Sementes mantidas em condições de temperatura e umidade relativa altas apresentam alto grau de deterioração, culminando com a perda total do vigor e germinação em decorrência das alterações fisiológicas e bioquímicas que se processam em seu interior (KOOSTRA & HARRINGTON, 1969; EDJE & BURRIS, 1970).

Tanto o tempo de armazenamento como tratamento pela técnica do envelhecimento precoce por 72 horas em sementes armazenadas ou recém-colhidas, determinaram redução na capacidade germinativa detectada principalmente pela baixa porcentagem de germinação, redução no comprimento de radícula, baixo índice de velocidade de emergência, alta porcentagem de plântulas anormais e de sementes deterioradas, confirmando assim as observações de

vários autores (CHING & SCHOOLCRAFT, 1968; SITTISROUNG, 1970; SARTORI, 1971; PERRY, 1978).

BYRD & DELOUCHE (1971) trabalhando com armazenamento de soja, observaram que o tratamento com temperatura e umidade relativa altas era um dos melhores testes para avaliar o grau de deterioração das sementes.

O armazenamento da semente determinou redução no vigor e na sua capacidade de germinação ~~sementes~~ ao longo do período de estocagem, tendo sido verificado, no entanto, que a condição de baixa temperatura e umidade relativa foi a que melhor manteve a viabilidade das sementes por períodos mais longos do que a condição de ambiente natural. Observou-se que o tempo de armazenamento associado às oscilações de temperatura e umidade relativa elevada afetam sensivelmente o vigor e a germinação, sendo que o vigor apresentou redução mais rápida. Estes resultados são consistentes com os de DELOUCHE (1975).

As sementes armazenadas em câmara fria apresentaram redução na sua viabilidade bem depois daquelas estocadas em ambiente natural. Isto se justifica devido a condição de ambiente natural apresentar temperatura bastante elevada em relação àquela de câmara fria e também pelo fato de ocorrer grandes oscilações tanto na temperatura como na umidade relativa nesse ambiente. As sementes, para melhor conservação, devem ser preservadas em ambientes frescos e secos, sendo que a temperatura e a umidade relativa adequadas são características de cada espécie (DELOUCHE &

POTTS, 1974). MAYER & POLJAKOFF-MAYBER (1982) também afirmam que a semente é bem conservada em ambiente que reduz a atividade metabólica, ambiente com baixa temperatura e alta concentração de CO_2 .

As análises de germinação e dos testes de vigor conduzidos, como análise de primeira contagem de protrusão de radícula após 1 dia, primeira contagem de germinação após 5 dias, comprimento de radícula após 4 dias, conteúdo de matéria seca após 8 e após 14 dias, absorção de O_2 , e tratamento com alta temperatura e umidade relativa, evidenciaram a redução da viabilidade das sementes, principalmente das sementes estocadas em ambiente natural tanto do lote 1 como do lote 2, caracterizando o início provável de sua deterioração. Estes resultados corroboram os de vários autores (THRONEBERRY & SMITH, 1955; WOODSTOCK & GRABE, 1967; CHING *et alii*, 1969; ANDERSON, 1970a; SITTISROUNG, 1970; SARTORI, 1971; ROBERTS, 1972; DELOUCHE, 1975; HARTMANN & KESTER, 1975; PERRY, 1978; LOPES, 1980; OLIVEIRA, 1981). Um outro teste comumente utilizado para estimar a viabilidade de sementes é o teste de tetrazólio (ISELY, 1952; KITTOCK & LAW, 1968; MOORE, 1969).

Neste trabalho o sal utilizado foi o cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio. O agrupamento das sementes em classes foi feito em função do grau de coloração que elas apresentaram em resposta ao teste. Assim a classe 1, que representa a classe de sementes de coloração mais uniforme e intensa registrou maior número de sementes recém-colhidas e de sementes armazenadas em câ-

mara fria, seguidas de sementes estocadas em ambiente natural. A coloração vermelha representa os tecidos vivos tanto em eixos embrionários como em cotilédones, tendo em vista que as enzimas desidrogenases estão envolvidas na atividade respiratória dos sistemas biológicos e durante o processo respiratório a solução de tetrazólio atua como um receptor de hidrogênio das desidrogenases, reduzindo o tetrazólio a um "formazan" insolúvel e colorido de vermelho. KITTOCK & LAW (1968) afirmam que há uma correlação significativa entre redução na cor, respiração e vigor de plântulas.

A classe 4, onde foram agrupadas sementes sem coloração e consideradas inviáveis, foi a classe que agrupou principalmente as sementes do lote mais velho, estocadas em ambiente natural, tendo em vista que estas sementes já se apresentavam inviáveis e com alto grau de deterioração. POWELL & MATTHEWS (1981) afirmam que as células que se apresentam sem coloração durante a aplicação do teste de tetrazólio não estão totalmente sem atividade.

As sementes armazenadas em ambiente natural apresentaram maior redução no vigor e na germinação do que as sementes estocadas em câmara fria, sendo que as sementes do lote 1 não apresentaram germinação. A perda de viabilidade destas sementes é atribuída principalmente às condições adversas em que foram mantidas antes do início deste experimento, por 24 meses em ambiente natural de Alegre-ES, onde as oscilações de temperatura e de umidade relativa são muito grandes.

Muitos autores têm estabelecido que o nível de umidade da semente é um dos fatores de maior importância para sua longevidade e que a sua oscilação está diretamente relacionada com a umidade relativa do ambiente em que são preservadas (BARTON, 1941; HARRINGTON, 1972; DELOUCHE, 1973; 1975).

Durante o período em que as sementes permanecem acondicionadas em ambientes propensos a oscilações na temperatura e umidade relativa, algumas mudanças ocorrem em suas estruturas e, particularmente na condução do experimento, verificaram-se oscilações no conteúdo de umidade das sementes, sendo que nas sementes estocadas em ambiente natural estas oscilações foram mais acentuadas do que nas sementes estocadas em câmara fria. Estas oscilações são atribuídas ao fato das sementes serem higroscópicas, o que permite que elas absorvam ou percam umidade para o ambiente em que se encontram, em função da umidade relativa desse ambiente, até que entrem em equilíbrio com o seu nível de umidade. Resultados semelhantes foram encontrados por PARICHA *et alii* (1977); SARTORI & MIORIN (1979); LOPES (1980); OLIVEIRA (1981). Segundo DELOUCHE (1973), o conteúdo de umidade da semente sofre oscilações de acordo com as oscilações apresentadas nos níveis de umidade relativa do ar. Toda semente apresenta um certo teor de umidade que é dado em relação ao seu peso úmido e que varia com o tipo de semente e em função do tipo de reserva armazenada nos seus tecidos (BARTON, 1941).

Sementes de *Phaseolus vulgaris* quando colocadas em contacto com água embebem de maneira relativamente rápida. O tegumento destas sementes praticamente não exerce barreira à entrada de água. Contudo, a velocidade de embebição apresentou-se dependente da condição fisiológica da semente. Destarte, em sementes mais velhas principalmente foi verificada uma entrada de água mais rápida do que em sementes mais novas, culminando posteriormente com uma redução progressiva e paulatina no peso de matéria fresca, sugerindo que o tegumento tenha exercido menor barreira à entrada de água e saída de solutos.

Sementes velhas, que não apresentavam capacidade de germinação e que foram consideradas sementes inviáveis, apresentaram o tegumento mais ressecado e quebradiço. Nessas sementes foi constatada uma liberação muito alta de aminoácidos e carboidratos solúveis na água de lavagem das sementes em relação às sementes que se apresentavam viáveis, principalmente as armazenadas em câmara fria, cuja liberação de eletrólitos foi menor, caracterizando uma relação inversa entre viabilidade e efluxo de eletrólitos. Estes resultados também são consistentes com os encontrados por SIMON (1974) e ABDEL SAMAD & FEARSE (1978). WILSON & McDONALD (1986), afirmam que no conteúdo de solutos liberados pela semente e embriões estão presentes substâncias características do citoplasma como aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos, fenóis, fosfatos e ácido giberélico. DUKE & KAKEFUDA (1981) encontraram na água de lavagem das sementes de feijão, além de outros solu-

tos, cerca de 6 % de enzimas. Segundo SIMON (1978), sementes secas apresentam as membranas desorganizadas, no estado não lamelar, o que favorece a entrada de água com maior facilidade e liberação de solutos. Há ainda a possibilidade da dupla camada de membrana tornar-se rearranjada numa fase hexagonal de característica amplamente hidrofóbica, entretanto perfurada por longos canais contendo água e enfileirados pelas cabeças polares dos fosfolipídios (SIMON, 1984; BEWLEY & BLACK, 1985).

Uma outra possibilidade para explicar o grande efluxo de solutos das sementes é o fato desses solutos apresentarem um baixo peso molecular. As características que facilitam os açúcares se difundirem dentro e fora da semente durante a embebição, além da permeabilidade das membranas, é a sua solubilidade em água e o baixo peso molecular (ABDUL-BAKI, 1969).

A maioria dos eventos metabólicos ocorre de maneira bastante diferenciada entre diferentes espécies de sementes em função da estrutura morfológica, natureza química de suas reservas, maturidade fisiológica e condições de germinação.

O aumento de matéria fresca e seca de plântulas durante a fase inicial de crescimento é determinado predominantemente pelos tecidos de reservas. Nesta fase de crescimento até o 14^o dia verificou-se maior redução no peso de matéria seca dos cotilédones e aumento no eixo embrionário, caracterizando a mobilização de reservas dos cotilédones para o eixo. O aumento desse peso nas plântulas tratadas com solução de Hoagland e a manutenção do peso

dos cotilédones a partir do 14^o dia caracterizam a fase em que a plântula passa ao estadio de planta, isto é; fase em que ela passa a consumir nutrientes do substrato e não dos cotilédones.

O processo de germinação nas sementes inicia-se com uma rápida absorção de água, determinando a embebição dos seus tecidos, o que consequentemente facilitará a hidrólise e mobilização do material de reserva e sua utilização no processo de crescimento do eixo embrionário (INGLE *et alii*, 1964).

Em *Phaseolus vulgaris*, a degradação das reservas tem início numa determinada região a partir da qual vão se difundindo para outras regiões dos cotilédones. O início se dá na região central do cotilédono e se expande para a periferia sem no entanto atingir as regiões em torno dos feixes vasculares (BEWLEY & BLACK, 1982).

Nos estádios iniciais da germinação ocorre uma série de alterações metabólicas resultante da ativação de várias enzimas.

Sementes mesmo com reidratação incipiente já apresentam elevada atividade metabólica porque durante a embebição a água é primeiramente absorvida pelas organelas das células metabolicamente ativas, pelo citosol e pelas membranas das organelas de armazenamento, ou seja, das partículas protéicas, dos pró-plastídeos e dos esferossomos, considerando que os grânulos de amido, a maioria das reservas de proteínas e os lipídios são insolúveis em água (CHING, 1972).

Em sementes viáveis, nos testes de germinação até 120 horas, verificou-se uma redução no peso dos cotilédones e aumento de peso dos eixos embrionários, a que se atribuiu a utilização das reservas cotiledonares.

A análise das reservas protéicas durante a embebição e germinação revelou redução nos cotilédones e aumento nos eixos embrionários, caracterizando que durante a germinação há hidrólise das proteínas, as quais são catalizadas por proteases, enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas. Durante o processo de germinação tem sido observado que a atividade proteolítica aumenta (YOMO & SRINIVASEN, 1973).

A redução do conteúdo de proteínas nos cotilédones durante a germinação coincide com o aumento de proteínas no eixo embrionário e de aminoácidos em cotilédones e eixo embrionário, sugerindo que durante a germinação esteja ocorrendo hidrólise das proteínas de reservas e nova síntese de proteínas no eixo embrionário. Ademais, a degradação das proteínas resulta em liberação de aminoácidos que são transportados para os pontos de crescimento, onde serão reutilizados para a formação de novas proteínas ou oxidados para a liberação de energia (INGLE, 1964; POPINIGIS, 1976; MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982).

No caso de sementes armazenadas, a redução observada no conteúdo de proteínas, como indicam os dados, sugere que as proteases encontram-se ativas em sementes armazenadas e esta atividade parece estar associada com o envelhecimento e deterioração

determinados pelas oscilações nos níveis de umidade e da temperatura de armazenamento. A atividade de proteases pode estar associada com o envelhecimento na degradação estrutural vital e proteínas solúveis de membranas organelares; nucleoproteínas; ribossomos e enzimas (CHING & SCHOOLCRAFT, 1968).

O aumento nos teores de aminoácidos verificado durante a embebição das sementes pode ser atribuído à quebra de proteínas, principalmente por ter ocorrido maior aumento em sementes de maior vigor. Esta afirmação toma maior consistência quando se comparam esses teores com os teores encontrados em sementes mais velhas e inviáveis, onde houve redução nesse conteúdo durante a germinação. Essa redução possivelmente está associada à perda de aminoácidos através das membranas durante a embebição.

Durante a germinação, quanto maior o vigor da semente, como é o caso das sementes do lote 2 armazenadas em câmara fria, maior é a hidrólise de proteínas, havendo assim maior liberação de aminoácidos. Já em sementes do mesmo lote armazenadas em ambiente natural e que apresentavam redução paulatina no vigor, esse parâmetro praticamente não foi alterado durante a germinação, caracterizando assim que estava ocorrendo uma baixa atividade enzimática com o envelhecimento da semente. Resultados semelhantes foram encontrados por CHING & SCHOOLCRAFT (1968) e GIDROL (1988).

Durante o armazenamento, o aumento no conteúdo de aminoácidos verificado em cotilédones de sementes estocas em ambien-

te natural, provavelmente seja decorrente da hidrólise de proteínas. Esse aumento de aminoácidos nos cotilédones durante a estocagem coincide com a redução no conteúdo de proteínas.

A redução verificada no conteúdo de proteínas pode ser devida à atividade de enzimas hidrolíticas antes da germinação tendo em vista que embora as proteínas de reserva sejam os principais constituintes dos corpos protéicos, proteínas enzimáticas como a fosfatase, RNase, alfa e beta glucosidase, alfa amilase e protease foram detectadas nos corpos protéicos. Entretanto, não se tem ainda conhecimento se essas enzimas são ativas antes da germinação (LARKINS, 1981; MURRAY, 1984). PENNER & ASHTON (1967) e YOMO & VARNER (1973) detectaram a atividade de endopeptidases tanto em sementes secas como em sementes germinadas. Durante a embebição por 24 horas e na germinação estudada até 120 horas verificou-se maior acúmulo de proteínas nos eixos embrionários e redução nos cotilédones. Possivelmente esse fato tenha sido decorrente do aumento da atividade proteolítica. Resultados semelhantes foram encontrados por YOMO & SRINIVASEN (1973).

Os conteúdos de açúcares solúveis e de amido durante a germinação apresentaram um comportamento similar aos conteúdos de proteínas, isto é, redução nos cotilédones e aumento no eixo embrionário. Isto evidencia que durante a germinação há a degradação dos componentes dos tecidos de reserva como polissacarídeos e lipídios, pela atividade enzimática e fluxo dos componentes solúveis para as regiões de crescimento.

A redução no conteúdo de amido nos cotilédones e eixos durante a embebição e a germinação justifica-se pela presença de enzimas hidrolíticas nos cotilédones, as quais participam no processo de degradação do amido. A degradação do amido é catalisada pelas enzimas alfa e beta amilase, amido fosforilase, alfa glucosidase e enzimas desramificadoras (OKITA *et alii*, 1979).

Embora o conteúdo de amido não tenha sido grandemente afetado pelas condições de armazenamento, em eixos embrionários de sementes mais velhas foi detectado um teor mais reduzido quando comparado com o de sementes estocadas em câmara fria, evidenciando uma possível hidrólise do amido pelo processo enzimático. A principal enzima envolvida na hidrólise inicial do amido é a alfa amilase (SWAIN & DEKKER, 1966a; 1966b; JULIANO & VARNER, 1969; CHANG, 1982).

A armazenagem por períodos mais longos, como o caso das sementes do lote 1, cujo vigor e capacidade de germinação tornaram-se nulos, parece determinar uma inativação nas enzimas, tendo-se em vista principalmente que nessas sementes praticamente não houve grandes alterações no conteúdo de amido.

O aumento do conteúdo de açúcares solúveis em eixos e redução nos cotilédones estão consistentes com a translocação dos açúcares dos cotilédones para o eixo embrionário, durante o processo de germinação e desenvolvimento.

Durante o armazenamento, as reduções nos níveis de açúcares solúveis detectadas em cotilédones de sementes dos lotes 1

e 2 estocadas em ambiente natural foram maiores do que em sementes estocadas em câmara fria. Esses resultados assumem que a solubilização de carboidratos foi afetada pela temperatura e umidade relativa durante o armazenamento e indicam que quanto maior o vigor das sementes, menor é a redução nos níveis de açúcares solúveis. Resultados semelhantes foram encontrados por CHING & SCHOOLCRAFT (1968). BURRIS *et alii* (1969) também detectaram redução nos níveis de açúcares solúveis quando as sementes foram tratadas com a técnica do envelhecimento precoce.

No caso do aumento do nível de amido no eixo embrionário, pode-se atribuir esse fenômeno ao fato de estar havendo nova síntese durante o processo de germinação e crescimento. Há evidências de que o amido é sintetizado e acumulado nos amiloplastos e que a sacarose é considerada como o maior substrato para biossíntese do amido (MERCIER, 1985).

Um outro fator que confirma as hipóteses anteriores é que quando se comparam os resultados obtidos para as sementes viáveis e de alto vigor, com os resultados obtidos em sementes de baixo potencial de germinação e armazenadas em ambiente natural, observa-se que houve menor concentração destas substâncias no eixo embrionário e que as reduções nos cotilédones foram menores, caracterizando baixa atividade metabólica. Estes resultados tomam maior consistência quando comparados com os resultados de germinação e vigor que se apresentaram reduzidos para sementes estocadas em ambiente natural, em relação a sementes estocadas em câma-

ra fria.

Com relação aos polissacarídeos solúveis em água (WSP), a condição de ambiente natural determinou maior redução nesses teores do que a condição de câmara fria, sugerindo que o tempo de estocagem não afetou significativamente esses níveis.

A embebição determinou redução no conteúdo de WSP, sendo que em sementes mais velhas e deterioradas, a redução foi mais acentuada, sugerindo que pode ter ocorrido hidrólise desse material ou ainda que parte desses polissacarídeos tenha sido liberada na água de lavagem das sementes durante o processo de embebição.

O conteúdo de lipídios apresentou redução tanto em eixos embrionários como em cotilédones durante a embebição. Isto mostra que durante o período de germinação as lipases encontram-se ativas. A maioria dos lipídios armazenados em sementes são triglicerídeos que ficam nos esferossomos, local onde são inicialmente hidrolisados por lipases, liberando glicerol e ácidos graxos; tanto o glicerol como os ácidos graxos liberados vão para o citoplasma onde sofrem fosforilação oxidativa e oxidação ou esterificação, podendo permanecer no citoplasma para serem reutilizados na síntese de constituintes celulares ou entrarem no ciclo de Krebs para produzir energia (BEWLEY & BLACK, 1982).

A redução nos níveis de ácidos graxos tanto em eixos embrionários como em cotilédones durante a embebição sugere que esses ácidos graxos estejam sendo utilizados durante a germina-

ção. Os ácidos graxos não se acumulam, são convertidos a carboidratos que se deslocam para os pontos de crescimento do eixo embrionário, onde serão utilizados na produção de energia ou síntese de outras moléculas (MAYER & POLJAKOFF-MAYER, 1982). BEEVERS (1961) também observou que em cotilédones de *Ricinus* os lipídios armazenados eram convertidos a glicose e sacarose.

Tanto a condição de ambiente natural como o tempo de estocagem determinaram aumento no conteúdo de lipídios em eixos e cotilédones. Pode-se sugerir que este aumento seja devido a uma maior facilidade de extração pelo método utilizado e não a um aumento real nesse conteúdo, uma vez que se tem conhecimento de que com a deterioração de sementes pode ocorrer a coalescência de corpos lipídicos (BEWLEY & BLACK, 1982) e que com a deterioração das sementes usadas neste trabalho ocorreu ruptura de suas paredes celulares.

Os níveis de ácidos graxos livres nos eixos embrionários pouco variaram com a condição e o tempo de armazenamento. Em cotilédones, entretanto, verificou-se redução principalmente nos ácidos graxos insaturados linoléico e linolênico. Essa queda, sugere a sua degradação, principalmente por ter sido verificada maior redução em sementes de menor viabilidade, estocadas por períodos mais longos. Por outro lado, foi verificado um aumento nos níveis de peróxidos em sementes inviáveis. Com o processo de envelhecimento da semente, sabe-se que há a peroxidação de lipídios (WILSON & McDONALD, 1986). De acordo com St ÂNGELO & ORY (1975)

a degradação oxidativa de lipídios insaturados em amendoim produz peróxidos, os quais posteriormente vão originar ácidos, alcoois, aldeídos e cetonas. O aumento nos níveis de peróxidos corroboram a sugestão de que pode ter ocorrido larga degradação de ácidos graxos livres nessas sementes. A peroxidase pode agir sobre as membranas aumentando sua permeabilidade, com rompimento de vários compartimentos celulares (TAKAKI, 1979). Além disso, tecidos em estado de senescência acumulam produtos de peroxidação que parecem ficar localizados na dupla camada lipídica das membranas (WILHELM & WILHELNOVA, 1981; PAULS & THOMPSON, 1984; FOBEL *et alii*, 1987). Segundo LYNCH *et alii* (1985), as reações de peroxidação podem ser enzimaticamente iniciadas pela lipoxigenase e o hidroperóxido de lipídios resultante da ação dessa enzima pode determinar um baixo valor nutritivo além de formar produtos tóxicos pela sua decomposição química (GARINER, 1979; PRIESTLEY, 1986).

A variação verificada nos ácidos graxos livres saturados e no ácido oléico pode-se atribuir ao fato de que o cálculo dos conteúdos desses ácidos foram feitos com base na porcentagem do total de ácidos graxos livres encontrados na fração de lipídios e não ao aumento real ou redução, já que, de acordo com a literatura esses ácidos graxos livres praticamente não sofrem alterações em sua composição.

As técnicas utilizadas para análise "in situ" puderam demonstrar que há uma semelhança entre o material recém-colhido e

o material estocado em câmara fria por 21 meses. Assim sendo, os métodos utilizados também revelaram um estado fisiológico semelhante para estes materiais uma vez que ambos apresentavam alto potencial de germinação e vigor, o que não pôde ser observado no material estocado em ambiente natural por 21 e 45 meses, cujo potencial de germinação e vigor eram mais baixos ou nulos.

A hematoxilina é um corante natural e suas soluções são utilizadas há muitas décadas para estudos histológicos visando evidenciar diversas estruturas celulares e teciduais, devido a seu comportamento como corante básico. Desta forma, o uso deste corante mostrou-se adequado para a detecção de inúmeros rompimentos de paredes celulares dos materiais estocados em ambiente natural com 21 e 45 meses. Do mesmo modo, a eosina como um corante ácido foi utilizada para a detecção do conteúdo citoplasmático, mostrando-se também adequada para observação das alterações ocorridas a esse nível.

Xylidine Ponceau é um corante azóico que possui em sua molécula radicais sulfato. É utilizado normalmente em soluções com pH 2,5, o que garante que esses radicais se apresentem ionizados negativamente e que o substrato esteja com seus radicais protonados (VIDAL, 1970). Em células vegetais o uso do xylidine Ponceau tem tornado possível a detecção do material protéico (VIDAL & FIMENTEL, 1985). Esse fato tem sido confirmado em materiais vegetais pois, após a extração com enzimas proteolíticas, o material corado desaparece (CORTELAZZO, 1986; RANDI, 1987).

No caso do material corado em *Phaseolus vulgaris*, o uso do XF revelou a influência da embebição para a modificação do estado de agregação do material protéico, uma vez que a embebição possibilita a ativação de inúmeras enzimas necessárias para desencadear o processo de germinação como já descrito para diversas espécies de cereais e leguminosas (PERNOLET, 1978, 1985).

Quanto à armazenagem, as diferenças detectadas estão relacionadas à perda de viabilidade do material após 45 meses. Essa afirmação ganha consistência uma vez que o material com 21 meses de estocagem em condições naturais apresentou resultados intermediários tanto ao nível de viabilidade como ao nível topográfico. Além disso, a aparente redução do material protéico corado foi confirmada pelos métodos bioquímicos de dosagens utilizados no presente trabalho e estão de acordo com dados obtidos na literatura (PERNOLET, 1978, 1985).

As moléculas de azul de toluidina possuem em sua estrutura, radicais NH_3 livres. Como um corante básico, o AT tem sido utilizado para detecção de grupos aniônicos presentes no substrato no pH utilizado para a coloração, destacando-se os fosfatos, sulfatos e grupos carboxila (VIDAL, 1977; KIERNAN, 1981). Como vários corantes básicos, o AT pode apresentar-se metacromático. A metacromasia é um evento caracterizado por um abaixamento do pico de absorção em relação a soluções 10^{-6}M desse corante a 625nm (hipocromismo) e formação de novo pico de absorção em comprimentos de ondas menores (efeito hipsocrômico) e é devida ao empilha-

mento das moléculas do corante. Assim, a metacromasia ao nível dos tecidos torna-se mais evidente à medida que aumenta o número e a proximidade dos grupos aniônicos existentes (VIDAL, 1987).

Paredes celulares apresentam-se metacromáticas devido à presença de substâncias pécticas em sua estrutura. Processos como o da germinação e alongamento celular podem provocar alterações na metacromasia, sugerindo a ocorrência de liberação de grupamentos basófilos e ordenados, como já detectado em sementes de *Glycine max* (CORTELAZZO, 1986) e esporos de *Cyathea delgadii* (RANDI, 1987), durante a germinação. Em *Phaseolus vulgaris*, o eixo embrionário apresentou suas paredes celulares mais metacromáticas do que as de cotilédones, o que reforça a idéia de que regiões em crescimento apresentam um maior número de poliânions disponíveis. A presença de inúmeras regiões com a cromatina mais compactada e possível alteração do volume nuclear, vem sendo descritos como uma característica inicial da destruição dos núcleos de células em necrose (SANCHEZ-LUCAS, 1959) e também foram detectados em cotilédones de sementes de *Canavalia ensiformis* e *Canavalia gladiata* quando essas estruturas sofreram abscisão durante o desenvolvimento das plantas (CORTELAZZO, 1989).

Os resultados obtidos por todos os métodos utilizados indicam que com a estocagem em condições inadequadas de preservação da qualidade fisiológica da semente vão ocorrendo gradativamente eventos celulares que culminam com uma perda do padrão de distribuição do material protéico e com o rompimento das paredes

e membranas celulares do cotilédone, além das alterações nucleares discutidas anteriormente.

A aparente redução da quantidade de grãos de amido detectada para o material após estocagem em ambiente natural por 45 meses, pode estar relacionada à degradação e consumo dessas moléculas durante o processo de envelhecimento e perda de viabilidade, em consequência das oscilações de umidade relativa e temperatura, devido à respiração das sementes, com a formação de açúcares livres, o que é confirmado pelas dosagens bioquímicas.

Nas regiões que envolvem os inúmeros grânulos de amido, há um maior número de radicais catiônicos e aniônicos disponíveis, uma vez que há uma maior afinidade dessas regiões, tanto pelo xylidine Ponceau quanto pelo azul de toluidina. Com a perda da viabilidade é notada uma maior capacidade de ligação desses corantes nesses locais, sugerindo que um número ainda maior de radicais ionizados seja formado durante esse processo.

CONCLUSÕES

Em *Phaseolus vulgaris* o armazenamento sob condições de temperatura e umidade relativa elevadas determina a perda de viabilidade das sementes. Isso é confirmado quando são realizados testes de envelhecimento precoce.

As melhores condições observadas para a manutenção do vigor e germinação são aquelas apresentadas por câmara fria, onde mesmo após 36 meses de armazenamento as sementes permanecem com esses parâmetros praticamente inalterados.

Com o armazenamento a quantidade de macromoléculas presentes no material de reserva diminui, enquanto a quantidade de micromoléculas aumenta. Esse comportamento é observado através das análises bioquímicas e da água de lavagem das sementes.

Em sementes de baixa viabilidade, há uma menor resistência à entrada de água, principalmente naquelas de baixo teor de umidade, o que determina maior rompimento das membranas e maior efluxo de eletrólitos e solutos orgânicos na água de lavagem.

O índice de peróxido pode ser utilizado como um importante parâmetro para estimar a viabilidade de sementes de feijão, uma vez que esse índice sofre uma acentuada elevação durante o processo de envelhecimento.

Durante a perda de viabilidade ocorrem inúmeras alterações celulares culminando com a degeneração do tecido expressa

principalmente através de alterações observadas no nível de compactação dos núcleos e desaparecimento de nucléolos.

A redução no conteúdo de proteínas nas sementes de baixa viabilidade, observada nas análises "in situ" pode ser utilizada para confirmar os resultados obtidos nas dosagens bioquímicas.

O aparente aumento da metacromasia nas paredes celulares coradas com o azul de toluidina sugere que durante o envelhecimento haja um aumento na disponibilidade de poliânions nesses locais.

RESUMO

Com o objetivo de estudar as alterações metabólicas em sementes de *Phaseolus vulgaris* durante o período de armazenamento e perda de viabilidade, procedeu-se estocagem de sementes em ambiente com temperatura e umidade relativa controladas (câmara fria) e em ambiente sem controle (condições de ambiente natural) e conduziu-se estudos de germinação, vigor, análise "in situ" de material protéico, amido, parede celular, núcleos e nucléolos, além de determinações bioquímicas.

A qualidade da semente durante o período de sua existência foi afetada pelas condições em que ficaram acondicionadas.

As oscilações de temperatura e umidade relativa no ambiente de armazenamento das sementes aceleraram as suas atividades metabólicas, culminando com a deterioração que foi caracterizada pela perda de vigor e baixa ou nula capacidade germinativa.

Durante o período de condução do trabalho, verificou-se que o melhor ambiente para manter por mais longo período a viabilidade das sementes foi o ambiente de câmara fria.

Durante a embebição, as sementes do lote 1, armazenadas em ambiente natural e que apresentavam alto grau de deterioração, apresentaram rápido aumento em seu peso de matéria fresca e redução lenta e progressiva após 4 horas de embebição, caracterizando perda do material de reserva.

Quando se estudou a transferência de matéria seca dos cotilédones para os eixos embrionários, verificou-se que as sementes estocadas em câmara fria apresentaram maior transferência de matéria seca do que as sementes estocadas em ambiente natural e que essa transferência dos cotilédones para o eixo embrionário se processava até cerca de 12 a 14 dias, período em que a plântula passava a absorver nutrientes do substrato.

As análises de germinação e vigor mostraram que durante o período de estocagem, com a perda de viabilidade da semente, ocorreu menor mobilização do material de reserva dos cotilédones para o eixo embrionário.

O tratamento de sementes com temperatura e umidade relativa altas permitiu confirmar a existência de uma relação entre a perda do potencial de germinação e vigor e redução no material de reserva (amido e proteínas) dos cotilédones e aumento nos níveis de aminoácidos livres e açúcares solúveis totais.

Observou-se uma relação inversa entre sementes viáveis e efluxo de eletrólitos e substâncias orgânicas na água de lavagem das sementes, sendo que na análise desse material, verificou-se a presença de aminoácidos e carboidratos solúveis na água.

O aumento no nível de umidade inicial da semente antes da germinação determinou um aumento na velocidade e na porcentagem de germinação total, enquanto a redução nesse nível de umidade reduziu tanto a velocidade quanto a porcentagem de germinação total.

A coloração das sementes com o sal de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio permitiu separar as sementes viáveis das in-

viáveis, caracterizando o grau de vigor das mesmas pela intensidade de coloração que as suas partes vivas apresentaram em resposta ao sal.

O consumo de O_2 apresentou-se alto em sementes mais vigorosas e houve uma relação inversa com a perda de viabilidade das sementes.

O teor de lipídios das sementes apresentou um pequeno aumento com o envelhecimento e perda de viabilidade. Entretanto quando se colocou a semente para embeber, houve redução nesse conteúdo. Já os ácidos graxos livres insaturados (linoléico e linolênico) reduziram e houve aumento do nível de peróxidos.

A análise "in situ" foi feita em sementes recém-colhidas e sementes com 21 meses de estocagem em câmara fria e em ambiente natural e com 45 meses de estocagem em ambiente natural, utilizando-se técnicas topoquímicas e citoquímicas.

O Azul de toluidina a pH 4,0 permitiu uma boa visualização das paredes celulares que exibiram metacromasia, sendo que em sementes viáveis as mesmas se apresentaram mais íntegras, quando comparadas com sementes inviáveis.

Tanto com o processo de germinação como com o processo de envelhecimento houve um aumento de metacromasia do material corado com o Azul de toluidina a pH 4,0, indicando liberação de radicais aniônicos. Os núcleos e nucléolos apresentaram-se bastante corados pelo Azul de toluidina em sementes inviáveis e com coloração mais esverdeada em sementes viáveis, sugerindo uma maior atividade metabólica nesses materiais.

Células coradas pelo xylidine Fonceau revelaram uma perda do padrão globular à medida que a viabilidade da semente se reduziu com o tempo de armazenamento.

A observação de cotilédones e eixos em microscopia de polarização revelou uma grande quantidade de grãos de amido nas células cotiledonares. Nos eixos embrionários observou-se uma maior concentração de amido na região do córtex e uma quantidade bastante reduzida nas células próximas à epiderme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL SAMAD, I.M. & PEARSE, R.S. Leaching of ions, organic molecules, and enzymes from seeds of peanut (*Arachis hypogaea* L.) imbibing without testas or with intact testas. *J. Exp. Bot.*, 29: 1471-8, 1978.
- ABDUL-BAKI, A. Relationship of glucose metabolism to germinability and vigor in germinating barley and wheat seeds. *Crop Sci.*, 9: 732-6, 1969.
- ABDUL-BAKI, A. & ANDERSON, J.D. Viability and leaching of sugars from germinating barley. *Crop Sci.*, 10: 31-3, 1970.
- ABU-SHAKRA, S.S. & CHING, T.M. Mitochondrial activity in germinating new and old soybean seeds. *Crop Sci.*, 7: 115-8, 1967.
- AKAZAWA, T. Starch, inulin and other reserve polysaccharides. *In: Plant Biochemistry*, eds. Bonner & Varner, Academic Press, New York and London, 1965. p. 258-297.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY Official and tentative methods of the American Oil Chemists Society. 3 ed. rev. Champaign, 1975. 2v.

- ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical differences in deteriorating barley seed. *Crop Sci.*, 10: 36-9, 1970a.
- ANDERSON, J.D. Metabolic changes in partially dormant wheat seeds during storage. *Plant Physiol.*, 46: 605-8, 1970b.
- ANTUNES, P.L. & SGARBIERI, V. Influence of time and conditions of storage on technological and nutritional properties of a dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) variety Kosinha 62. *Journal of Food Science*, 44: 1703-6, 1979.
- ARAÚJO, E.F. Influência da secagem e debulha das vagens na germinação e no vigor de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Tese de Mestrado, 1983. Universidade Federal de Viçosa.
- ASHTON, F.M. Mobilization of storage proteins of seeds. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 27: 95-117, 1976.
- ASSUNÇÃO, M.V.A. & MORITA, T. Manual de soluções, reagentes e solventes. 1ª ed. São Paulo, ed. Edgard Blucher, 1968. 627 p.
- AUSTIN, R.B. Effects of environment before harvesting on viability. In: ROBERTS, E.H., ed. *Viability of seeds*. Syracuse, Syracuse Univ. Press, 1972. p. 144-9.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M. & LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. *Biochim. Biophys. Acta.*, 284: 441-51, 1981.

- BAILEY, R.W. Polysaccharides in leguminosae. In: *Chemotaxonomy of the leguminosae*. (eds. Harbone, Boulter & Turner). Academic Press, New York, 1971. p. 503-41.
- BAILEY, C.J. & BOULTER, D. The structure of legumin, a storage protein of broad bean (*Vicia faba*) seed. *Eur. J. biochem.*, 17: 460-6, 1970.
- BARKER, R.D.G.; DERBYSHIRE, E.; YARWOOD, A. & BOULTER, D. Purification and characterization of the major storage proteins of *Phaseolus vulgaris* seeds and their intracellular cotyledonary distribution. *Phytochemistry* 15: 751-7, 1976.
- BASKIN, C.C. Packaging materials. *Proc. of the 1969 Short Course for Seedsmen*. Mississippi State University, Miss. State, 1969. p. 9-101.
- BEEVERS, H. Metabolic production of sucrose from fat. *Nature*, 191: 433-6, 1961.
- BEEVERS, L. Post-translational modifications. In: *Boulter, D. & Prthier, B.* Nucleic acids and proteins in plant 1. Structure, biochemistry and physiology of proteins. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, v. 14A. Springer-Verlag, Berlin, 1982. p. 136-68.

- BERLYN, G.F. Seed germination and morphogenesis. In: KOZLOWSKI, T.T., ed. *Seed Biology*. v.1, Academic Press, 1972. p. 232-312.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: viability, dormancy and environmental control*. Berlin, Springer-Verlag, 1982. v. 2, 375p.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: development, germination and growth*. Berlin, Springer-Verlag, 1983. vol. 1, 375p.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. *Seeds. Physiology of development and germination*. New York, Plenum, 1985. 367p.
- BIDLESKI, R.L. & TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Annal. Bioch.* 17: 278-93, 1966.
- BLACK, H.S. & ALTSCHUL, A.M. Gibberellic Acid - induced lipase and alpha-amylase formation and their inhibition by aflatoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19: 661-4, 1965.
- BONNEWELL, V.; KOUKKARI, W.L. & PRATT, D.C. Light, oxygen, and temperature requirements for *Typha latifolia* seed germination. *Can. J. Bot.*, 61: 1330-6, 1983.

- NORTHWICK, H.A.; HENDRICKS, S.B.; PARKER, M.W.; TOOLE, E.H. & TOOLE, V.K. A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 38: 662-6, 1952.
- BRASIL, Ministério da Agricultura. DNPV - Divisão de sementes e mudas. *Regras para Análise de Sementes*. Brasília, 1976. 188p.
- BROWN, K. Germination. In: *Plant Physiology: a Treatise*. Ed. F.C. Steward, v. 111, Academic Press, 1972.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54, 1976.
- BUCHVAROV, P. & GANTCHEFF, I. Influence of accelerated and natural aging on free radical levels in soybean seeds. *Physiol. Plant.*, 60:53-6, 1984.
- BURR, H.K.; KON, S. & MORRIS, H.J. Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content and temperature and time of storage. *Food Technol.*, 22: 336-8, 1968.
- BURRIS, J.S.; EDJE, D.T. & WAHAB, A.H. Evaluation of various indices of seed and seedling vigor in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). *Proc. Ass. off Seed Anal.*, 59: 73-81, 1969.

- BYRD, H.W. & DELOUCHE, J.C. Deterioration of soybean seed in storage. *Proc. Ass. Off. Seed Analyst*, 61: 41-57, 1971.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência tecnologia e produção*. Campinas, Fundação Cargill, 1988. 424 p.
- CHAMBAI, G.; BARNOUD, F. & JOSELEAU, J.P. Structure of the primary cell walls of suspension-cultured *Rosa glauca* cells I. Polysaccharides associated with cellulose. *Plant physiol.*, 74: 687-93, 1984.
- CHANG, P.C. Enzymic degradation of starch in cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Coker 100). *Phytochemistry* 21(6): 1263-70, 1982.
- CHEN, R. & JONES, R.L. Studies on the release of barley aleurone cells proteins: kinetics of labelling. *Planta*, 118: 193-206, 1974.
- CHING, T.M. Metabolism of germinating seeds. In: KOZLOWSKI, T.M., ed. *Seed Biology*. v. 1, Academic Press, 1972. p. 103-218.
- CHING, T.M. & SCHOOLCRAFT, I. Physiological and chemical differences in aged seeds. *Crop Sci.*, 8: 407-9, 1968.

- CHING, T.M.; PARKER, M.C. & HILL, D.D. Interaction of moisture and temperature on viability of storage seed stored in hermetically sealed cans. *Agron. J.*, 51: 680-4, 1969.
- CLUM, H.C. Formation of amylase in disks of bean hypocotyl. *Plant Physiol.*, 42: 568-72, 1967.
- CONDE, A. dos R. & GARCIA, J. Armazenamento e embalagem de sementes de forrageiras. *Inf. Agrop.*, 10(111): 44-9, 1984.
- CORTELAZZO, A.L. Proteínas cotiledonares de soja: detecção "in situ" e mobilização durante a germinação. Tese de Mestrado, 1986. Universidade Estadual de Campinas.
- CORTELAZZO, A.L. Caracterização topoquímica e bioquímica de sementes de *Canavalia ensiformes* DC e *Canavalia gladiata* DC. Tese de Doutorado, 1989. Universidade Estadual de Campinas.
- CROCKER, W. & BARTON, L.V. *Physiology of seeds*. Waltham, Mass Chronica Botanica Company, 1957. 267 p.
- DALL, J.E. Gibberellins and early growth in seedlings of *Phaseolus vulgaris*. *Planta*, 89: 155-64, 1969.
- DELOUCHE, J.C. Physiology of seed storage. Proc. 23 rd Corn and sorghum, Res., 23: 83-90 (1-8), 1968.

- DELOUCHE, J.C. Precepts of seed storage (revised). S.C. Proc. Mississippi, 1: 97-122, 1973.
- DELOUCHE, J.C. *Pesquisas em sementes no Brasil*, Brasília, AGIPLAN, 1975. 70P.
- DELOUCHE, J.C. metodologia de pesquisa em sementes: III. Vigor, envigoramento e desempenho no campo. *Rev. Bras. sem.*, 3(2): 57-64, 1981.
- DELOUCHE, J.C. & BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sci. Technol.*, 1: 427-52, 1973.
- DELOUCHE, J.C. & POTTS, H.C. *Programa de sementes; planejamento e implantação*. Brasília, AGIPLAN, 1974.
- DELOUCHE, J.C.; RUSHING, T.T. & BASKIN, C.C. Predicting the relative storability of crop seed lots. *Search*, 8: 1-8, 1968.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J. & BOUTLER, D. Legumin and vicilin storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, 15: 3-24, 1976.
- DUKE, S.H. & KAKEFUDIA, G. Role of the testa in preventing cellular rupture during imbibition of legume seeds. *Plant Physiol.*, 67: 449-56, 1981.

- DUNN, G. A model for starch breakdown in higher plants. *Phytochemistry*, 13: 1341-9, 1974.
- DURE, L.S. Site of origin and extent of activity of amylases in maize endosperm. *Plant Physiol.*, 35: 925-34, 1960.
- EARLE, F.R. & JONES, G. Analyses of seeds samples from 113 plant families. *Econ. Bot.*, 16: 221-50, 1962.
- EDGE, O.T. & BURRIS, J.S. Physiological and biochemical changes in deteriorating soybean seeds. *Proc. Assoc. Off. Seed Anal.*, 60: 158-65, 1970.
- ERICSON, R.C. & CHRISPHEELS, M.J. Isolation and characterization of glucosamine-containing storage glycoproteins from the cotyledons of *Phaseolus aureus*. *Plant Physiol.*, 52: 98-104, 1973.
- EVENARI, M. Light and dormancy. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, v. 15. Ed. W. Ruhland. Springer-Verlag, Berlin, 1965. p. 804-47.
- EVENARI, M. Seed physiology: from ovule to maturing seed. *Bot. Rev.*, 50(2): 143-70, 1984.

- FELIPPE, G.M. Germination of light sensitive seeds of *Cucumis anguria* and *Rumex obtusifolius*: effects of temperature. *New Phytol.*, **84**: 439-48, 1980.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. & DIETRICH, S.M.S. Sugar content and metabolic activities in cold-stored fragmented xylopodium of *Ocimum nudicaule* Benth. var. *anisifolia* Giul. (Labiata). *Journ. Exp. Bot.*, **34**(141): 476-83, 1983.
- FOBEL, M.; LYNCH, D.V. & THOMPSON, J.E. Membrane deterioration in senescing carnation flowers. *Plant Physiol.*, **85**: 204-11, 1987.
- FISHER, R.A. & YATES, F. *Statistical tables*. 2. ed. Oliver and Boyd, Londres, 1943.
- GARCIA, J. Determinação da maturidade fisiológica de semente de milho (*Pennisetum americanum* Schum). Tese de mestrado, 1980. Universidade Federal de Pelotas.
- GARDNER, H.W. Lipid hydroperoxity reactivity with proteins and amino acids: a review. *J. Agric. Food Chem.*, **27**: 220, 1979.
- GEPSTAIN, S. & ISLAN, I. A promotive action of kinetin on amylase activity in cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. *Plant & cell. Physiol.*, **11**: 819-22, 1970.

- GHOSL, R.; ABRUL, P. & SINHA, S.K. Amylase heterosis and complementation in sorghum. *Plant. Sci. Lett.*, **2**: 173-6, 1974.
- GIDROL, X.; NOUBHANI, A.; MOCQUOT, B.; FOURNIER, A. & PRADET, A. Effect of accelerated aging on protein synthesis in two legume seeds. *Plant Physiol. Biochem.*, **26**(3): 281-8, 1988.
- GOLDSTEIN, L.D. & JENNINGS, P.H. The occurrence and development of amylase enzymes in incubated de-embryonated maize kernels. *Plant Physiol.*, **55**: 893-8, 1975.
- GRANT REID, J.S. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenumgraecum* L.. *Planta*, **100**: 131-42, 1971.
- GREENWOOD, C.T. & MCGREGOR, A.W. The isolation of alpha-amylase from barley and malted barley, and a study of the properties and action patterns of the enzymes. *J. Inst. Brew.*, **71**: 405-17, 1965.
- HAARD, N.F. & TOBIN, C.L. Patterns of soluble peroxidase in ripening banana fruit. *J. Food Sci.*, **36**: 854-7, 1971.
- HALMER, P. The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds. *Physiol. Vég.*, **23**(1): 107-25, 1985.

- HARRINGTON, J.F. *The value of moisture-resistant containers in vegetable seed packaging.* California Agricultural Experiment Station, 1963. p. 3-23 (Bulletin, 792).
- HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. *Seed Biology.* New York, Academic Press, 1972. v. 3 p. 145-245.
- HARTMAN, H.T. & KESTER, D.E. *Plant propagation; principles and practices.* 3. ed. Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice-Hall, 1975. 670p.
- HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl sters from lipids. *Lab. Pract.*, 1: 475-6, 1973.
- HENDRICKS, S.B. How light interacts with living matter. *Sci. Amer.*, 219(3): 174-86, 1968.
- HENDRICKS, S.B. & TAYLORSON, R.B. Variation in germination and amino acid leakage of seeds with temperature related to membrane phase change. *Plant Physiol.*, 58: 7-11, 1976.
- HIBBARD, R.F. & MILLER, E.V. Biochemical studies of seed viability. I. Measurements of condutance and redution. *Plant Physiol.*, 3: 335-52, 1928.

- HILLER, D. Water deficits and plant growth. v. III. Plant responses and control of water balance. Ed. T.T. KOZLOWSKI, 1972. P. 65-9.
- HOHLBERG, A.I. & STANLEY, D.W. Hard-to-cook defect in black beans. Protein and starch considerations. *J. Agric. Food Chem.* 35: 571-6, 1987.
- HOWE, R.W. Loss of viability of seed in storage attributable to infestation of insects and mites. *Seed Sci. Technol.*, 1(3): 563-86, 1973.
- HUANG, A.H.C. & BEEVERS, L. Developmental changes in endosperm of germinating castor bean independent of embryonic axis. *Plant Physiol.*, 54: 277-9, 1974.
- JINGLE, J., BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.H. Metabolic changes associated with the germination of corn I. Changes in weight and metabolites and their redistribution in the embryo axis, scutellum, and endosperm. *Plant Physiol.*, 39(5): 735-40, 1964.
- ISELY, D. Vigor tests. *Proc. Assoc. Off. Seed Anal.*, 47: 176-82, 1957.
- JONES, R.L. Fractionation of the enzymes of the barley aleurone layer: evidence for soluble mode of enzyme release. *Planta.*, 103: 95-109, 1972.

- JULIANO, B.O. & VARNER, J.E. Enzymic degradation of starch granules in the cotyledons of germinating peas. *Plant Physiol.* **44**: 886-92, 1969.
- KAREL, M.; SCHAICH, K. & ROY, R.B. Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and amino acids. *J. Agr. Food Chem.*, **23**(2): 159-63, 1975.
- KELLY, J.D. & BLISS, F.A. Quality factors affecting the nutritive value of bean seed protein. *Crop Sci.*, **15**: 757-60, 1975.
- KENDRICK, R.E. Photocontrol of seed germination. *Sci. Prog.*, **63**: 347-67, 1976.
- KENDRICK, R.E. & FRANKLAND, B. fitocromo e crescimento vegetal. *Trad. G.N. Felipe, EPU-EDSP, SP.* 1981.
- KIERNAN, J.A. *Histological & histochemical methods: theory & practice*. London, Pergamon, 1981. 344p.
- KITTOCK, D.L. & LAW, A.G. Relationship of seedling vigor to respiration and tetrazolium chloride reduction by germinating wheat seeds. *Agron. J.*, **60**: 286-8, 1968.

- KOOSIRA, P.T. & HARRINGTON, J.F. Biochemical effects of age on membranal lipids of *Cucumis sativus* L. seed. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.*, 34: 329-40, 1969.
- KOZLOWSKI, T.T. *Seed Biology*. V. II. Academic Press. London. 1972.
- KRISHNAMOORTHY, H.N. *Plant growth substances*. Mac. Graw-Hill Publ. Co. Ltda., New Delhi. 1981. p.49-87.
- LARKINS, B.A. Seed storage proteins: characterization and biosynthesis. *Biochem. Plants*, 6: 449-89, 1981.
- LARSON, L.A. The effect soaking pea seeds with or without seed coats has on seedling growth. *Plant Physiol.*, 43: 255-9, 1968.
- LEOPOLDO, A.C. Temperature effects on soybean imbibition and leakage. *Plant Physiol.*, 65: 1096-98, 1980.
- LOPES, J.C. Influência do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de arroz. Tese de Mestrado. 1980. Universidade Federal do Ceará.
- LOPES, J.C. Influência do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de café, *Coffea arabica* L., cv. catuaí. In: Anais do III seminário interno de pesquisas da UFES, Vitória, 1983. Vitória, UFES, 1983. p. 13-14.

LYNCH, D.V.; SRINIHARA, S. & THOMPSON, J.E. Lipoxygenase generated hydroperoxides account for the nonphysiological features of ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes of carnation. *Planta*, **164**: 121-5, 1985.

LOTT, J.N.A. Protein bodies. In: TOUBERT, R.E., ed. *The Plant Cell*. New York, Academic, 1980. Cap. 14, p. 589-623 (The Biochemistry of Plants, v. 1).

MA, Yu & BLISS, I.A. Seed proteins of common bean. *Crop Sci.*, **18**: 431-7, 1978.

MAEDA, J.A. Germinação e dormência de sementes de *Vitis vinifera*. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 1982.

MAEDA, J.A.; LAGO, A.A & TELLA, R. Efeito da calagem e adubação com NPK na qualidade de sementes de amendoim. *Pesq. Agropec. Bras.*, **21**(9): 941-4, 1986.

MAEDA, J.A.; ZINK, E. & ALMEIDA, L. D.A. de. Teste de vigor: envelhecimento rápido em sementes de feijão. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 1, GOIÂNIA, GOIÁS, 1982. *Anais da I Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão*. Goiânia, 1982. p. 330-9.

- MAGUIRL, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.*, 2(2): 176-7, 1962.
- MAGUIRL, J.D. Seed quality and germination. In: KHAN, A.A., ed. *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. New York, North-Holland Publishing Company, 1977. 447p.
- MAIA, V. *Técnica histológica*. São Paulo, Atheneu, 1979, p. 107-20.
- MANNERS, D.J. & MARSHALL, J.J. Studies on carbohydrate-metabolising enzymes. Part XXIV - The action of malted-rye alpha-amylase on amylopectin. *Carbohydr. Res.* 18: 203-9, 1971.
- MANDHAR, M.S. Effects of "osmotic" systems on germination of peas (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 71: 81-6, 1966.
- MARCOS FILHO, J. Germinação de sementes. In: semana de atualização em produção de sementes, 1ª, Piracicaba, 1980. p. 11-39.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. *The germination of seeds*. 3 ed. New York, Pergamon, 1982. 211p.
- MAYER, A.M. & SHAIN, Y. Control of seed germination. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 167-93, 1974.

- McCREADY, R.M.; GUGGOLS, J.; SILVEIRA, V. & DWENS, H.S.
Determination of starch and amilose in vegetables. Application
to plas. *Anal. Chem.*, **22**(9): 1156-8, 1950.
- McCULLOUGH, J.M. & SHROPSHIRE, W. Physiological predetermination
of germination responses in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
Plant Cell. Physiol., **11**: 139-48, 1970.
- McLEESTER, R.C.; HALL, T.C.; SUN, S.M. & BLISS, F.A. Comparasion
of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from
Vicia faba. *Phytochemistry*, **2**: 85-93, 1973.
- MEIER, H. & REID, J.S.G. Reserve polysaccharides other than
starch in higher plants. In: *Encyclopedia of plant physiology*
news series, v. 13A - *Plant carbohydrates 1*, ed. Loewus and
Tanner, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1982.
p. 418-71.
- MERCIER, C. Biosynthesis and accumulation of polysaccharides in
seeds and tubers. *Physiol. vég.*, **23**: 231-42, 1985.
- METIVIER, J. & PAULILO, M.T. The utilization of cotyledonary
reserves in *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca. 11. The effects
of 6-benziladenine and gibberellic acid upon embryonated and
detached cotyledons. *J. Exp. Bot.*, **31**(124): 1271-82, 1980.

- MILLER, A. Biochemistry of legume seed proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **26**: 53-72, 1975.
- MOLINA, M.R.; DE LA FUENTE, G. & BRESSANI, R. Interrelationships between storage, soaking time, cooking time, nutritive value and others characteristics of the black bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, **40**: 587-91, 1975.
- MOORE, R.P. Tetrazolium tests for diagnosing causes for seed weakness and for predicting and understanding performance. *Proc. Ass. Off. Seed Anal.*, **56**: 70, 1969.
- MOORE, R.P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. ed. *Seed Ecology*. University Park, USA, Pennsylvania State Univ. Press, 1973. p. 347-66.
- MORRIS, H.J. & WOOD, L.R. Influence of moisture content on keeping quality of dry beans. *Food Technol.*, **10**: 225-9, 1956.
- MURATA, T.; AKAZAWA, T. & FUKUCHI, S. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. I. An analytical study. *Plant Physiol.*, **43**: 1899-905, 1968.
- MURPHY, J.B. & NOLAND, T.L. Temperature effects on seed imbibition and leakage mediated by viscosity and membranes. *Plant Physiol.*, **69**: 428-31, 1982.

- MURRAY, D.R. Accumulation of seed reserves of nitrogen. In: Murray, D.R. ed. *Seed Physiology*. 1. Development. Academic Press, Sydney, 1984. p. 83-127.
- NEUBERN, R.G. & CARVALHO, N.M. Maturação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Científica*, 4(1): 28-32, 1976.
- NORONHA, A.; VICENTE, M. & FELIPPE, G.M. Photocontrol of germination of *Cucumis anguria* L. *Biol. Plant.*, 20: 281-6, 1978.
- OBENDORF, R.L.; ASHORTH, E.N. & RYTKO, G.T. Influence of seed maturation on germinability in soybean. *Crop Sci.*, 20: 483-6, 1980.
- OHAD, I.; FRIEDBERG, I.; NE'EMAN, Z. & SCHRAMM, M. Biogenesis and degradation of starch. I - The fate of the amyloplast membranes during maturation and storage of potato tubers. *Plant Physiol.* 47: 465-77, 1971.
- OKITA, T.W.; GREENBERG, E.; KUHN, D.N. & FREISS, J. Subcellular localization of the starch degradative and biosynthetic enzymes of spinach leaf. *Plant Physiol.*, 64: 187-92, 1979.
- OLIVEIRA, P.J. Influência do armazenamento na germinação e vigor de sementes de feijão-de-corda. Tese de mestrado. 1981. Universidade federal do Ceará.

- OSBORNE, T.B. The chemical nature of diastase. *J. Amer. Chem. Soc.*, **17**: 587-603, 1895.
- OSBORNE, T.B. & CAMPBELL, G.F. The proteins of malt. *J. Amer. Chem. Soc.*, **18**: 542-64, 1898.
- PALIYATH, G. & THOMPSON, J.E. Calcium- and calmodulin-regulated breakdown of phospholipid by microsomal membranes from bean cotyledons. *Plant Physiol.*, **83**: 63-8, 1987.
- PARIJHA, P.C.; RATH, A.M. & SAHOO, J.K. Studies on the hygroscopic equilibrium and viability of rice stored under various relative humidities. *Seed Research*, **5**(1): 1-5, 1977.
- PARRISH, D.J. & LEOPOLD, A.C. Transient changes during soybean imbibition. *Plant Physiol.*, **59**: 1111-5, 1977.
- PARRISH, D.J. & LEOPOLD, A.C. On the mechanism of aging in soybean seeds. *Plant Physiol.*, **61**: 365-8, 1977.
- PAULS, K.P. & THOMPSON, J.E. Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. *Plant Physiol.*, **75**: 1152-7, 1984.
- PENNER, D. & ASHTON, F.M. Hormonal control of proteinase activity in squash cotyledons. *Plant Physiol.*, **42**: 791-6, 1967.

- PERNOLET, J.C. Protein bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry*, **17**: 1743-80, 1978.
- PERNOLET, J.C. Biosynthesis and accumulation of storage proteins in seeds. *Physiol. Vég.*, **23** (1): 45-59, 1985.
- PERRY, D.A. Report of the seed vigour test committed 1974-77 on wheat, carrots, sugar beets. *Seed Sci. Technol.*, **6**(11): 159-81, 1978.
- POLICARD, A.; BESSIS, A. & LOCQUIM, R. *Traité de microscopie - Instruments et techniques*. Paris, Masson et Cie., 1957. 606p.
- POLLOCK, R.M. Imbibition temperature sensitivity of lima bean seeds controlled by initial seed moisture. *Plant Physiol.*, **44**: 907-11, 1969.
- POPINIGIS, F. *Fisiologia da semente*. Brasília, AGRPLAN, 1977. 289 p.
- POWELL, A.A. & MATTHEWS, S. A physical explanation for solute leakage from dry pea embryos during imbibition. *J. Exp. Bot.*, **32**: 1045-50, 1981.

- PRESSMAN, E.; NEGBI, M.; SACHS, M. & JACOBSEN, J.V. Varietal differences in light requirements for germination of celery (*Apium graveolens* L.) seeds and the effects of thermal and solute stress. *Aust. J. Plant Physiol.*, 4: 821-31, 1977.
- PRIESTLEY, D.A. Seed aging. Implications of seed storage and persistence in the soil. Cornell University Press, Ithaca, 1986.
- PUSZTAI, A. & WALL, W.A. Glicoprotein 11. *Biochim. Biophys. Acta*, 207: 413-31, 1976.
- GASEL, S.A. & CHRISTENSEN, C.H. Influence of various factors on the deterioration of stored corn by fungi. *Phytopathology*, 50: 703-9, 1960.
- RACUSEN, D. & FOOTL, M. The major glycoprotein in germinating bean seeds. *Can. J. Bot.*, 49: 2107, 1971.
- RANDI, A.M. Aspectos fotomorfogênicos, bioquímicos e citoquímicos durante a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. Tese de Doutorado. 1987. Universidade Estadual de Campinas.
- RANDI, A.M. & FELIPPE, G.M. Efeito de temperatura, luz e reguladores de crescimento na germinação de *Stevia rebaudiana* Bert., *Ciênc. e cult.*, 33: 404-11, 1981.

- REICHARDT, K. A água em sistemas agrícolas. São Paulo, SP, ed. Manole, 1987. 178 p.
- RENÁ, A.B. & VIEIRA, C. Efeito da colheita, em diferentes estádios de maturação, na produção e na qualidade do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Experientia*, 11 (6): 239-57, 1971.
- ROBERTS, E.H. Loss of viability, and crop yields. In: *Viability of seeds*. New York, Syracuse University, 1972. 448 p.
- ROBERTS, E.H. Oxidative processes and the control of seed germination. In: HUYDECKER, W., ed. *Seed Ecology*, Pennsylvania State University Press, Pittsburg, 1973. p. 189-216.
- ROMERO, J.; SUN, S.M.; McLEESTER, R.C.; BLISS, F.A. & HALL, T.C. Heritable variation in a polypeptide subunit of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.*, 56: 776-9, 1975.
- SALGADO-LABORIAU, M.L. A semente de *Miconia pubescens* St. Hil. - Morfologia e germinação. *Anais Acad. Bras. Ciênc.*, 45(3/4): 501-37, 1973.
- SANCHEZ-LUCAS, J.G. Modificaciones patológicas de las células y de los tejidos. In: *Tratado de patologia general y anatomia patológica*. Barcelona, Labor, 1959. 7ª ed. p. 129-76.

- SARTORI, M.R. Deterioration of bean seed (*Phaseolus vulgaris* L.) and its consequences. Thesis M.S., 1971. Mississippi State University. State College Mississippi.
- SARTORI, M.R. & MIORIM, A.L. Armazenamento de arroz-semente em armazém inflável. In: REUNIÃO DE TÉCNICOS EM RIZICULTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1., CAMPINAS, S.P., 1979. *Anais da I Reunião de Técnicos em Rizicultura do Estado de São Paulo*, realizada em Campinas, 5 a 9 de março de 1979. Campinas, CAII, 1979. p. 53-59.
- SATHLER, M.G.B., PINHEIRO FILHO, J.B., HARA, T., FORTES, M., SEDYAMA, G.L. & CONDE, A.R. Secagem de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em camadas finas, a baixas temperaturas, e seus efeitos na germinação das sementes. *R. Bras. Armaz.*, 5(1): 43-9, 1980.
- SCOTT, R.K. & LONDGEN, F.C. The production of high quality seeds. In: HEYDECKER, W., ed. *Seed ecology*. s.l., Pennsylvania State Univ. Press, 1972. p. 81-98.
- SCHULTZ, G.E. & KINCH, R.C. The effect of temperature, light, and growth promoters on seed dormancy in western wheat grass seed. *J. Seed Technol.*, 1(1): 79-85, 1976.

- SEEWALDT, V.; PRIESTLEY, D.A.; LEOPOLD, A.C.; FEIGENSON, G.W. & GOODSAD-ZALDUENDO, F. Membrane organization in soybean seeds during hydration. *Planta*, **152**: 19-23, 1981.
- SGARBIERE, V.C. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas em sementes de plantas da família Leguminosae. *Cienc. Cult.*, **32**(1): 78-84, 1980.
- SGARBIERE, V.C.; ANTUNES, P.L. & JUNQUEIRA, R.G. Algumas propriedades físico-químicas e nutricionais das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. var. Rosinha 62). *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **2**(1): 1-20, 1982.
- SHANNON, J.; GREECH, R.G. & LOERCH, J.D. Starch synthesis studies in *Zea mays*. III - Molecular distribution of radioactivity in starch. *Plant Physiol.* **45**: 163-8, 1970.
- SIEGELMAN, H.W. & FIRER, E.M. Purification of phytochrome from oat seedlings. *Biochemistry*, **3**: 418-23, 1964.
- SILVA, C.M.; VIEIRA, C. & SEDIYAMA, C.S. Determinação da época adequada de colheita do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com base na qualidade fisiológica das sementes. *sementes*, **1**(1): 12-20, 1975.
- SIMON, E.W. Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytol.*, **73**: 377-420, 1974.

- SIMON, E.W. Membranes in dry and imbibing seeds. In: Crowe, J.H. & Clegg, J.S., ed. *Dry Biological Systems*. Academic Press, New York, 1978. p. 205-24.
- SIMON, E.W. Early events in germination. In: MURRAY, D.R., ed. *Seed physiology: germination and reserve mobilization*. London, Academic, v.2. 1984. p. 77-115.
- SIMON, E.W. & MILLS, L.K. Imbibition, leakage and membranes. *Recent Adv. Phytoch.*, v. 17. 1983. p. 9-27.
- SIMON, E.W. & RAJA HARUN, R.M. Leakage during seed imbibition. *J. Exp. Bot.*, 23: 1076-85, 1972.
- SITTISROUNG, P. Deterioration of rice (*Oryza sativa*) seed in storage, and its influence of field performance. Thesis Ph.D. 1976. Mississippi State University. State College, Mississippi.
- SMITH, A.M. & AGIZA, A.H. The determination of amino-acids colorimetrically by the ninhydrin reaction. *Analyst*, 76: 623-27, 1951.
- SMITH, D.L. Nucleic acid, protein, and starch synthesis in developing cotyledons of *Pisum arvense* L.. *Ann. Bot.*, 37: 795-804, 1973.

- SMITH, H. The photocontrol of seed germination. In: *Phytochrome and photomorphogenesis*. London, Mc Graw-Hill, 1975. p. 121-36.
- SNEDECOR, G.N. *Statistical methods*. Iowa, Iowa State Univ., 1962. 534 p.
- SNEDECOR, G.N. & COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. Iowa, Iowa State University. Press, Ames, 1967, 593 p.
- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics. New York, Mc Graw-Hill, 1980. 633 p.
- ST. ANGELO, A.J. & ORY, R.L. Effects of lipoperoxides on proteins in raw and processed peanuts. *J. Agr. Food Chem.*, 23(2): 141-5, 1975.
- SUN, S.H. & HALL, T.C. Solubility characteristics of globulins from *Phaseolus* seeds in regard to their isolation and characterization. *Agric. Food Chem.*, 23(2): 184-9, 1975.
- SWAIN, R.R. & DEKKER, E.E. Seed germination studies 1. Purification and properties of an alpha - amylase from the cotyledons of germinating peas. *Biochim. Biophys. Acta*, 122: 75-86, 1966a.

- SWAIN, K.R. & DEKKER, E.L. Seed germination studies. II. Pathways for starch degradation in germinating pea seedlings. *Biochim. Biophys. Acta*, 122: 75-86, 1966b.
- TAKAKI, M. Germinação de sementes de *Coffea arabica* L.: efeito do ácido giberélico e da luz contínua sobre a estrutura, composição e metabolismo da semente. Tese de Mestrado. 1979. USP, S.P.
- TAKAYANAGI, K. & MURAKAMI, K. Rapid germinability test with exudates from seed. *Nature*, 218: 495-6, 1968.
- TANAKA, Y., ITO, T. & AKAZAWA, T. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. III. α -amylase isozymes. *Plant Physiol.*, 46: 650-4, 1970.
- TARRAGO, J.F. & NICOLAS, G. Starch degradation in the cotyledons of germinating lentils. *Plant Physiol.*, 58: 618-21, 1976.
- TAYLOR, A.G. & DICKSON, M.H. Seed coat permeability in semi-hard snap bean seeds: its influence on imbibitional chilling injury. *J. Hortic. Sci.*, 62(2): 183-9, 1987.
- THOMAS, C.A. Permeability measurements of castor bean seeds indicative of cold-test performance. *Science*, 131: 1045-50, 1960.

- THOMAS, T.H. Cytokinins, cytokinin-active compounds and seed germination. In: KHAN, A.A., ed. *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. New York, North-Holland Publishing Company, 1977. p. 111-144.
- THRONEBERRY, G.O. & SMITH, F.G. Relation of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability. *Plant Physiol.*, 30: 336-43, 1955.
- TILDEN, R.L. & WEST, S.I. Reversal of the effects of aging in soybean seeds. *Plant Physiol.*, 77: 584-6, 1985.
- TOLEDO, F.F. & MARCOS FILHO, J. *Manual das sementes: tecnologia da produção*. Piracicaba, Agronômica Leres, 1977. 224p.
- TOOLE, V.K. Effects of light, temperature and their interactions on the germination of seeds. *Seed Sci. Technol.*, 1: 339-96, 1973.
- TRIEBOLD, H.O. & AURAND, L.N. Food composition and analysis. New York, Van Nostrand, 1963. 497 p.
- TULLY, R.E., MUSGRAVE, M.E. & LEOPOLD, A.C. The seed coat as a control of imbibitional chilling injury. *Crop Sci.*, 21: 312-7, 1981.

UMBRETT, W.W.; BURRIS, R.H. & STAUFFER, J.F. *Manometric techniques*. 4th ed., Burges Publishing Company, Minneapolis, 1964. 338p.

USBERTI, R. Estudo da germinação de sementes de limão cravo (*Citrus reticulata* var. austera Hib-Swingle): Condições de umidade e armazenamento e relações hormonais. Tese Mestrado. 1979. Universidade Estadual de Campinas.

VALIO, J.F.R. The role of seed coat in early stages of soybean germination. *Biol. Pl.*, 28(4): 258-64, 1986.

VARRER, J.E. & SCHIDLOVSKY, G. Intracellular distribution of proteins in pea cotyledons. *Plant Physiol.*, 38: 139-44, 1963.

VICENT, E.M. & ROBERTS, E.H. The interaction of light, nitrate and alternating temperature in promoting the germination of dormant seeds of common weed species. *Seed Sci. Technol.*, 5: 659-70, 1977.

VIDAL, B.C. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. *Ann. Histochem.*, 15: 289-96, 1970.

VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell. Mol. Biol.*, 22: 45-64, 1977.

- VIDAL, B.C. Métodos em Biologia Celular. In: VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S., ed. *Biologia Celular*. São Paulo, Atheneu, 1987. p. 5-34.
- VIDAL, B.C. & PIMENTEL, E.R. Caracterização bioquímica, topográfica e estrutural dos corpos protéicos do feijão macuco ou jacatupé [*Fachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng]. *Revta. Bras. Bot.*, 8: 223-9, 1985.
- VILIERIS, T.A. Ageing and the longevity of seeds in field conditions. In: HEYDECKER, W., ed. *Seed ecology*. London, Butterworths, 1973. p. 265-88.
- WESSON, G. & WARLING, F.F. The role of light in the germination of naturally occurring populations of buried weed seeds. *J. Exp. Bot.*, 20: 402-13, 1969a.
- WESSON, G. & WARLING, F.F. The induction of light sensitivity in weed seeds by burial. *J. Exp. Bot.*, 20: 414-25, 1969b.
- WETZSTEIN, H.Y. & STERLING, C. Sugar content and phosphorylase activity in stored potatoes. *Z. Pflanzenphysiol.*, 92: 171-5, 1979.
- WHITMORE, F.W. Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus. *Phytochemistry*, 17: 421-5, 1978.

- WILHELM, J. & WILHELNOVA, J.M. Accumulation of lipofuscin-like pigments in chloroplasts from senescent leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Phytosynthetica*, 15: 55-60, 1981.
- WILSON, D.O. & McDONALD, M.E. The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Sci. Technol.*, 14: 269-300, 1986.
- WOODSTOCK, L.W. & GRABE, D.F. Relationships between seed respiration during imbibition and subsequent seedling growth in *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, 42: 1071-6, 1967.
- WOODSTOCK, L.W. & TAO, K.J. Prevention of imbibitional injury in low vigor soybean embryonic axes by osmotic control of water uptake. *Physiol. Plant.*, 51: 133-9, 1981.
- YEMM, E.W. & COCKING, E.W. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 80: 209-13, 1955.
- YEMM, E.W. & WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.*, 57: 508-14, 1954.
- YOMO, H. & SRINIVASEN, K. Protein breakdown and formation of protease in attached and detached cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.*, 52: 671-3, 1973.

YOMU, H. & VARNER, J.E. Control of the formation of amylases and proteases in the cotyledons of germinating peas. *Plant Physiol.*, 51: 708-13, 1973.

YORK JUNIOR, E.T. & COLWELL, W.E. Soil properties, fertilization and maintenance of soil fertility. In: *The National Fertilizer Association*, ed. *The peanut; the unpredictable legume*. Washington, 1951. p. 122-72.

ZINK, E. & ALMEIDA, L.D. Estudos sobre a conservação de sementes de feijoeiro. *Bragantia*, 29(10): 45-50, 1970.

A P P E N D I C E

FIGURA 01

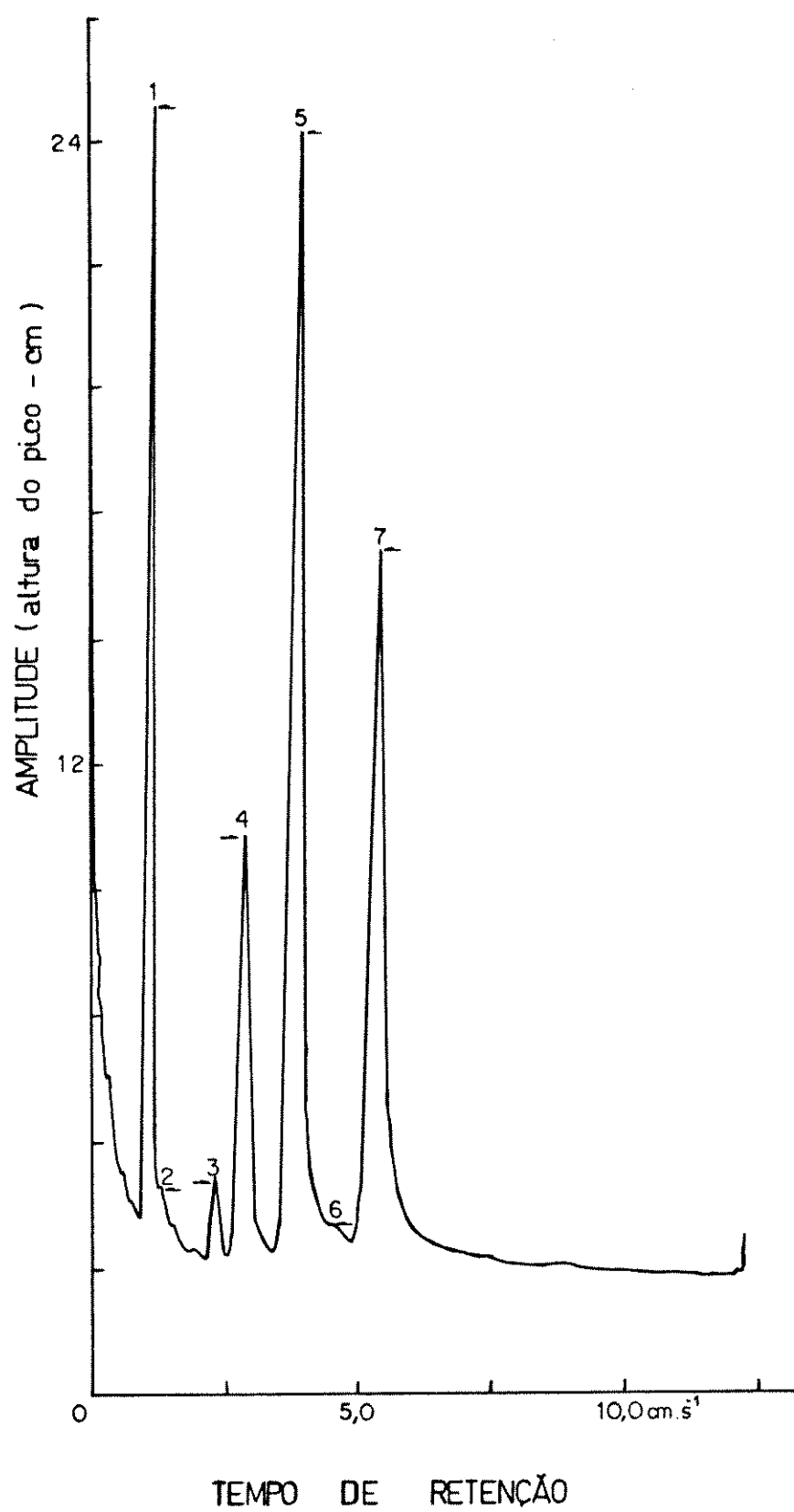


TABELA 1. Dados meteorológicos de Alegre durante o período de condução do trabalho.

T E M P E R A T U R A (°C)													
1983							1984						
	máx	min	média	média	média	média	máx	min	média	média	média	média	média
	abs	abs	máx	min	men	men	abs	abs	máx	máx	min	min	men
janeiro	---	---	---	---	---	---	38,6	19,0	34,2	20,3	20,3	26,3	
fevereiro	---	---	---	---	---	---	35,3	18,4	32,1	20,6	20,6	25,4	
março	---	---	---	---	---	---	35,1	17,9	31,5	20,5	20,5	25,0	
abril	---	---	---	---	---	---	32,8	15,0	28,6	18,9	18,9	22,7	
maio	---	---	---	---	---	---	31,7	13,4	27,5	17,3	17,3	21,3	
junho	---	---	---	---	---	---	33,4	11,1	29,1	15,6	15,6	20,1	
julho	---	---	---	---	---	---	33,7	11,6	28,8	15,2	15,2	19,6	
agosto	36,8	9,2	28,0	14,7	20,2	20,2	35,6	12,0	27,2	15,8	15,8	20,9	
setembro	37,6	14,9	26,0	18,1	21,0	21,0	35,1	12,8	28,4	16,8	16,8	21,2	
outubro	35,0	15,2	28,3	19,0	22,7	22,7	34,9	14,9	29,8	18,5	18,5	22,7	
novembro	33,7	17,7	30,5	20,3	24,4	24,4	34,7	16,6	29,7	19,9	19,9	24,0	
dezembro	35,9	18,2	30,7	20,5	24,5	24,5	35,2	17,4	30,2	20,3	20,3	24,5	

FONTE: Seção de Climatologia Agrícola do CAUFES, Alegre, ES.

TABELA 2. Dados meteorológicos de Alegre durante o período de condução do trabalho.

U N I D A D E R E L A T I V A (%)		
	1983	1984
janeiro	---	64
fevereiro	---	70
março	---	71
abril	---	74
maio	---	74
junho	---	67
julho	---	62
agosto	60	67
setembro	77	62
outubro	73	62
novembro	72	71
dezembro	73	74

FONTE: Seção de Climatologia Agrícola do CAUFES, Alegre, ES.

TABELA 3. Dados meteorológicos de Campinas durante o período de condução do trabalho.

TEMPERATURA (°C)													
1985				1986				1987				1988	
máx	mín	média	média	máx	mín	média	média	máx	mín	média	média	máx	mín
abs	abs	máx	mín	abs	abs	máx	mín	abs	abs	máx	mín	abs	abs
jan	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
fev	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
mar	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
abr	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
maio	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
jun	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
jul	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ago	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
set	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
out	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
nov	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
dez	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
jan	32,8	6,0	27,5	33,6	11,8	25,1	14,6	18,9	33,4	2,8	26,0	12,3	18,2
fev	33,1	12,7	26,8	33,6	11,0	26,7	14,9	19,9	34,4	9,9	25,6	14,4	19,2
mar	34,8	11,5	26,6	34,6	10,8	26,6	16,1	21,5	34,4	12,0	28,7	16,9	22,2
abr	37,8	14,5	26,1	34,2	11,2	29,6	18,3	23,2	33,6	13,8	29,5	18,2	23,2
maio	34,8	14,2	26,1	32,5	15,6	27,7	19,0	22,1	33,2	16,8	29,4	19,3	23,2
jun	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
jul	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ago	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
set	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
out	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
nov	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
dez	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

FONTE: Seção de Climatologia Agrícola do IAC, Campinas, São Paulo

TABELA 4. Balos meteorológicos de Campinas durante o período de condução do trabalho.

UNIDADE RELATIVA (%)													
1965				1966				1967				1968	
max	min	média	média	max	min	média	média	max	min	média	média	média	
abs	abs	max	min	abs	abs	max	min	abs	abs	max	min	abs	
jan	---	---	---	97,3	32,4	91,3	51,6	73,2	99,1	46,5	97,9	63,7	79,7
fev	---	---	---	99,1	40,8	96,2	60,5	79,7	100,0	46,3	89,4	67,4	77,6
mar	---	---	---	97,9	43,0	94,6	66,9	78,7	99,1	38,0	97,6	64,5	74,8
abr	---	---	---	97,2	37,6	89,6	65,3	73,9	96,3	38,5	87,8	62,2	76,6
maio	---	---	---	100,0	36,6	94,4	63,9	79,2	99,0	35,9	95,4	65,1	82,5
jun	---	---	---	97,3	30,0	82,9	51,9	67,5	97,8	27,9	93,6	59,0	76,2
jul	---	---	---	97,7	25,5	87,8	54,9	67,6	96,6	30,2	85,6	55,9	67,9
ago	92,6	22,4	78,8	42,7	63,7	99,0	23,6	98,6	93,6	20,2	95,3	42,6	62,8
set	97,9	25,3	91,1	49,2	65,9	94,1	15,7	83,4	100,0	23,6	95,7	44,4	76,8
out	92,6	12,3	74,3	30,8	60,0	98,1	23,5	93,2	95,9	23,3	85,7	43,7	64,7
nov	98,2	16,6	94,6	32,6	63,3	97,2	32,0	91,2	98,2	19,4	94,5	45,1	68,4
dez	98,1	24,6	89,1	41,0	67,8	99,1	54,2	96,3	98,2	41,7	97,7	52,6	80,5

FONTE: Seção de Climatologia Agrícola do IAC, Campinas, São Paulo.

TABLE 6. Níveis de umidade na semente para estudo do efeito da mudança no teor relativo de água na germinação

condições de	MESES DE ARMAZENAMENTO												
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	
armazenamento 0													
CTU	29,09	31,04	27,20	34,50	35,94	30,43	30,60	31,88	32,00	30,45	28,19	31,88	27,85
AMU	29,09	31,05	24,10	34,50	37,06	31,83	30,33	32,16	32,11	31,13	28,90	30,79	27,53
CFS	8,81	7,12	8,05	6,80	6,02	6,57	5,72	6,12	5,40	5,97	5,68	6,23	5,72
AMS	8,81	7,05	7,90	6,90	5,91	6,39	5,79	6,32	5,39	5,79	5,53	5,97	5,85
CF	13,95	11,33	10,55	11,18	10,91	9,77	8,89	9,42	8,84	8,50	9,08	8,08	7,65
AM	13,95	13,26	13,17	13,83	12,24	10,72	12,09	12,93	11,23	11,93	13,69	9,74	8,73

TABLE 7. Protrusion of radicles of seeds of lot 2 stored under different conditions, for different periods, with different levels of moisture, after 1 day of germination

		PERIODS OF STORAGE															
		3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	CV	MS
CU-14	84,90a	76,77ab	84,90a	77,28ab	79,08ab	76,95ab	79,08ab	72,38ab	72,67ab	68,29ab	66,57a	67,44ab	67,16ab	67,16ab	12,39	7,30	
CU-14	84,90a	82,28a	72,94a	77,28ab	74,18ab	53,53b	52,64b	39,19c	36,83c	29,83c	17,43ac	18,73ac	12,29c	12,71	11,50		
CS-14	72,94b	67,84ab	76,41a	52,22c	56,23bc	49,67c	52,14bc	27,87c	26,54b	47,33b	52,66b	49,68b	45,58b	15,14	12,90		
MS-14	72,94b	68,29ab	51,69b	42,74c	46,73bc	32,37c	26,12ab	14,74c	13,82c	14,93b	15,82c	10,74c	7,72c	16,20	22,30		
CF-14	74,29ab	75,11ab	78,58ab	79,08a	82,28a	62,81bc	68,29c	45,13c	59,44ab	58,15ab	55,42ab	54,11ab	49,67b	10,73	7,10		
AM-14	74,29ab	76,57ab	78,58a	76,66a	76,17a	43,85c	41,52b	18,30c	16,14c	18,73c	16,67c	15,82c	11,62c	14,32	14,90		

NOTE: The means followed by the same letters in horizontal and vertical, are different at the 5% level of probability.

MS

TABLE 8. Protrusão de radícula de sementes do lote 2 estocadas sob diferentes condições, por diferentes períodos, em diferentes níveis de umidade, após 3 dias de semeadura.

	MESES DE ARMAZENAMENTO															MMS	CV
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42		
UFU-34	82,28a	86,98a	82,28a	82,28a	82,28a	84,98a	82,28a	77,28a	74,88a	79,48a	84,98a	77,28a	79,88a	8,10	4,50		
AMU-34	82,28a	82,28a	77,28a	84,98a	84,98a	76,48a	75,11a	59,48a	52,58a	44,48a	48,95a	38,57a	24,42a	11,43	8,20		
CS-34	79,48a	78,58a	84,98a	77,28a	74,88a	71,27a	76,41a	73,18a	66,49a	71,27a	77,28a	75,98a	72,34a	11,17	6,40		
AMS-34	79,48a	84,98a	74,43a	87,22a	58,47a	67,44a	26,84a	26,84a	26,84a	29,41a	24,97a	17,24a	10,32a	14,44	12,99		
CF-34	82,28a	79,48a	84,98a	82,28a	82,28a	78,48a	78,58a	78,58a	73,77a	78,58a	74,28a	75,07a	75,07a	9,48	5,30		
AM-34	82,28a	82,28a	79,88a	79,88a	74,28a	75,48a	49,38a	59,42a	42,74a	44,92a	24,46a	19,82a	14,92a	12,30	9,50		

NOTA: as médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal e maiúsculas na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

dados

TABELA 9. Conteúdo de massa de matéria seca (mg/órgão) em sementes do lote 2, recém-colhidas.

órgãos	massa de matéria seca (mg)
tegumento	14,54
eixo	2,52
cotilédones (2)	128,55
cotilédones + eixo	129,36
semente inteira	148,14

TABELA 10. Conteúdo de massa de matéria seca (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas em camara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas em ambiente natural, por diferentes períodos, sem embeber e após 24 horas de embebição, utilizadas para determinação de proteínas, aminoácidos e açúcares solúveis.

condições de armazenamento	eixos		cotilédones	
	e m b e b i ç ã o (h o r a s)			
	0	24	0	24
24CF2	1,92	2,93	150,69	99,25
24AN2	2,07	2,41	134,47	132,17
48AN1	2,39	2,15	151,32	133,80
32CF2	3,20	2,45	131,62	136,52
32AN2	2,81	2,08	134,26	127,79
56AN1	2,82	1,75	126,22	109,40
33CF2	2,89	3,38	134,36	122,60
33AN2	2,78	3,20	146,60	140,00
57AN1	3,21	2,70	143,92	142,28
34CF2	3,39	2,48	166,80	163,36
34AN2	3,03	2,44	160,32	159,92
58AN1	3,50	2,25	175,86	151,29
36CF2	3,21	3,48	173,60	136,93
36AN2	3,04	2,72	166,44	147,71
60AN1	3,54	2,17	178,53	142,86

TABELA 11. Conteúdo de massa de matéria seca (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocada em camara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas em ambiente natural, por diferentes períodos sem embeber e após 24 horas de embebição, utilizada para determinação de polisacarídeos solúveis em água e amido.

condições de armazenamento	eixos		cotilédones	
	em b e b i ç ã o (h o r a s)			
	0	24	0	24
24CF2	2,34	3,05	136,66	122,63
24AN2	2,30	2,41	142,14	145,41
48AN1	2,56	2,64	151,86	142,28
32CF2	2,46	3,53	145,64	113,98
32AN2	2,72	2,55	135,92	145,32
56AN1	2,47	2,34	140,47	137,06
34CF2	3,24	2,84	165,75	141,72
34AN2	3,06	2,56	152,04	152,57
58AN1	3,46	2,15	174,97	145,53

TABELA 12. Conteúdo de massa de matéria seca (mg/semente) em sementes inteiras do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural, utilizadas para determinação de óleos e índice de peróxidos.

condições de armazenamento	matéria seca/ semente (mg)
24CF2	154,9
24AN2	162,2
48AN1	162,1

TABELA 13. Conteúdo de massa de matéria seca (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas por 34 meses em camara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas por 58 meses em ambiente natural, sem embeber e após 24 horas de embebição, utilizadas para determinação de ácidos graxos e índice de peróxidos.

condições de armazenamento	eixos		cotilédones	
	e m b e b i ç ã o (h o r a s)			
	0	24	0	24
34CF2	2,82	2,86	133,00	135,40
34AN2	2,86	2,20	127,80	127,60
58AN1	2,82	1,84	133,00	107,40

TABELA 14. Conteúdo de matéria seca (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural, sem embeber e após 6, 12, 18 e 24 horas de embebição, utilizadas na determinação de aminoácidos, açúcares solúveis e proteínas.

condições de armazenamento	eixos										cotilédones			
	embebição (horas)													
	0	6	12	18	24	0	6	12	18	24				
24CF2	1,92	2,90	3,00	3,24	2,93	75,34	71,60	67,65	56,58	49,63				
24AN2	2,07	2,86	2,68	2,42	2,41	67,23	76,23	71,55	49,33	66,08				
48AN1	2,39	2,86	2,00	2,28	2,15	75,66	67,31	52,99	75,93	66,90				

TABELA 15. Conteúdo de matéria seca (mg/semente) em eixos e cotilédones de sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural, sem embeber e após 6, 12, 18 e 24 horas de embebição, utilizadas na determinação de polissacarídeos solúveis em água e amido.

condições de armazenamento	cotilédones									
	eixos					embebição (horas)				
	0	6	12	18	24	0	6	12	18	24
24DF2	2,34	2,74	2,76	3,10	3,05	68,33	65,70	61,73	61,10	61,32
24AN2	2,31	2,34	2,70	2,10	2,41	71,07	70,78	72,47	65,81	72,75
48AN1	2,57	2,88	1,94	2,34	2,64	75,93	65,18	60,73	53,99	71,14

TABELA 16. Conteúdo de matéria seca (mg/semente) em sementes recém-colhidas, sementes do lote 2 estocadas por 24 meses em câmara fria e em ambiente natural e sementes do lote 1 estocadas por 48 meses em ambiente natural, após 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos e 1, 4 e 12 horas de embebição, utilizadas na determinação de aminoácidos, carboidratos solúveis em água e efluxo de eletrólitos

condições de armazenamento	e m b e b i ç ã o (t e m p o)								
	5	10	15	20	25	30	1	4	12
24CF2	154,9	146,8	150,2	153,5	155,5	129,1	155,9	149,1	163,7
24AN2	162,2	146,7	151,9	153,2	157,5	153,3	132,3	153,9	139,8
48AN1	162,1	152,7	159,8	156,4	154,3	155,2	161,7	161,2	158,4
N5	147,3	150,5	148,7	149,5	157,5	161,0	155,9	150,9	158,6