



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



# **ALTERAÇÕES METABÓLICAS DURANTE A SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA E DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE AMENDOIM FORRAGEIRO EM ARMAZENAMENTO**

**MARCIA PROVINZANO BRAGA XAVIER**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para  
obtenção do título de Doutor no Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
(Botânica), área de concentração: *Fisiologia  
e Bioquímica Vegetal*.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ALTERAÇÕES METABÓLICAS DURANTE A SU-  
PERAÇÃO DE DORMÊNCIA E DETERIORAÇÃO DE  
SEMENTES DE AMENDOIM FORRAGEIRO EM  
ARMAZENAMENTO

**MARCIA PROVINZANO BRAGA XAVIER**

**PROF. DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO  
ORIENTADOR**

**PROF. DR. WAGNER LUIZ ARAÚJO  
CO-ORIENTADOR**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), área de concentração: *Fisiologia e Bioquímica Vegetal*.

*Ao meu pai Wenceslau Ferreira Braga Netto (in memoriam) e a todos os meus antepassados*

*Pela minha existência e por tudo que sou.*

*À minha querida mãe Alzira Provinzano Braga*

*A quem devo tudo que sou e conquistei. Pela minha vida, pelo exemplo de perseverança, de amor e dedicação incondicional e pelas constantes orações.*

*À minha irmã Marceli Provinzano Braga*

*Minha Grande e Eterna Melhor Amiga, por ter feito de minha vida um grande livro de memórias inesquecíveis. Pelo apoio, carinho, incentivo e pela cumplicidade desde a nossa concepção e em todos os momentos de nossas vidas.*

*Aos meus irmãos Marcus Provinzano Braga e Marcius Provinzano Braga*

*Pela torcida e carinho e por estarem sempre presentes, cuidando da família por nosso querido pai, permitindo que eu seguisse meu caminho longe de casa.*

*Ao meu amor Jorge Konrado Xavier*

*Pelo amor e carinho, pelo apoio e incentivo constante, pela paciência e compreensão e, também, pela participação ativa neste projeto. Obrigada por existir em minha vida e transformar os momentos difíceis dessa jornada, de forma doce e confortante, em enriquecedoras experiências.*

**AGRADEÇO**

**DEDICO**

**&**

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus e ao Mestre Mokiti Okada pela minha vida e saúde, pela permissão e confiança depositada e pela Luz e orientações a mim concedidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos durante todo o período de estudo.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP e à coordenação do PPG-Botânica pela oportunidade de realizar o curso de doutorado. Ao Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, e a Universidade Federal de Viçosa pelo apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio José Barbedo pelas importantes e imprescindíveis orientações nesse trabalho, pelo incentivo e, principalmente, pelo exemplo de profissional e pesquisador.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wagner Luiz Araújo, pelas importantes orientações e apoio na realização deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Acre, em especial à Dra. Giselle Mariano Lessa de Assis, pela cessão de sementes de Amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*), sem as quais este estudo não seria possível, e participação valorosa na elaboração do projeto.

Aos membros da banca de avaliação da qualificação e defesa para obtenção do título de doutor, pelas importantes contribuições para aperfeiçoamento desta tese.

Às Professoras Dra. Silvia Rodrigues Machado e Dra. Carmen Sílvia Fernandes Boaro, pelo incentivo e apoio, mas principalmente, pela confiança depositada em mim; a Profa. Gisela Ferreira pelo carinho e apoio e pelas orientações e convivência.

Aos Professores Dr. João Domingos Rodrigues, Dra. Elisabeth Orika Ono, Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida, Dra. Tatiane Maria Rodrigues, Dra. Elza Maria Guimarães Santos, Dr. Anselmo Nogueira e Dr. Filipe Giardini pelo convívio, orientações e pelo apoio.

À Fundação Mokiti Okada, pelo apoio, e a todos os amigos do Centro de Pesquisa Mokiti Okada e Korin, que, de alguma forma contribuíram para a concretização deste projeto, pelo apoio, carinho e incentivo.

Ao Dr. Luiz Carlos Demattê Filho, Coordenador Geral do Centro de Pesquisa Mokiti Okada, pelo apoio e incentivo.

Aos amigos Sakae Kinjo, Coordenadora do Centro de Pesquisa Mokiti Okada, e Sr. Hiroshi Ota, Coordenador da Secretaria de Agricultura Natural da Fundação Mokiti Okada, pelo carinho, incentivo, estrutura e apoio que permitiram o ingresso e concretização deste doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Botânica, Maria Helena, Kléber, José Eduardo, Auro, Luciana, Heloíza e Inara pela convivência, paciência, presteza e dedicação. Aos funcionários da Pós-graduação Davi, Herivaldo, Luciana e Luciene pelo auxílio e apoio durante o curso.

Aos funcionários do laboratório de solos da FCA da Unesp de Botucatu, em especial a Adriana pelo apoio em análises.

Aos professores, funcionários e amigos do Instituto de Botânica de São Paulo, em especial a Dra. Marina Guardia, Mônica, Débora Molizane, Cibelle, Sandra, Lamarca, João e Roseli, pelo apoio e convivência.

Ao Professor Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei, bem como à sua esposa Professora Mônica Vendrame do Amarante, pelas palavras de força e incentivo sempre que nos encontrávamos.

Aos pós-graduandos do laboratório de Helmintologia Veterinária do IB de Botucatu: Bruna Silva, César Cristiano Bassetto, Michelle Cardoso, Maurício Wilmsen, Zequinha, Nadino Carvalho e Regina Silva que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização deste projeto.

À Auxiliadora Oliveira Martins, doutoranda da UFV – MG, pela valiosíssima ajuda na reta final deste doutoramento e todos os outros amigos do laboratório da UCP.

Ao Prof. Gustavo Habermann e aos funcionários do laboratório da Unesp – Rio Claro, em especial a Silvia, e a doutoranda Otávia, pelo apoio e grande colaboração.

À Profa. Ivna Fuchigami pelo apoio, carinho e auxílio na confecção do *Abstract*.

Aos amigos da Botânica, Felipe Giroto, Luis Paulo, Camila Braga, Juliana Iassia, Danilo, Amanda, Katiane, Samanta, Angélica, Ângelo, Bruno, Camila Zanetti, Douglas, Fábio Bósio, Clarissa, Hiuliana, Maria Ivanilde, Jaqueline, Maria Izabela, Jennifer, Juliana de Fazio, Patrícia França, Luiz Ricardo, Natália Totti, Sérgio ('thunder'), Talita Amador, Sabrina, Simone e Yve Canavese, pela amizade, convívio e apoio durante este período e em todos os momentos que precisei. Em especial ao amigo Daniel pela paciência e muita boa vontade em me atender sempre que precisei de sua ajuda e por toda a estatística rodada.

Ao Min. Newton Minoru Oyama, à sua esposa Rejane e filho Guilherme, assim como toda sua especial família, pela acolhida, apoio, orientações, carinho e incentivo.

Aos amigos do Johrei Center Botucatu pela convivência e carinho e, em especial, aos que contribuíram para este doutorado, Sílvia pelo apoio e incentivo, a Dorigatti e Terezinha Nogueira pelo apoio e por me receberem em sua casa com tanto carinho e presteza. A mãezona e amiga Cida Bello, que me recebeu em sua casa por tantas vezes e com tanto carinho, dedicação e presteza, pela companhia, cuidado e boas risadas.

## Sumário

RESUMO . . . . .	viii
ABSTRACT . . . . .	x
I. INTRODUÇÃO . . . . .	1
II. REVISÃO DE LITERATURA . . . . .	4
II.1. O gênero <i>Arachis</i> L. e a espécie <i>Arachis pintoi</i> Krapov. & W. C. Greg. (amendoim forrageiro) . . . . .	4
II.2. Dormência em <i>Arachis hypogaea</i> L. e <i>Arachis pintoi</i> Krapov. & W. C. Greg. . . . .	7
II.2.1. Germinação e dormência . . . . .	7
II.2.2. Etileno . . . . .	9
II.2.3. Tratamentos para superação de dormência em <i>Arachis hypogaea</i> L. e <i>Arachis pintoi</i> Krapov. & W. C. Greg . . . . .	17
II.3. Deterioração de sementes . . . . .	18
II.3.1. Deterioração em sementes de <i>Arachis pintoi</i> Krapov. & W. C. Greg . . . . .	22
III. CAPÍTULO ÚNICO . . . . .	23
RESUMO . . . . .	23
INTRODUÇÃO . . . . .	25
MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	28
RESULTADOS . . . . .	33
DISCUSSÃO . . . . .	48
CONCLUSÕES . . . . .	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	55
DADOS COMPLEMENTARES . . . . .	63
IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS . . . . .	65
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	66

BRAGA-XAVIER, M.P. **ALTERAÇÕES METABÓLICAS DURANTE A SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA E DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE AMENDOIM FORRAGEIRO EM ARMAZENAMENTO.** 2015. 82P. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**RESUMO** - Sementes de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg.), leguminosa amplamente utilizada como forrageira, no paisagismo e proteção do solo, apresentam dormência fisiológica pós-colheita e baixa longevidade. Não obstante, a superação ocorre de forma natural ao longo do armazenamento e tratamentos químicos ou físicos da dormência, frequentemente, aceleram a deterioração das sementes. Resultados promissores têm sido obtidos com a aplicação exógena de etileno. Neste contexto, investigaram-se como a superação da dormência mediada pela presença de etileno, ou não, afeta as ultraestruturas, o potencial fisiológico e a atividade respiratória de sementes de amendoim forrageiro durante o armazenamento. Sementes recém-colhidas foram divididas em dois grupos, um dos quais foi tratado com ethephon. Em seguida, as sementes foram submetidas às avaliações de grau de umidade (base úmida), germinação, emergência de plântulas, lixiviação de potássio, tetrazólio, respiração e morfologia de células e mitocôndrias, além da quantificação de peróxido de hidrogênio, malonaldeído, carboidratos, proteínas e aminoácido. As sementes foram armazenadas em condições ambientais não controladas até 26 meses, com avaliações periódicas durante o armazenamento. Os resultados obtidos indicam que a superação da dormência pode acelerar a deterioração de sementes de amendoim forrageiro. No entanto, nas condições de ambiente de armazenamento empregadas, verificaram-se que alterações ultraestruturais das mitocôndrias, ocasionadas pela deterioração, se iniciam aos dois meses, muito antes da superação da dormência. Igualmente, alterações na permeabilidade seletiva das membranas e efeitos nos tecidos das sementes concorrem para a redução do número de plântulas normais, já visíveis no teste de germinação a partir do 6º mês. Mais ainda, alterações mensuráveis de carboidratos, aminoácidos, proteínas e respiração, acompanhadas de aumento na peroxidação lipídica, foram verificadas a partir do 8º e 10º mês de armazenamento, quando as sementes, principalmente, as tratadas com etileno, perderam a capacidade de produzir plântulas normais nas condições do teste de germinação. Processos oxidativos podem determinar a baixa longevidade dessas sementes e a dormência não garante o aumento do seu potencial de armazenamento. Em síntese, os resultados obtidos demonstram que a superação da dormência, embora ocorra lentamente, acelera a deterioração das sementes



de *A. pintoii*, processo mediado, possivelmente, por alterações nas mitocôndrias e na atividade respiratória. Cabe mencionar, também, que o etileno antecipa a superação da dormência dessas sementes, no entanto, acelera a deterioração das mesmas durante o armazenamento. Em uma perspectiva aplicada, durante o armazenamento de sementes de *A. pintoii* em ambiente não controlado, o tratamento com ethephon só deve ser empregado caso seja possível à semeadura imediata.

**Palavras-chave:** *Arachis pintoii*, etileno, respiração, mitocôndrias, metabolismo, oxidação

BRAGA-XAVIER, M.P. **METABOLIC CHANGES DURING DORMANCY BREAKAGE AND DETERIORATION OF FORAGE PEANUT SEEDS DURING STORAGE.** 2015. 82P. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**ABSTRACT** - Forage peanut seeds (*Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg.), a widely used legume as forage in landscape and soil protection, show physiological dormancy and low longevity after harvest. Nevertheless, chemical or physical breakage of dormancy frequently accelerates seed deterioration. Successful results have been obtained upon exogenous application of ethylene. In this context, it has been investigated how dormancy breakage mediated by ethylene affects, or not, ultra-structures, physiological potential and respiratory activity of forage peanut during storage. Recently harvested seeds were divided into two groups, and one of them was treated with ethylene. Next, the seeds were submitted to moisture content assessments (wet basis), germination, seedling emergence, potassium leaching, tetrazolium, respiration and cell and mitochondria morphology, besides the quantification of hydrogen peroxide, malonaldehyde, carbohydrate, protein and amino acid. The seeds were stored in natural environment up to 26 months. Assessments were performed periodically. The results show that dormancy breakage can accelerate deterioration of forage peanut. However, it was observed that under uncontrolled conditions of storage environment, ultra-structural alterations of mitochondria, caused by deterioration, start long before the total dormancy breakage in the second month. Likewise, alterations in the selective permeability of membranes and effects on the seed tissues help reduce the number of normal seedlings already visible from the sixth month on. Moreover, measurable alterations of carbohydrate, amino acids, proteins, respiration and lipid peroxidation were verified from the 8th and the 10th month of storage, when seeds, mainly those treated with ethylene, lost their capacity to produce normal seedlings. Oxidative processes can determine low longevity of those seeds, and dormancy does not represent an evolutionary tool in order to enhance their storing potential. Briefly, the results show that breakage of dormancy, although it occurs tardily, accelerates seed deterioration of *A. pintoi*, process possibly mediated by mitochondria and respiratory activity alterations. It is worth mentioning also that exogenous ethylene anticipates seed dormancy breakage. However, it accelerates the deterioration of those seeds during storage. In an applied perspective, during *A. pintoi* seed storage in a non-controlled environment, ethylene treatment can only be applied if possible the immediate sowing.

**Keywords:** *Arachis pintoii*, ethylene, respiration, mitochondria, metabolism, oxidation.

## I. INTRODUÇÃO GERAL

O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg.), espécie herbácea perene da família das Fabaceae, é originário do Brasil (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994) e pode ser plantado em diferentes ambientes (AMATO et al., 2007). É recomendada para forragem, pois produz um considerável volume de massa seca (RIVAS; HOLMAN, 2000; OLIVEIRA, 2002), mas também pode ser utilizada na recuperação de pastagens degradadas, cobertura do solo em culturas perenes e paisagismo (RIVAS; HOLMAN, 2000; OLIVEIRA, 2002; ESPINDOLA et al., 2006), além de possuir características importantes para a recuperação e adubação do solo (DUDA et al., 2003), principalmente, em relação ao nitrogênio, em função da habilidade característica das leguminosas na sua fixação biológica.

O estabelecimento da cultura pode ser feito tanto por estolões, como por diásporos (VALENTIM et al., 2003, 2009). Contudo, embora as sementes, com ou sem pericarpo, apresentem a vantagem da resistência ao transporte e armazenamento em relação aos estolões, o elevado nível de dormência logo após a colheita (60-80%) pode limitar o seu uso, pois pode durar de seis a oito meses durante o armazenamento e, em alguns cultivares, as sementes perdem a viabilidade após 10 meses de armazenamento, em função da rápida deterioração (FERGUSON, 1994). No entanto, nada se conhece sobre a causa da sua dormência ou sobre a razão de tão baixa longevidade.

Em *A. hypogaea*, o principal causador da dormência é o ácido abscísico (ABA) (KETRING; MORGAN, 1969). Para este caso, dentre outras recomendações de tratamento, a aplicação de etileno destacou-se na superação da sua dormência (KETRING; MORGAN, 1969, 1972; KEPCZYNSKI; KEPCZYNSKA, 1997; ISSA et al., 2010). Neste sentido, o etileno pode atuar neutralizando tanto a síntese quanto a sinalização do ABA (CORBINEAU et al., 2014), induzir o enfraquecimento e a ruptura da cobertura do endosperma em espécies albuminosas, assim como, induzir o crescimento radicular (LINKIES et al., 2009). O etileno pode, também, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no eixo embrionário e estas, por sua vez, alteram as vias de transcrição de sinais do ABA, impedindo, assim, o seu efeito inibitório sobre a germinação de sementes (EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2015). Porém, pouco se conhece sobre seu efeito na dormência e no potencial fisiológico de sementes de amendoim forrageiro, embora alguns testes já demonstrem boas perspectivas (ASSIS et al., 2013a, b). Em geral, as pesquisas sobre tratamentos para superação de dormência de sementes de *A. pintoi* são escassas. O pouco que se tem registrado foram testes de exposição ao calor, seco ou úmido, e de remoção do pericarpo, ambos com redução da

dormência, mas com alguns efeitos danosos às sementes (FERGUSON, 1994; COSTA; ROSSETTO, 2008; ROSSETTO; ALVES, 2008).

Deste modo, os tratamentos para a superação da dormência das sementes desta espécie, quando eficientes nos seus objetivos, podem, muitas vezes, acelerar a sua deterioração além do que já ocorre naturalmente. Todavia, a perda da capacidade de germinar é o último efeito visível da deterioração da semente (DELOUCHE, 1963). Outros danos anteriores, de caráter ultraestrutural e bioquímico, não são percebidos pelo teste de germinação. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), radicais livres (RL) e outros compostos tóxicos contribui para os primeiros eventos na deterioração das sementes (WALTERS et al., 2010), como a peroxidação lipídica com danificação das membranas celulares, do DNA e de outros constituintes celulares (GARCIA et al., 2006), além de subsequentes danos às mitocôndrias, ao processo respiratório e à integridade dos tecidos (ABDUL-BAKI, 1980; BENAMAR et al., 2003; MENDES et al., 2009).

Em síntese, embora não seja desejável do ponto de vista produtivo, na natureza, a dormência é vista como uma forma de preservação das espécies, pois permite a dispersão em épocas diferentes e a germinação em condições ambientais mais favoráveis, visto que, conforme o processo evolutivo, a dormência assumiu o papel de garantir maior potencial de armazenamento (BARBEDO et al., 2013). Os autores esclarecem, ainda, que, normalmente, o alto grau de dormência fisiológica permite que a semente prossiga mais tempo ligada a planta, aprofundando o processo de maturação, sem correr o risco de viviparidade e que, quanto mais avançado este processo, maior a longevidade. Por outro lado, normalmente, as sementes intolerantes à dessecação são dispersas com baixo grau de maturação e, para isso, não possuem nenhum tipo de inibição da germinação, garantindo, dessa forma, a germinação nas condições adequadas do ambiente, justificando, assim, a sua baixa longevidade (BARBEDO et al., 2013). Ou seja, de uma maneira ou de outra, o processo evolutivo busca uma interação positiva das espécies com os mais diversos ecossistemas em que elas se desenvolvem, sempre buscando ferramentas, ou especializações, que garantam a perpetuação de cada espécie e o grau de dormência pode ser considerado como uma dessas especializações (BARBEDO et al., 2013). No entanto, em *A. pintoii*, nenhuma dessas vantagens é atendida, pois o período entre a perda desejável da dormência e a manifestação fisiológica da deterioração, com a queda do vigor e a perda da viabilidade é extremamente curto, cerca de dois a três meses. Assim, a dormência não garante maior longevidade e, conseqüentemente, não garante o estabelecimento da nova planta, sobretudo, da sua distribuição no espaço e no tempo, indo na contra mão da evolução da maioria das espécies.

Assim, desvendar as alterações metabólicas que ocorrem durante o período de perda gradativa de dormência e a passagem de sementes dormentes para deterioradas, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos. Especialmente, o estudo destas alterações em sementes de uma espécie que os manifesta em um curto período, contribui também para o conhecimento de fenômenos até então pouco explorados, porém de suma importância para o avanço nas pesquisas em fisiologia de sementes, não somente desta, como também de diversas outras espécies, além de oferecer subsídios para o estudo de processos evolutivos alternativos.

Deste modo, a avaliação da redução ou perda da permeabilidade seletiva das membranas celulares, que leva à liberação de açúcares e outras substâncias necessárias à própria respiração e outros eventos, pode refletir o efeito progressivo da deterioração sobre a integridade dessas membranas. Este efeito progressivo da deterioração também pode ser acompanhado e melhor elucidado pela análise de ultraestruturas e de metabólitos e nucleotídeos envolvidos no metabolismo mitocondrial, juntamente com a determinação do consumo de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub> (BAILLY, 2004). Da mesma forma, a quantificação de reservas nutricionais, de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que é uma das espécies mais reativas de oxigênio e principal causador da peroxidação lipídica, além de malonaldeído (MDA), produto considerado como um bom indicador deste processo, podem complementar a linha de raciocínio (KIBINZA et al., 2006; SHABAN, 2013). Salienta-se, também, que as alterações acima citadas podem ser acompanhadas, em um estágio mais avançado da deterioração, pela verificação visual do comprometimento da vitalidade dos tecidos do embrião, com reflexos diretos no potencial fisiológico (germinação e vigor) das sementes e qualidade das plântulas de *A. pintoi*.

Nestes termos, buscaram-se avaliar os efeitos da superação da dormência sobre o potencial fisiológico e o metabolismo respiratório de sementes de *Arachis pintoi* durante o período de armazenamento, bem como alterações nas ultraestruturas, na permeabilidade seletiva das membranas celulares e na vitalidade dos tecidos do embrião, em sementes tratadas ou não-tratadas com ethephon.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### II.1. O gênero *Arachis* L. e a espécie *Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg. (amendoim forrageiro)

O gênero *Arachis* L., da família das Fabaceae, é nativo da América do Sul e ocorre naturalmente em cinco países com diferentes condições edafo-climáticas (Brasil, Paraguai, Bolívia, Argentina e Uruguai), distribuindo-se do nordeste do Brasil, passando pela região central, às cordilheiras dos Andes; abrangendo desde regiões tropicais e sub-tropicais às temperadas (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). O gênero é composto de 80 espécies, distribuídas em nove seções, conforme o grau de poliploidia, semelhança com o gênero *Stylosanthes*, que é o mais próximo de *Arachis*, e a distribuição geográfica (e.g. mais próximo dos Andes ou mais a leste do continente), sendo as seções: *Trierectoides*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Triseminatae*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae* e *Arachis*, que é a maior do gênero (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; VALLS; SIMPSON, 2005; LAVIA et al., 2009). Revisões taxonômicas vêm sendo realizadas, constantemente, assim como a atualização de métodos de classificação, incluindo dados moleculares e bioquímicos, considerando-se, principalmente, a importância do amendoim comercial (BECHARA et al., 2010).

O Brasil é o único país que reúne todas as seções e apresenta a maior parte das espécies, 54, sendo 38 endêmicas (FERGUSON et al., 2005). A seção *Arachis* é a mais derivada e a única que ocorre nos cinco países, abrigando a espécie mais domesticada e estudada do gênero, *A. hypogaea* L., de alto valor econômico. Por outro lado, a seção *Trierectoides* abriga a espécie *A. guaranítica*, considerada como a mais primitiva (GREGORY et al., 1980) e diferenciada do gênero (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). A espécie ocorre naturalmente na serra de Amambai, entre Mato Grosso do Sul e Paraguai, local considerado como o centro de origem do gênero (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; VALLS; SIMPSON, 2005; LAVIA et al., 2009), sugerindo grande afinidade e adaptação das espécies do gênero, das mais derivadas às mais primitivas, às condições edafo-climáticas do país.

A espécie Tipo do gênero, que o descreve, é *A. hypogaea* L. (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994) e a característica morfológica mais significativa é a produção de frutos subterrâneos (geocarpia). Vale mencionar, também, que as plantas são autóгамas, preferencialmente, e apresentam ciclo de vida perene, em sua grande maioria, com exceção da

seção *Heteranthae* e de algumas espécies do gênero *Arachis*, que possuem plantas anuais (VALLS; SIMPSON, 2005). Quanto à dispersão das sementes, a característica geocárpica gera algumas limitações, assim, a dispersão fluvial torna-se bastante relevante e eficiente, inclusive, justificando a proximidade dos materiais encontrados ao longo dos rios (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994).

Outra seção do gênero que se destaca pelo potencial econômico e forrageiro é a *Caulorrhizae* Krapov. & W.C. Gregory, que é composta por duas espécies silvestres de alto potencial forrageiro, *Arachis repens* Handro e *Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Gregory, e foi descrita em 1994, apresentando distribuição geográfica entre os estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). Conforme as descrições dos autores, as duas espécies apresentam estolões e têm como principais diferenças morfológicas entre elas a presença de cerdas em toda parte vegetativa e o formato menos comprido e mais largo do folíolo em *A. pintoii*, espécie mais difundida e estudada da seção.

O centro de origem de *A. pintoii* é a foz do rio Jequitinhonha (areais), próximo à costa atlântica, no município de Belmonte/BA (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). De lá, os primeiros acessos foram coletados pelos professores Geraldo C. P. Pinto e Paulo D.T. Alvim em abril de 1954 e levados ao Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuária do Leste (IPEAL), atual Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em Cruz das Almas/BA, para serem cultivados e colecionados por Geraldo C. P. Pinto (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). Seu holótipo encontra-se no herbário (CEN) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e foi registrado por Gregory & Krapovickas em 1967 com o nome dado em homenagem ao seu colecionador (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994).

*A. pintoii* apresenta ampla utilização e adaptação (FERGUSON, 1994), desde as regiões mais próximas ao nível do mar até às de maior altitude, como a 1800 m (VALLS et al., 1994); tanto em áreas mais secas, como nas de encharcamento temporário ou de geadas (MIRANDA et al., 2008); áreas de sombreamento ou a pleno sol; em solos mais argilosos a arenosos (FERGUSON, 1994). A espécie também demonstra considerável resistência ao pisoteio dos animais em pastejo e ao fogo, devido aos pontos de crescimento vegetativo ficarem bem protegidos (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; VALLS, SIMPSON, 2005). Por suas características e facilidades adaptativas, *A. pintoii* pode ser cultivado em diferentes ambientes (AMATO et al., 2007), sendo recomendado como forrageira, na recuperação de pastagens degradadas, como cobertura do solo em culturas perenes e no paisagismo (ESPINDOLA et al., 2006), além de possuir características importantes para a recuperação do solo e fixação biológica de nitrogênio (DUDA et al., 2003).



*A. pintoi* apresenta hábito indeterminado de floração e frutificação. Seu fruto é uma vagem indeiscente que, normalmente, apresenta apenas uma semente (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). Para que o desenvolvimento deste fruto ocorra, após a fecundação do óvulo, a planta desenvolve uma estrutura chamada “peg”, que é similar ao ginóforo, porém, apresenta geotropismo positivo e imediatamente se direciona ao solo empurrando o ovário (CONAGIN, 1955; KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). Embora apresente a mesma função de sustentar o ovário como um pedúnculo, o “peg” difere do ginóforo porque se desenvolve a partir de tecidos meristemáticos da base do próprio ovário e o nome foi dado por agricultores americanos por apresentar uma ponta que auxilia na perfuração do solo, similar a um objeto perfurante (CONAGIN, 1955). Segundo os autores, somente após penetrar alguns centímetros no solo é que ocorre o desenvolvimento do fruto e das sementes e se, por algum motivo, a penetração do ovário não ocorre, não há desenvolvimento do fruto.

O estabelecimento da cultura pode ser feito tanto por propagação vegetativa, estolões (VALENTIM et al., 2003, 2009), como por diásporos, sementes com ou sem pericarpo, ainda que, em ambos os casos o desenvolvimento seja lento (WUNSCHER et al., 2004), constituindo uma limitação na competição com plantas espontâneas. Mas, ainda assim, as sementes apresentam diversas vantagens em relação aos estolões, como maior resistência e menor volume para o transporte e armazenamento. As maiores dificuldades na sua adoção são a dificuldade de produção, elevado custo das sementes e alto nível de dormência (60-80%), após a colheita (FERGUSON, 1994; ROSSETTO; ALVES, 2008). Segundo os autores, esta dormência pode durar de seis a oito meses durante o armazenamento, constituindo um grande problema para a cultura, pois as sementes da maioria das cultivares perdem a viabilidade após 10 meses de armazenamento, em função de sua baixa longevidade.

No entanto, em função da importância da espécie e de seu amplo leque de utilização, esforços para sanar as dificuldades apresentadas tornam-se justificáveis, desde o melhoramento genético até o aprimoramento de tecnologias de produção e preservação da semente. Assim, a EMBRAPA desenvolveu a cv. Mandobi, registrada em 2008, como nova opção para os produtores tropicais que desejem introduzir, por meio de sementes com menor custo, uma leguminosa forrageira de alto rendimento e de alta qualidade em seus sistemas de produção, além de ser excelente opção para a recuperação de pastagens degradadas na Amazônia, sobretudo em solos impermeáveis (ASSIS et al., 2013c). Mais ainda, estudos para ampliar o conhecimento sobre a fisiologia de suas sementes, visando a desenvolver técnicas que possam dirimir a forte dormência pós-colheita e ampliar a longevidade vêm sendo

realizados (FERGUSON, 1994; COSTA; ROSSETTO, 2008; ROSSETTO; ALVES, 2008; ASSIS et al., 2013a, b), porém, ainda com muita carência de informações neste aspecto.

## **II.2. Dormência em *Arachis hypogaea* L. e *Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg**

### **II.2.1. Germinação e dormência**

Baseado em alguns conceitos destacados por Marcos Filho (2005), pode-se considerar que a germinação de sementes é um processo que envolve uma sequência de eventos metabólicos desencadeados no embrião embebido em vias da ruptura do tegumento para a protrusão da raiz e formação de uma plântula. De todo ciclo de vida da planta, este processo inicial, que é a germinação, pode ser considerado como o mais crítico e decisivo, podendo ou não originar uma plântula normal a fim de garantir a continuidade da espécie, em função da maior vulnerabilidade aos diversos tipos de estresses hídricos e ambientais, bem como aos patógenos, às pragas e às injúrias mecânicas (RAJJOU, 2012). No entanto, até atingir o estágio de embrião apto a se transformar em uma plântula normal, uma série de etapas ocorre, desde a fertilização do óvulo até a independência da semente em relação à planta. Ao final deste processo de desenvolvimento e maturação, ou próximo dele, o metabolismo reduz consideravelmente, o crescimento do embrião paralisa e as sementes de algumas espécies mais tolerantes à dessecação entram em “repouso” ou em estado de “quiescência” (MARCOS FILHO, 2005). Assim que as sementes são reidratadas e as condições ambientais são favoráveis, as sementes que são viáveis e vigorosas reiniciam o crescimento e germinam, porém, as sementes de determinadas espécies ou cultivares podem não completar o processo de germinação de imediato, por se encontrarem em estado de dormência (HILHORST, 1995; BEWLEY, 1997; MARCOS FILHO, 2005; PAULSEN et al., 2013). Este estado pode ser determinado por mecanismos que bloqueiam a germinação e que foram desencadeados durante o processo de maturação, ou imediatamente após a sua dispersão, em função de sua herança genética associada com condições específicas do ambiente em que as sementes foram expostas (MARCOS FILHO, 2005).

A dormência pode ser do tipo primária, quando as sementes já são liberadas da planta dormentes, ou secundária, quando normalmente a semente ainda não está dormente no momento em que é desligada da planta, embora o mecanismo de disparo já esteja instalado (MARCOS FILHO, 2005). Neste último caso, o autor esclarece que a dormência pode se

manifestar sem a semente ter sido previamente dormente, ou após a superação de uma dormência primária, e é desencadeada em resposta a condições específicas do ambiente. Sobretudo, a dormência é uma propriedade intrínseca à semente e possui diversas causas: de natureza física, fisiológica, morfológica ou a combinação delas. Neste sentido, várias propostas de classificação surgiram com o propósito de organizar as informações e facilitar as pesquisas que vislumbravam compreender este fenômeno em sementes de diversas espécies e apontar caminhos para a superação da dormência, principalmente, de espécies de interesse comercial (AMEN, 1968; BEWLEY, 1997). Uma nova proposta de classificação sugeriu três camadas hierárquicas (classe, nível e tipo), sendo cinco classes de dormência: dormência fisiológica (PD), dormência morfológica (MD), dormência morfofisiológica (MPD), dormência física (PY) e dormência combinada (PY + DP). Estas classes podem, assim, ser subdivididas, ou não, em níveis e tipos (BASKIN; BASKIN, 2004). Mais recentemente, Willis et al. (2014) propuseram um novo arranjo dessas mesmas classes de dormência, sugerindo que a classificação deve basear-se no estado de desenvolvimento do embrião no momento da dispersão das sementes, assim como nas características físicas e respostas fisiológicas das sementes a estímulos ambientais.

Independentemente do sistema de classificação adotado pelos estudiosos do assunto, a dormência pode ser considerada como um mecanismo encontrado pela natureza para reduzir a vulnerabilidade das plântulas e oferecer maior garantia da continuidade do ciclo de vida da planta e perpetuação da espécie (HILHORST, 1995; BEWLEY, 1997; FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006), além de garantir maior longevidade às sementes (MARCOS FILHO, 2005; BARBEDO et al., 2013). Para se determinar a técnica mais adequada para a superação da dormência, com o mínimo prejuízo ao vigor e à longevidade, é necessário um estudo aprofundado sobre o tema para cada espécie, pois suas causas e sua profundidade podem ser variadas e atuarem combinadamente. Dentre as causas fisiológicas da dormência, o desequilíbrio entre substâncias promotoras e inibidoras da germinação é o mais comum e significativo, e os hormônios vegetais são os mais importantes, principalmente, ABA e giberelinas (BEWLEY, 1997). Os hormônios são substâncias endógenas, produtos do metabolismo secundário, que atuam em baixa concentração como sinalizadores químicos na promoção ou inibição de diversos eventos fisiológicos nas plantas. Diferentemente dos animais, os hormônios vegetais não são produzidos em glândulas, mas, sim, nos diversos tecidos da planta, podendo atuar no próprio local de sua síntese ou em outros, e serem transportados via xilema ou floema, a favor ou contra o gradiente de concentração (BEWLEY, 1997). Os hormônios vegetais atuam segundo a curva dose-efeito, onde existe um

pico de ótima concentração e, acima deste, o próprio hormônio pode atuar inibindo ou modificando a resposta, variando, inclusive, com o órgão da planta e o efeito fisiológico.

Dos principais efeitos fisiológicos controlados pela atuação dos hormônios, além da germinação e dormência, pode-se citar o crescimento vegetal, fotossíntese, proteção das plantas, dominância apical, abscisão dos órgãos, senescência, expressão sexual e muitos outros. Com relação à germinação e dormência, vários hormônios desempenham funções importantes, como inibidores, ácido abscísico (ABA), ou promotores da germinação, incluindo as giberelinas (GAs), principal promotor, além do etileno, auxinas, citocininas, brassinosteróides e outros (SUBBIAH-REDDY, 2010; ARC et al., 2013, MIRANSARI; SMITH, 2014).

Em *A. hypogaea*, a principal causa da dormência de suas sementes é fisiológica e consiste no equilíbrio entre ABA e etileno (KETRING; MORGAN, 1969). Em *A. pintoi*, ainda não foi confirmada a causa da dormência, mas o tratamento com etileno apresentou resultados satisfatórios na sua superação (ASSIS et al., 2013a, b), sugerindo semelhança no mecanismo fisiológico relacionado à dormência de ambas as espécies. Vale destacar, ainda, que em muitas dessas espécies em que a dormência é superada pelo etileno, endógeno ou exógeno, ou mesmo por ACC, precursor direto do etileno, a aplicação de giberelinas também pode aumentar a germinação de suas sementes (ESASHI et al., 1976; SINSKA, 1989; OGAWA et al., 2003; LEWAK, 2011; KEPCZYNSKI; SZNIGIR, 2014). Contudo, em *A. hypogaea*, a giberelina não promoveu efeito na superação da dormência (KETRING; MORGAN, 1969).

### **II.2.2. Etileno**

O etileno é um hidrocarboneto ( $C_2H_4$ ) gasoso e possui estrutura bioquímica mais simples dos hormônios vegetais (MIRANSARI; SMITH, 2014). No entanto, participa ativamente de diversos processos e atividades importantes do ciclo de vida das plantas (ARTECA; ARTECA, 2008), de forma fortemente integrada com outras substâncias endógenas e com o meio ambiente, além de suas reações serem específicas para cada espécie (DUGARDEYN et al., 2008). Dentre os diversos efeitos e processos, incluindo germinação e dormência, já citadas anteriormente, alguns dos mais importantes são:

- 1) Crescimento de plantas (YOO et al., 2009 ; MUDAY et al., 2012; ARC et al., 2013), como modulador, ora inibindo, ora estimulando (DUGARDEYN et al., 2008);
- 2) Divisão, expansão e diferenciação celular. O etileno pode promover efeitos positivos ou negativos e pode, inclusive, alterar o destino celular e aumentar a propensão das células para a divisão e expansão (APELBAUM et al., 1972; KAZAMA et al., 2004);
- 3) Amadurecimento de frutos (BENNETT; LABAVITCH, 2008; CARA; GIOVANNONI, 2008; EZURA; OWINO, 2008; PECH et al., 2008; YOO et al., 2009; MUDAY et al., 2012; ARC et al., 2013);
- 4) Florescimento (LI, 2008; YOO et al., 2009; MUDAY et al., 2012; ARC et al., 2013);
- 5) Expressão sexual das flores, e.g., predominância de flores femininas em cucurbitáceas (MANZANO, et al., 2014);
- 6) Senescência (CHEN et al., 2008; YOO et al., 2009 ; MUDAY et al., 2012; ARC et al., 2013);
- 7) Abscisão de órgãos (YOO et al., 2009; MUDAY et al., 2012; ARC et al., 2013)
- 8) Epinastia da folha (STEWART; FREEBAIRN, 1969; URSIN; BRADFORD, 1989);
- 9) Indução de enraizamento e formação de pelos radiculares, através da interação com auxina, de forma direta ou indireta (TANIMOTO et al., 1995; CLARK et al., 1999; PETRUZZELLI et al., 2003; PACURAR et al., 2014), inclusive nos casos em que o desenvolvimento radicular é inibido por outros fatores, como a deficiência de boro (CAMACHO-CRISTÓBAL et al., 2015) e potássio (JUNG et al., 2009);
- 10) Resposta das plantas a vários tipos de estresses, incluindo déficit hídrico (APELBAUM; YANG, 1981), salinidade (ZAPATA et al., 2004; SILVA et al., 2014), altas temperaturas (KAWAKAMI et al., 2013), patógenos (ZHU et al., 2014) e outros.

O etileno é biossintetizado em todos os órgãos, assim como nas sementes, a partir do aminoácido metionina (Met), que é convertido a S-adenosilmetionina (SAM ou S-AdoMet) pela ação da enzima S-AdoMet-sintetase (ou SAM-sintetase), na presença de ATP e, em seguida, SAM é convertido a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela ação de

outra importante enzima, ACC-sintase (ACS), seguido pela oxidação de ACC em etileno pela ação da última e, igualmente importante, enzima da rota biossintética, ACC-oxidase (ACO) (YANG; HOFFMAN, 1984; MIYAZAKI; YANG, 1987a, b; KENDE, 1993; ARGUESO et al., 2007; CORBINEAU et al., 2014). Vale destacar, também, que a oxidação de ACC é dependente de O<sub>2</sub> e, além do etileno, gera CO<sub>2</sub>, HCN e H<sub>2</sub>O (YANG; HOFFMAN, 1984). Inclusive, em sementes, esta última enzima (ACO) desempenha papel fundamental na regulação da biosíntese de etileno e germinação das sementes, principalmente, em resposta a condições adversas do ambiente (MATILLA-VAZQUEZ, 2008). Assim, ao invés de oxidar ACC a etileno, pode permitir o seu acúmulo e, mais ainda, a conjugação alternativa de ACC, formando N-Malonil ACC (MACC) (YANG; HOFFMAN, 1984; GALLARDO et al., 1991; MARTINEZ-REINA et al., 1996; MATILLA, 2000; MATILLA-VAZQUEZ, 2008; LINKIES; LEUBNER-METZGER, 2012; CORBINEAU et al., 2014). Esta forma conjugada de ACC, MACC, pode ser reversível, em alguns casos, como em frutos de maçã, folhas de trigo e hipocótilo de sementes de feijão (HOFFMAN et al., 1983). Mas em sementes de amendoim, os autores verificaram que a reversão não ocorre e que o etileno é sintetizado a partir de metionina e, portanto, uma vez conjugado, o ACC sintetizado nas sementes não pode ser mais convertido em etileno.

Um dos pioneiros nestes estudos sobre processos bioquímicos relacionados ao etileno, bem como sua síntese, foi o pesquisador Shang Fa Yang, cujo sobrenome foi oferecido ao ciclo de metionina, batizado, assim, de Ciclo Yang, que é onde a metionina é reciclada para garantir novas rotas de biossíntese do hormônio (YANG; HOFFMAN, 1984; BRADFORD, 2008). A rota biossintética do etileno inclui, ainda, a conversão de SAM em poliaminas (HOFFMAN et al., 1983; WANG et al., 1982; YANG; HOFFMAN, 1984; MIYAZAKI; YANG, 1987a, b; CORBINEAU et al., 2014) que também atuam na germinação de sementes, podendo estimular ou inibir, dependendo do tipo de poliamina e espécie vegetal, como no caso de maçã (SINSKA; LEWANDOWSKA, 1991), além de competir com o etileno pelo precursor em comum, SAM, podendo, assim, reduzir a sua síntese (MATILLA, 2000). Entretanto, foi verificado, também, a interação positiva de etileno e poliaminas na diferenciação e alongamento celular de duas espécies de *Passiflora* (DIAS et al., 2009; DIAS et al., 2010).

A ação do etileno pode ocorrer no local de sua síntese ou em outros locais da planta, sendo, então, transportado por difusão tanto pelo xilema como pelo floema, porém, com algumas limitações, devido ao seu estado gasoso (WOLTERING, 1990; MORRIS; LARCOMBE, 1995). Desse modo, dependendo da distância e situação, antes de completar a

síntese, ACC é transportado até o local de ação, onde é imediatamente convertido a etileno (YANG; HOFFMAN, 1984) e acoplado ao seu receptor através de um co-fator de cobre no retículo endoplasmático, diferentemente da maioria dos hormônios vegetais, que não atravessam a membrana plasmática, iniciando-se, assim, uma ou várias rotas de transdução de sinais para concluir o efeito final (HIRAYAMA et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 1999; CHEN et al., 2005; WANG et al., 2006).

As cinco proteínas identificadas como receptoras do etileno ETR1 (*ethylene resistant*), ETR2, ERS1 (*ethylene response sensor*), ERS2 E EIN4 (*ethylene insensitive*) foram detectadas primeiramente em *Arabidopsis* e são codificadas por uma família multigênica, que se subdivide em duas subfamílias: subfamília I (ETR1 e ERS1) e subfamília II (ETR2, EIN4, e ERS2), variando em preferência e importância (WANG et al., 2002; WANG et al., 2006). Os receptores de etileno seguem um modelo de resposta negativa, ou seja, na ausência do etileno, eles ficam ativos e interagem com outra proteína (CTR1), fazendo com que a via de sinalização siga em uma sequência de informações que inibem a resposta ao hormônio, já quando o etileno se liga ao receptor, este é desativado, ocorrendo mudanças conformacionais que desativam a CTR1 e permite a regulação da expressão de diversos genes por meio dos fatores de transcrição, liberando, assim, as respostas fisiológicas intracelulares, típicas do etileno (HUA; MEYEROWITZ, 1998; WANG et al., 2002; WANG, et al., 2006). Alterações mutagênicas que transformam a codificação de qualquer uma dessas proteínas envolvidas no curso da via de transdução de sinais, impedem ou interrompem a resposta e foi através dos estudos desses mutantes, principalmente de *Arabidopsis*, que muitas funções importantes do etileno foram e ainda estão sendo comprovadas e melhor elucidadas (HUA; MEYEROWITZ, 1998; RODRIGUEZ et al., 1999; WANG et al., 2002; CHEN et al., 2005; WANG et al., 2006; EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2015).

Vale lembrar, no entanto, que alguns fatores bióticos ou abióticos podem interferir tanto na síntese quanto na atividade do etileno.

#### *Fatores que interferem na síntese de etileno*

##### 1) Altas temperaturas

Temperaturas elevadas (e.g. acima de 35°C) podem impedir a rota biossintética do etileno em diversas espécies, aqui exemplificado pelo grão de bico (GALLARDO et al., 1991), girassol (CORBINEAU et al., 1988) ou alface (PRUSINSKI; KHAN, 1990). A redução na produção de etileno nestas condições, pode resultar da inibição da atividade de

ACO ou conjugação de ACC (CORBINEAU et al., 1988; GALLARDO et al., 1991), ou, ainda, da redução da expressão dos genes ACS e ACO (ARGYRIS et al., 2008).

## 2) Ambiente anaeróbico

A baixa concentração de O<sub>2</sub> inibe a oxidação de ACC a etileno, uma vez que, a ação da ACO é dependente deste gás (HOFFMAN et al., 1982).

3) CO<sub>2</sub> pode inibir ou estimular a síntese do etileno, dependendo da concentração no ambiente.

Altas concentrações de CO<sub>2</sub> podem inibir a síntese de etileno, no entanto, quando em concentrações menores, o CO<sub>2</sub> pode atuar positivamente na maturação de frutos, ativando ACO (WILD et al., 2003) ou no efeito de epinastia (DAWAN et al., 1981).

## 4) Estresses bióticos ou abióticos estimulam a síntese de etileno

Estresses variados promovem a síntese de ACS e estimulam a conversão de SAM a ACC, como os provocados por frio (YANG; HOFFMAN, 1984), patógenos (ZHU et al., 2014), injúrias mecânicas (HYODO; NISHINO, 1981) e déficit hídrico (APELBAUM; YANG, 1981). A inundação também estimula a síntese de etileno (YANG; HOFFMAN, 1984), porém, como o etileno não é sintetizado na raiz anaeróbia e possui limitações na quantidade do gás que chega a parte aérea, o autor sugeriu que um "sinal", ou o ACC, seja produzido na raiz e transportado para a parte aérea, onde a síntese do etileno é realizada e a ação concretizada. A exposição a produtos fitotóxicos à base de ozônio e cádmio também estimularam a síntese de etileno (HOGSETT et al., 1981).

## 5) Interferência de outros hormônios

O principal hormônio que age na produção do etileno é a auxina, promovendo a síntese de ACC-sintase (YANG; HOFFMAN, 1984). Já a citocinina, atua junto com a auxina em efeito aditivo (LAU; YANG, 1974). O ABA também pode promover a síntese de etileno estimulando a síntese de ACC (RIOV et al., 1990), assim como o próprio etileno, que também pode regular a sua própria síntese (YANG; HOFFMAN, 1984).

## 6) Inibidores específicos da síntese de ACC (inibem a atividade de ACS)

O aminoetóxi-vinil-glicina (AVG) (HOGSETT et al., 1981) e o ácido aminoxiacético (AOA) inibem a atividade da ACS, impedindo a síntese de ACC, mas não a oxidação de ACC



a etileno (YANG; HOFFMAN, 1984). Assim, a inibição da síntese de etileno, requerida muitas vezes por interesse comercial, só será eficaz se os inibidores forem aplicados antes da formação de ACC (CORBINEAU et al., 2014).

7) Inibidores específicos da síntese do etileno (inibem a atividade de ACO)

O íon cobalto (HOGSETT et al., 1981; YANG; HOFFMAN, 1984), níquel (YANG; HOFFMAN, 1984), paclobutrazol e uniconazole inibem a atividade da ACO (MIN; BARTHOLOMEW, 1996). Eliminadores de radicais livres, como algumas enzimas específicas, também podem inibir a oxidação de ACC a etileno (YANG; HOFFMAN, 1984; EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2015).

*Fatores que interferem na atividade de etileno:*

1) Concentrações variadas de CO<sub>2</sub> podem inibir ou estimular a ação do etileno, dependendo da espécie, local de ação e temperatura.

Em sementes de amendoim, Ketring e Morgan (1972) não observaram efeito do CO<sub>2</sub> em concentrações de 10 e 15% sobre a ação do etileno na superação da dormência. No entanto, em sementes termodormentes, a interação entre etileno e CO<sub>2</sub> foi positiva, mas a temperatura pode influenciar o efeito de CO<sub>2</sub> sobre a ação do etileno na germinação, pois a 25°C, as sementes foram mais sensíveis às concentrações de CO<sub>2</sub>, em que 4,6 e 12,8% foram suficientes para reduzir progressivamente a germinação de sementes de alface tratadas com etileno; já a 35°C, 12,8% (NEGM; SMITH, 1978) e 16% (NEGM et al., 1972) de CO<sub>2</sub> aumentou o efeito do etileno sobre a superação de dormência e germinação de sementes.

2) Nitrato e tiosulfato de prata, 2,5-norbornadieno (KEPCZYNSKI; KEPCZYNSKA, 1997; DIAS et al., 2010) e 1-metilciclopropano (MCP) (WILD et al., 2003) competem pelo mesmo receptor de etileno, inibindo sua ação.

3) Perclorato de mercúrio pode absorver diretamente o etileno do meio (DIAS et al., 2010).

A produção de etileno pelas sementes é iniciada imediatamente após o início da embebição e se mantém durante as fases I e II de embebição até atingir a fase III, quando há emissão radicular e a sua produção atinge o ponto máximo (KETRING; MORGAN, 1969; EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2015). Sementes mais vigorosas produzem mais etileno (SAMIMY; TAYLOR, 1983; GORECKI et al., 1991), o que, inclusive, pode ser utilizado como indicador de vigor (CORBINEAU et al., 2014). Porém, após a colheita, as sementes de

algumas espécies, mesmo vigorosas, podem apresentar deficiência na produção do hormônio, que é o caso das sementes de amendoim (KETRING; MORGAN, 1969) e, possivelmente, do amendoim forrageiro, caracterizando a sua dormência.

Como alternativa ao etileno endógeno, ou ao sintético gasoso, o ácido 2-cloroetilfosfônico (ethephon), que é uma espécie de precursor sintético do etileno e é apresentado na forma líquida, facilitando seu manuseio, vem apresentando resultados satisfatórios no tratamento de sementes dormentes. Assim que é absorvido, converte-se em etileno e pode melhorar a germinação de sementes dormentes, não só do amendoim comercial, mas também de outras espécies, como maçã (SINSKA, 1989), alface (PRUSINSKI; KHAN, 1990), pimenta (CARTER; STEVENS, 1998), *Amaranthus* (KEPCZYNSKI et al., 1996; BIALECKA; KEPCZYNSKI, 2009), *Echinacea* sp. (QU et al., 2004) e amendoim forrageiro (ASSIS et al., 2013a, b). Seu efeito na germinação depende da dose, que varia com a espécie e a profundidade de sua dormência, assim como das condições ambientais, e pode estar associado com um aumento da sensibilidade ao etileno ou, simplesmente, com a disponibilização do hormônio que, por algum motivo, não consegue ser sintetizado (CORBINEAU et al., 2014).

Estudos utilizando variadas técnicas, incluindo genes específicos, mutantes, marcadores moleculares, além de inibidores e estimulantes da síntese de etileno e indutores de dormência, apontam os possíveis mecanismos de atuação do etileno na liberação da dormência de sementes e as possíveis causas de dormências aliviadas pelo hormônio. Alguns destes resultados podem ser exemplificados abaixo:

1) Quando altas temperaturas (e.g. maior que 35°C) inibem a germinação por reduzir a síntese de etileno.

A temperatura elevada reduz a síntese de etileno, primeiro, por desviar a rota de oxidação do ACC a etileno, estimulando o aumento da malonilação, que conjuga ACC em MACC (GALLARDO et al., 1991; MARTINEZ-REINA et al., 1996); segundo, por inibir diretamente a ação da enzima ACO (CORBINEAU et al., 1988; GALLARDO et al., 1991). Mais ainda, por reduzir a expressão dos genes *ACS* e *ACO*, que codificam as enzimas chaves da rota biossintética do hormônio (ARGYRIS et al., 2008). Assim, se o fator disparador da dormência estiver relacionado a temperaturas elevadas, tratamentos de resfriamento, ou que disponibilizem indutores da síntese, precursores ou o próprio etileno, possivelmente, terão resultados satisfatórios.

## 2) Inibição da germinação por excesso de ABA na semente após a colheita.

O ABA que não é perdido com a secagem natural da semente, ao final do processo de maturação em espécies tolerantes à dessecação, impede sua germinação, principalmente, por inibir a produção de enzimas hidrolíticas sintetizadas pelas GAs, que são importantes para a liberação de reservas necessárias ao processo de germinação (GROOT; KARSSSEN, 1987; DEBEAUJON; KOORNNEEF, 2000). Neste caso, se faz necessário somente o reforço com a aplicação de GA, ou em conjunto com o etileno (LINKIES et al., 2009). Vale ressaltar, também, que pode existir relação entre os níveis de  $\text{NAD}^+$  e a concentração de ABA nas sementes, pois  $\text{NAD}^+$  é requerido para a síntese do hormônio, enquanto NADPH pode degradá-lo (HUNT; GRAY, 2009). Assim, segundo os autores, quanto maior os níveis de  $\text{NAD}^+$  ou a razão  $\text{NAD}^+:\text{NADH}$  ou  $\text{NAD}^+:\text{NADP}$ , maior a profundidade da dormência.

Mas, o ABA pode, também, inibir a atividade de ACO ou a própria transcrição do gene *ACO*, levando, assim, a redução da produção de etileno (LINKIES et al., 2009). Por outro lado, o etileno também pode neutralizar tanto a síntese quanto a sinalização de ABA, tendo o gene *ETR1* papel chave (CORBINEAU et al., 2014). O etileno também pode neutralizar a inibição por ABA, induzindo o enfraquecimento e a ruptura da cobertura do endosperma em espécies albuminosas, além do crescimento radicular (LINKIES et al., 2009).

A eliminação de ABA também pode ser realizada naturalmente ao longo do armazenamento, sendo suficiente para a superação da dormência. Porém, quando há necessidade comercial de utilização da semente imediatamente após a colheita, como em amendoim comercial (KETRING; MORGAN, 1969), ou ainda, quando a semente apresenta baixa longevidade, que é o caso de *Arachis pintoi* (FERGUSON, 1994; ROSSETTO; ALVES, 2008), algumas intervenções são necessárias, como a secagem artificial das sementes com calor (FERGUSON, 1994; COSTA; ROSSETTO, 2008; ROSSETTO; ALVES, 2008; BRASIL, 2009) ou a reposição do próprio etileno (ASSIS et al., 2013a, b).

## 3) Interação das espécies reativas de oxigênio (ERO) com etileno.

O efeito deletério de ERO sobre as sementes já é conhecido (WALTERS et al., 2010), porém, nos últimos anos, pesquisadores têm reconhecido a sua função positiva na superação de dormência e germinação de sementes de algumas espécies através de sua interação com alguns hormônios (DIAZ-VIVANCOS et al., 2013; EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2015). O etileno, por exemplo, aumenta a produção ROS no eixo embrionário e estes, por sua vez, alteram as vias de transcrição de sinais do ABA, impedindo, assim, o seu efeito inibitório sobre a germinação de sementes dormentes (EL-MAAROUF-

BOUTEAU et al., 2015). Com o aumento da produção de etileno durante a fase de alongamento celular, ocorre o aumento necessário de ERO para favorecer a protrusão de raiz. Por outro lado, ERO também estimula a produção de etileno durante a embebição e o etileno promove o alongamento celular na radícula (ISHIBASHI et al., 2013). Mas as ERO também podem reduzir a produção de ACC em algumas espécies, como em ervilha (BARBA-ESPIN et al., 2011). Os autores consideraram que a espécie não é fortemente dependente de etileno para germinar e, talvez, o fato explique, ao menos em parte, este efeito de ERO em ACC. No entanto, é possível que ERO e etileno não interajam diretamente, mas, sim, através de uma rede hormonal complexa, envolvendo também ABA e GAs (ISHIBASHI et al., 2013; CORBINEAU et al., 2014). Desse modo, a interação entre ERO e etileno em sementes é variável, dependendo do contexto fisiológico da germinação, ou seja, da interferência de condições ambientais específicas durante a embebição e da espécie relacionada, que pode apresentar comportamento altamente peculiar (CORBINEAU et al., 2014).

#### 4) O etileno também possui efeito sobre as proteínas DELLA.

As proteínas DELLA atuam como reguladoras de transcrição nuclear das GAs, reprimindo a sinalização e, por sua vez, a germinação das sementes de algumas espécies (PENG; HARBERD, 2002; AN et al., 2012). Entretanto, em algumas espécies, as próprias GAs podem degradar as proteínas, controlando sua concentração, e em outras, onde apresentam dificuldades neste processo, o etileno pode desempenhar papel regulador sobre as proteínas DELLA, liberando a importante ação indutora da germinação exercida pelas GAs (CORBINEAU et al., 2014).

### **II.2.3. Tratamentos para superação de dormência em *Arachis hypogaea* L. e *Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg**

Os tratamentos para superação de dormência são vários e dependem das causas ou da combinação entre elas. As Regras para Análise de Sementes recomendam o tratamento das vagens de *Arachis hypogaea* L. com secagem a 40°C por sete dias ou a remoção do pericarpo (BRASIL, 2009). No entanto, para amendoim forrageiro, embora a remoção do pericarpo possa aumentar a velocidade de emergência das plântulas, há aumento na possibilidade de danos mecânicos às sementes, reduzindo a germinação, prejudicando o armazenamento e tornando as sementes mais vulneráveis à contaminação por fungos (COSTA; ROSSETTO,

2008). Por outro lado, Ferguson (1994) ressaltou, ainda, que a dormência nesta espécie não se localiza na vagem e, sim, nas sementes, e que a superação da dormência poderia ser obtida com a secagem a 40°C por 14 dias, sem precisar expor as sementes às injúrias provocadas pela remoção do pericarpo, ainda que o calor também possa causar algum tipo de dano à semente. Rossetto e Alves (2008) também confirmaram os resultados acima, tratando as vagens de amendoim forrageiro com calor, porém com temperatura de 45°C, por dois ou três dias. Relataram, ainda, que o tratamento com hidratação das sementes a uma temperatura mais baixa (25°C), por dois dias, favoreceu a germinação total e o vigor em relação às sementes não tratadas, embora tenha promovido menor efeito sobre a dormência. A redução dos níveis de ABA e o incremento da síntese e ação do etileno apresentaram efeitos positivos no controle da dormência de *Arachis hypogaea* L. (KETRING; MORGAN, 1969, 1971, 1972).

A aplicação de etileno em sementes de *Arachis hypogaea* L. apresentou resultados positivos na superação da sua dormência (KETRING; MORGAN, 1969, 1972; KEPCZYNSKI; KEPCZYNSKA, 1997; ISSA et al., 2010), mas, pouco se conhece sobre o efeito deste tratamento na superação da dormência e no potencial fisiológico das sementes de amendoim forrageiro, sobretudo, durante o armazenamento, com possibilidade de ampliação de sua longevidade.

### **II.3. Deterioração de sementes**

A deterioração das sementes é um processo degenerativo irreversível e cumulativo (KAPOOR et al., 2011) que tem início no ponto de maturidade fisiológica, com a semente ainda ligada à planta, e termina com a sua morte, ou seja, com a perda da capacidade de germinar. Danos de caráter ultra estrutural e bioquímico ocorrem antes mesmo que sejam percebidos pelo teste de germinação, como a danificação dos sistemas de membranas, do DNA e outros constituintes celulares (POPINIGIS, 1997). Como consequência, alterações em organelas importantes, como as mitocôndrias, que são basicamente formadas por um sistema de membranas, e a redução da atividade respiratória, também são esperadas (ABDUL-BAKI, 1980, BENAMAR et al., 2003; MENDES et al., 2009). Tais eventos são consequências da peroxidação lipídica, que é basicamente mediada por radicais livres ou outras EROs, e outros processos oxidativos. Uma das principais fontes de ERO nas sementes metabolicamente ativas é a própria cadeia respiratória mitocondrial, que gera, especialmente, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (MOLLER, 2001), uma das espécies mais reativas de oxigênio (BAILLY,

2004). Por outro lado, a peroxidação lipídica, juntamente com os radicais livres acumulados, causa aumento na degradação enzimática, redução da atividade das enzimas e mais acúmulo de ERO e outros compostos tóxicos (WALTERS et al., 2010), além de malonaldeído (MDA), que é o melhor e mais usual indicador da peroxidação de lipídios, especialmente em sementes (KIBINZA et al., 2006; SHABAN, 2013). Com o tempo de armazenamento, as próprias enzimas responsáveis pela remoção de ERO e pela proteção das sementes, como a superóxido dismutase, catalase, peroxidase e glutathione redutase começam a se extinguir (KIBINZA et al., 2006; SHABAN, 2013) e a deterioração acelera. Ademais, com a deterioração, a reserva nutricional da semente, incluindo lipídios, açúcares solúveis e proteínas, é reduzida e o teor de aminoácidos livres e açúcares redutores aumentam (BASAVARAJAPPA et al., 1991), induzindo a degradação de proteínas por reações conhecidas como Amadori e Maillard (MURTHY; SUN, 2000; CASTELLIÓN et al., 2010). Por conseguinte, o substrato utilizado para a respiração celular diminui afetando, principalmente, a produção de ATP e a germinação da semente; as concentrações de açúcares solúveis protetores das membranas, como a sacarose, rafinose e estaquiose também são reduzidas, afetando ainda mais a integridade das membranas e reforçando a deterioração (BAILLY et al., 2001; GURUSINGHE; BRADFORD, 2001).

Todo este processo de deterioração é variável entre as espécies e cultivares, que possuem uma ampla e variada composição de reservas nutricionais, com predominância em compostos lipídicos, carboidratos, proteínas ou outros. Também ocorrem variações entre lotes e entre sementes de um mesmo lote e pode seguir um ritmo lento ou acelerar rapidamente, com velocidade e intensidade determinadas pelas condições do ambiente e das práticas de manejo adotadas durante o desenvolvimento da semente na planta (DELOUCHE, 1963).

Neste sentido, o tempo de armazenamento das sementes de cada espécie ou cultivar, infalivelmente, irá variar e a longevidade máxima das sementes de cada espécie, que é determinada basicamente pela “informação genética”, será influenciada pela interação entre essa informação e fatores que, normalmente, podem reduzir ou estimular a longevidade natural, definindo, assim, o seu “potencial de longevidade” (BARBEDO et al., 2013). Como fatores que podem reduzir a longevidade, os autores consideram basicamente o teor de água das sementes, a temperatura, a presença de danos físicos e de microrganismos nas sementes e, principalmente, o grau de maturidade das sementes no momento do seu desprendimento da planta. Como fatores que podem estimular a sua longevidade pode-se incluir, dentre outros, alguns tratamentos com produtos químicos, como os fungicidas ou inseticidas, o controle das condições ambientais mais adequadas ou, até mesmo, a própria dormência das sementes.

Igualmente, ainda que lotes de sementes apresentem uma mesma taxa de germinação, o vigor, que pode ser considerado como um conjunto de características reunidas em uma semente que determinam o potencial para uma emergência e desenvolvimento rápidos e uniformes de plântulas normais, perante ampla diversidade de condições ambientais (AOSA, 1983), pode diferir e comprometer a longevidade e o desempenho de cada lote em campo. Assim, eventos degenerativos que promovem a redução no vigor das sementes devem e podem ser detectados por meio de diversas avaliações ou testes práticos. No próprio teste de germinação ou emergência é possível constatar alguns desses efeitos no vigor, que já se tornam visíveis, como a redução na velocidade de germinação e a desuniformidade do *stand*. Pode-se verificar, também, a formação de plântulas normais, mas com menor taxa de crescimento (KAPOOR et al., 2010) e, por fim, o desenvolvimento de plântulas anormais. Em suma, os testes de vigor fornecem informações adicionais para auxiliar na diferenciação dos lotes de sementes com padrão de germinação similar e aceitável para a comercialização e que as diferenças detectadas estejam relacionadas ao comportamento das sementes durante o armazenamento e após a semeadura (TEKRONY, 2003).

Contudo, avaliações mais sensíveis são necessárias para o estudo aprofundado de eventos degenerativos iniciais, que possam ser associados a efeitos visíveis. A redução ou perda da permeabilidade seletiva das membranas celulares, seguida pela redução na atividade respiratória, podem ser associadas à queda na velocidade de germinação; enquanto a morte de tecidos importantes, em diferentes regiões da semente, mais comumente verificada nos estádios finais de deterioração, implica na ocorrência de plântulas anormais (MATTHEWS, 1985). A perda da permeabilidade seletiva das membranas pode ser detectada, previamente, por meio de alguns testes simples, como, por exemplo, os que avaliam a quantidade de lixiviados de sementes embebidas, como os testes de condutividade elétrica ou lixiviação de potássio (PANOBIANCO; MARCOS FILHO, 2001). Dentre as substâncias perdidas durante a lixiviação e detectadas no teste de condutividade elétrica, por exemplo, incluem-se açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e proteínas, além de enzimas e íons inorgânicos ( $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Na^+$ ,  $Mn^{+2}$ ). Destes íons, o potássio é o que se acumula em maiores quantidades nas sementes (LOTT et al., 1991). Assim, o teste de lixiviação de potássio oferece maior precisão dos resultados, conforme observado em sementes de diversas culturas (RODO; MARCOS FILHO, 2001; MIRANDA et al., 2003; KIKUTI; MARCOS FILHO, 2008), inclusive de amendoim (KIKUTI et al., 2008).

Quanto à atividade respiratória das sementes, as alterações provocadas por eventos deteriorativos podem ser verificadas pela medição direta de  $O_2$  consumido e  $CO_2$  liberado,

tanto de sementes em armazenamento, quanto de sementes germinando (DODE et al., 2012; LAMARCA; BARBEDO, 2012). Na relação  $O_2/CO_2$  em sementes, o excesso de liberação de  $CO_2$  em relação ao consumo de  $O_2$  pode sugerir uma atividade não respiratória (PERL, 1986). Por outro lado, dependendo do substrato ou de diversos outros fatores intrínsecos à semente e ao ambiente, o consumo de  $O_2$  pode ser consideravelmente maior que a liberação de  $CO_2$ , podendo indicar uma possível oxidação (BAILLY, 2004; LAMARCA; BARBEDO, 2012).

Outras avaliações complementares podem detectar os primeiros indícios de deterioração. Avaliações de processos ou produtos inerentes ao metabolismo mitocondrial (e.g. malato, fumarato e succinato) (BAI et al., 2012), assim como das próprias mitocôndrias, por exemplo, podem complementar e reforçar os estudos que objetivam a compreensão dos processos oxidativos envolvidos na deterioração (BASAVARAJAPPA et al., 1991; BENAMAR et al., 2003). Segundo os autores, as membranas das cristas mitocondriais, onde ocorre o processo respiratório de fosforilação oxidativa, são as primeiras a sofrerem os efeitos da deterioração. Neste sentido, a atividade das mitocôndrias pode ser comprometida, mas quando os embriões são considerados viáveis, a atividade mitocondrial aumenta a partir do início da embebição, refletindo na elevação do consumo de oxigênio e tornando mais eficiente a produção de ATP, que em quantidade suficiente, desencadeia a evolução normal dos outros eventos metabólicos preparatórios para a germinação (BENAMAR et al., 2003). Com o envelhecimento, há queda gradativa do número e eficiência das mitocôndrias (FERGUSON et al., 1990) e os estudos sobre as mitocôndrias e sua relação com o vigor podem ser abordados de forma indireta, como, por exemplo, avaliando-se o consumo de oxigênio pelas sementes, que pode refletir na velocidade de germinação (MENDES et al., 2009). A atividade de certas enzimas mitocondriais, como as desidrogenases, também pode ser relacionada com o potencial fisiológico das sementes, quantificando-se a enzima, diretamente, ou sua atividade, por meio do teste de tetrazólio (DUKE et al., 1977; SANTOS et al., 2004; LAMARCA; BARBEDO, 2014). Formas diretas de associação também são possíveis, onde a quantidade e qualidade das mitocôndrias de sementes em estágio inicial de germinação são associadas à germinação e ao crescimento das plântulas (BENAMAR et al., 2003).

Quanto aos níveis de ATP, energia produzida pelas mitocôndrias, alguns pesquisadores demonstraram ser possível e eficiente a relação dos níveis de ATP com o potencial fisiológico das sementes (ANDERSON, 1977; REEDY; KNAPP, 1990). Todavia, este tipo de relação pode ser questionável, pois o ATP acumulado na fase inicial de germinação das sementes é o resultado do balanço entre a síntese e utilização de ATP. Assim, o acúmulo de ATP pode resultar de uma alta taxa de síntese, por sementes vigorosas, ou de



uma baixa capacidade de utilização, por sementes de menor vigor, inviabilizando a correlação com o vigor da semente (PERL, 1986). Do mesmo modo, durante o estágio inicial da germinação, foi observado maior concentração de ATP no eixo embrionário de sementes de amendoim que tiveram a dormência superada pelo etileno do que no de sementes dormentes (PERL, 1986). O autor propôs que tanto pode ter havido decréscimo na utilização de ATP, como aumento na habilidade de sintetizar ATP nos eixos, assim como de transferir o ATP produzido no cotilédone para o eixo embrionário.

Em síntese, a deterioração das sementes é um processo inevitável a partir de sua formação, independentemente da espécie, e o avanço da tecnologia vem auxiliando cada vez mais o estudo de todos os elementos envolvidos rumo a uma melhor compreensão dos processos fisiológicos e, também, do conhecimento de meios mais eficazes para ampliar a longevidade.

### **II.3.1. Deterioração em sementes de *Arachis pinto* Krapov. & W. C. Greg**

As sementes de amendoim forrageiro são mais vulneráveis aos danos mecânicos e aos danos causados pela oxidação do que a maioria das espécies forrageiras tropicais, pois possuem maior teor de lipídios (FERGUSON, 1994), podendo alcançar 49,7%, dependendo da cultivar, além de qualidade e estabilidade reduzidas, devido à baixa razão dos ácidos graxos oleico/linoleico (0,79) e ao alto índice de iodo (109) (GROSSO et al., 2000), justificando, assim, o seu reduzido potencial de armazenamento. Somado a isto, além de cada lote de sementes de *A. pinto* apresentar um curto período de sementes não dormentes e vigorosas, ainda possuem uma grande variação no vigor, visto que a maturação das sementes é, normalmente, desuniforme. Pois, como a maioria das sementes de espécies que apresentam hábito indeterminado, a floração e o amadurecimento das sementes se dão em momentos diferentes na planta e não é possível planejar uma colheita parcelada em função das sementes se desenvolverem dentro do solo. Como se não bastasse, diferentemente de *A. hypogaea*, que já foi domesticado, o *A. pinto* apresenta alto índice de abscisão dos frutos, dificultando sua colheita, além de não garantir que, realmente, as sementes tenham atingido nível máximo de potencial de longevidade (VALLS, 1985; COOK; FRANKLIN, 1988). Todos estes fatores juntos podem justificar a baixa longevidade das sementes da espécie.

### III. CAPÍTULO ÚNICO

#### **A superação de dormência e o avanço da deterioração em sementes de *Arachis pinto* ocorrem simultaneamente**

Marcia Provenzano Braga-Xavier<sup>1</sup>, Giselle Mariano Lessa de Assis<sup>2</sup>, Auxiliadora Oliveira Martins<sup>3</sup>, Wagner L. Araújo<sup>3</sup>, Claudio José Barbedo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Botânica., Botucatu, SP, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Acre, Rio Branco, AC, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Viçosa, MG, Brasil; <sup>4</sup>Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, Núcleo de Pesquisa em Sementes, São Paulo, SP, Brasil. [agro\\_mpb@hotmail.com](mailto:agro_mpb@hotmail.com).

#### **RESUMO**

Sementes de amendoim forrageiro (*Arachis pinto* Krapov. & W. C. Greg.), leguminosa amplamente utilizada como forrageira, no paisagismo e proteção do solo, apresentam dormência pós-colheita e baixa longevidade. Não obstante, a superação ocorre de forma natural ao longo do armazenamento e tratamentos químicos ou físicos da dormência, frequentemente, aceleram a deterioração das sementes. Resultados promissores têm sido obtidos com a aplicação exógena de etileno. Neste contexto, investigaram-se como a superação da dormência mediada pelo etileno, ou não, afeta as ultraestruturas, o potencial fisiológico e a atividade respiratória de sementes de *A. pinto* durante o armazenamento. Tomados em conjunto, os resultados obtidos indicam que a superação da dormência pode acelerar a deterioração das sementes de *A. pinto*. No entanto, foi verificado que em condições de ambiente de armazenamento não controladas, alterações ultraestruturais das mitocôndrias, ocasionadas pela deterioração, se iniciam aos dois meses, antes da superação total da dormência. Igualmente, alterações na permeabilidade seletiva das membranas e efeitos nos tecidos das sementes concorrem para a redução do número de plântulas normais, já visíveis no teste de germinação a partir do 6º mês. Mais ainda, alterações mensuráveis de carboidratos, aminoácidos, proteínas e respiração, acompanhadas de aumento na peroxidação lipídica foram verificadas a partir do 8º e 10º mês de armazenamento, quando as sementes, principalmente, as tratadas com etileno, perderam a capacidade de produzir plântulas normais nas condições do teste de germinação. Processos oxidativos podem determinar a baixa longevidade natural dessas sementes e a dormência não representa uma ferramenta evolutiva para ampliar o seu potencial de armazenamento. Em síntese, os resultados obtidos permitem concluir que a superação da dormência, embora ocorra lentamente, acelera a deterioração das sementes de *A.*

*pinto* e os processos ocorrem simultaneamente, mediados por alterações nas mitocôndrias e nas taxas respiratórias. Em uma perspectiva aplicada, métodos artificiais podem antecipar a superação dessa dormência, mas aceleram a deterioração e, portanto, somente devem ser adotados quando próximos à semeadura.

## INTRODUÇÃO

O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg.), herbácea perene originária do Brasil, de alto potencial econômico e biológico (ASSIS et al., 2013c), pode ser cultivado em diferentes ambientes (AMATO et al., 2007), sendo recomendado como forrageira para diversas finalidades, como na recuperação de áreas degradadas, pastagens, cobertura do solo sob culturas perenes, paisagismo e adubação verde (DUDA et al., 2003; ESPINDOLA et al., 2006; AMATO et al., 2007).

O estabelecimento da cultura pode ser feito tanto por estolões, como por diásporos (VALENTIM et al., 2003, 2009). Contudo, em ambos os casos, o desenvolvimento é lento, constituindo uma limitação na competição com plantas espontâneas (WUNSCHER et al., 2004). Assim, sementes, com ou sem pericarpo, apresentam como vantagem a resistência ao transporte e armazenamento em relação aos estolões, embora 80% das sementes estejam dormentes logo após a colheita (FERGUSON, 1994; ROSSETTO; ALVES, 2008). Dormência esta, que pode durar de seis a oito meses durante o armazenamento, o que se configura em um grande problema para a cultura, pois as sementes, em função da rápida deterioração, podem perder a viabilidade após 10 meses de armazenamento (FERGUSON, 1994; ROSSETTO; ALVES, 2008).

A causa da dormência em sementes de *A. pintoi* não é ainda totalmente conhecida. Cabe mencionar, no entanto, que em outra espécie do mesmo gênero (*A. hypogaea* L.) a dormência é fisiológica e está relacionada ao adequado equilíbrio entre substâncias inibidoras e promotoras da germinação (KETRING; MORGAN, 1969). Assim, a redução dos níveis de ABA, por meio de secagem dessas sementes, e incrementos na síntese e ação do etileno apresentaram efeitos positivos (KETRING; MORGAN, 1969, 1971, 1972; KEPCZYNSKI; KEPCZYNSKA, 1997; ISSA et al., 2010). Por outro lado, os tratamentos de superação da dormência em *A. pintoi* mediante exposição ao calor (seco ou úmido) ou remoção do pericarpo reduziram a dormência, embora com alguns prejuízos ao vigor das sementes (FERGUSON, 1994; COSTA; ROSSETTO, 2008; ROSSETTO; ALVES, 2008).

Resultados promissores para o tratamento de sementes de *A. pintoi* têm sido obtidos com a aplicação de ethephon (ASSIS et al., 2013a, b). Neste sentido, o etileno pode atuar neutralizando tanto a síntese quanto a sinalização do ABA (CORBINEAU et al., 2014), induzir o enfraquecimento e a ruptura da cobertura do endosperma em espécies albuminosas, assim como induzir o crescimento radicular (LINKIES et al., 2009). O etileno pode, também, aumentar a produção de ERO no eixo embrionário e estas, por sua vez, alteram as vias de

transcrição de sinais do ABA, impedindo, assim, o seu efeito inibitório sobre a germinação de sementes dormentes (EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2015). Desse modo, necessita-se de mais pesquisas sobre a causa da dormência das sementes de *A. pintoii* e tratamentos para a superação da dormência, como o uso do etileno ou ethephon.

Em geral, a deterioração de sementes é um processo degenerativo irreversível e cumulativo, que tem início na maturidade fisiológica, com a semente ainda ligada à planta, terminando com a morte, ou seja, perda da capacidade germinativa (KAPOOR et al., 2011). Danos ultraestruturais e bioquímicos ocorrem antes mesmo que efeitos de deterioração sejam percebidos pelo teste de germinação (DELOUCHE, 1963). O acúmulo de ERO, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é uma das espécies mais reativas de oxigênio (BAILLY, 2004) e de MDA, produto considerado como um indicador da peroxidação de lipídios (KIBINZA et al., 2006; SHABAN, 2013) corroboram os primeiros eventos na deterioração de sementes (WALTERS et al., 2010), como a danificação das membranas celulares, do DNA e de outros constituintes celulares, além de ocasionar reduções na atividade enzimática em geral (KIBINZA et al., 2006; JYOTI; MALIK, 2013). Nesse contexto, alterações no metabolismo em mitocôndrias, formadas basicamente por um sistema de membranas e, por conseguinte, reduções na atividade respiratória são comumente observadas (ABDUL-BAKI, 1980; BENAMAR et al., 2003; MENDES et al., 2009; BAI et al., 2012).

Em síntese, embora não seja desejável do ponto de vista produtivo, na natureza, a dormência é vista como uma forma de preservação das espécies, pois permite a dispersão em épocas diferentes e a germinação em condições ambientais mais favoráveis, visto que, conforme o processo evolutivo, a dormência assumiu o papel de garantir maior potencial de armazenamento (BARBEDO et al., 2013). Os autores esclarecem, ainda, que, normalmente, o alto grau de dormência fisiológica permite que a semente prossiga mais tempo ligada à planta, aprofundando o processo de maturação, sem correr o risco de viviparidade, e que, quanto mais avançado este processo, maior a longevidade. Por outro lado, normalmente, as sementes intolerantes à dessecação são dispersas com baixo grau de maturação e, para isso, não possuem nenhum tipo de inibição da germinação, garantindo, dessa forma, a germinação nas condições adequadas do ambiente, justificando, assim, a sua baixa longevidade (BARBEDO et al., 2013). Ou seja, de uma maneira ou de outra, o processo evolutivo busca uma interação positiva das espécies com os mais diversos ecossistemas em que elas se desenvolvem, sempre buscando ferramentas, ou especializações, que garantam a perpetuação de cada espécie e o grau de dormência pode ser considerado como uma dessas especializações (BARBEDO et al., 2013). No entanto, em *A. pintoii*, nenhuma dessas vantagens é atendida, pois o período entre a

perda desejável da dormência e a manifestação fisiológica da deterioração, com a queda do vigor e a perda da viabilidade é extremamente curto, dois a três meses. Assim, a dormência não garante maior longevidade e, conseqüentemente, não garante o estabelecimento da nova planta, sobretudo, da sua distribuição no espaço e no tempo, indo na contra mão da evolução da maioria das espécies.

Assim, desvendar as alterações metabólicas que ocorrem durante o período de perda gradativa de dormência e a passagem de sementes dormentes para deterioradas pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos. Especialmente, o estudo destas alterações em sementes de uma espécie que os manifesta em um curto período, contribui também para o conhecimento de fenômenos até então pouco explorados, porém de suma importância para o avanço nas pesquisas em fisiologia de sementes, não somente desta, como também de diversas outras espécies, além de oferecer subsídios para o estudo de processos evolutivos alternativos.

Neste contexto, investigaram-se como a superação da dormência mediada pela presença de etileno, ou não, afeta as ultraestruturas, o potencial fisiológico e a atividade respiratória de sementes de *A. pintoii* durante o armazenamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Vegetal e Tratamentos

Sementes recém-colhidas de *A. pintoi* cv. BRS Mandobi, produzidas na Embrapa Acre, Rio Branco – AC foram homogeneizadas ainda com pericarpo e divididas em dois grupos, um dos quais foi tratado com ethephon (ET). Para tanto, as sementes foram imersas em solução de Ethrel® 0,3% (ethephon 0,072%) por 16 h (ASSIS et al., 2013a, b), com oxigenação. Em seguida, as sementes de ambos os tratamentos foram submetidas às avaliações de teor de água (base úmida), germinação, emergência de plântulas, lixiviação de potássio, tetrazólio, atividade respiratória e morfologia de células e mitocôndrias, além da quantificação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), malonaldeído (MDA), carboidratos, aminoácido e proteínas, conforme descrito adiante. As sementes tratadas (ET) e não tratadas com ethephon (controle – CT) foram acondicionadas em sacos duplos de papel kraft e armazenadas em ambiente de laboratório, sem controle de temperatura e umidade relativa do ar (Tabela 1), até 26 meses. A cada dois meses até o 16º mês de armazenamento, além do último período de armazenamento, foram realizadas as mesmas avaliações iniciais. Os testes foram sempre realizados com as sementes nuas, com remoção manual do pericarpo, conforme Amato et al. (2007), para evitar a semeadura de vagens chochas ao invés de sementes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x10 (2 doses de etileno x 10 períodos de armazenamento), com quatro repetições, exceto para a avaliação do teor de água (3 repetições) e análises bioquímicas (6 repetições).

### Avaliações

O **teor de água** das sementes (expresso em % de base úmida) foi obtido pelo método de estufa a 105 ± 3°C por 24 horas (BRASIL, 2009) com 25 sementes por repetição.

O **teste de germinação** foi realizado em germinador a 25°C, em rolo de papel (ROSSETTO; ALVES, 2008), sob luz constante, com 25 sementes por repetição. Foram consideradas como germinadas as sementes que apresentaram protrusão radicular (3 mm). Ao final do teste, 10 dias após a instalação, contabilizou-se o percentual de germinação e de plântulas normais. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado conforme Maguire (1962), com contagem diária do número de sementes germinadas. Em função da presença de fungos ao final do primeiro teste de germinação, testes suplementares foram

realizados paralelamente com sementes tratadas com fungicida, na dose de 2 g de Rhodiauram 700® (70% de thiram) por kg de sementes.

**Tabela 1.** Médias mensais da temperatura (°C) e umidade relativa do ar (U.R. %), máximas e mínimas, do ambiente de armazenamento das sementes de amendoim forrageiro tratadas (ET) e não tratadas com ethephon (CT) durante o período experimental.

Meses de Armazenamento	Meses de Avaliação	Temperatura (°C)		U.R. %	
		Min	Máx	Min	Máx
Out/2012		17	29	44	90
Nov/2012	0	17	28	48	93
Dez/2012		19	29	57	96
Jan/2013	2	17	26	66	97
Fev/2013		18	28	59	97
Mar/2013	4	17	26	64	98
Abr/2013		15	24	59	96
Mai/2013	6	15	23	57	92
Jun/2013		14	21	67	98
Jul/2013	8	12	21	59	93
Ago/2013		12	24	41	84
Set/2013	10	14	25	47	87
Out/2013		15	26	52	92
Nov/2013	12	16	27	54	93
Dez/2013		18	29	49	93
Jan/2014	14	19	30	46	93
Fev/2014		20	30	44	87
Mar/2014	16	18	27	58	95
Abr/2014		17	26	56	95
Mai/2014		14	23	56	92
Jun/2014		14	23	53	91
Jul/2014		12	22	51	88
Ago/2014		14	25	37	80
Set/2014		15	27	43	90
Out/2014		16	29	36	83
Nov/2014		17	27	51	94
Dez/2014	26	18	28	58	95



Para o **teste de emergência**, 25 sementes por repetição foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo vermiculita, em casa de vegetação. Consideraram-se emergidas as sementes que apresentaram o cotilédone acima da superfície do substrato. O índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE) também foi calculado conforme Maguire (1962). Ao final, foram contabilizados o percentual de plântulas emergidas e plântulas normais. A massa seca de plântulas normais (MSPN) foi obtida pesando-se as plântulas normais após remoção do substrato, lavagem e secagem em estufa com circulação de ar.

Para avaliação da **lixiviação de potássio**, 25 sementes por repetição foram pesadas e imersas em 75 mL de água deionizada, mantendo-as a 20°C/3 horas, conforme recomendação de Vanzolini e Nakagawa (2003) para sementes de *A. hypogaea*. As leituras foram realizadas no fotômetro de chama, previamente calibrado por meio de curva padrão (PANOBIANCO; MARCOS FILHO, 2001).

No **teste de tetrazólio**, 15 sementes por repetição foram colocadas para embeber em rolo de papel umedecido, conforme o teste de germinação, a 20°C por 16 horas, sob luz constante e, em seguida, retiraram-se manualmente os tegumentos das sementes (CARVALHO et al., 2009). Os embriões foram, então, imersos em solução de tetrazólio (1%) por duas horas, a 40°C, no escuro, conforme ajuste preliminar do método. Depois de expostos ao tetrazólio, os embriões foram lavados e os cotilédones seccionados longitudinalmente, através dos eixos embrionários, para serem avaliados com o auxílio de lupa (BITTENCOURT; VIEIRA, 1999; CARVALHO et al., 2009). A viabilidade e o vigor das sementes foram estabelecidos segundo padrão de classificação estabelecido por Bittencourt e Vieira (1999) para *A. hypogaea*. Na figura 1 (dados complementares) encontram-se algumas imagens dos principais exemplos de sementes das classes 1, 2 e 3 observados no presente trabalho.

Para avaliação da atividade respiratória foram determinados o **consumo de O<sub>2</sub>**, **produção de CO<sub>2</sub>** e **quociente respiratório (QR)**. Para esse fim, 25 sementes por repetição foram dispostas sobre discos de papel umedecidos dentro de recipientes de vidro fechados hermeticamente, a 25°C, no escuro, por 9 h (durante a fase I de embebição), atingindo cerca de 21% de água. A determinação dos gases foi feita em analisador modelo 6600 (Illinois Instruments, Inc. Johnsbury, EUA), calculando-se os valores de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> em  $\mu\text{mol}$  por grama de massa seca por dia ( $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), conforme descrito em Lamarca e Barbedo (2012).

Para determinação do teor de **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, 30 mg de material liofilizado foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo acetato de

hidroxilamina 1 mM. Em seguida, o material foi centrifugado a 10000 g por 15 minutos a 4°C. Aliquotas de 10 uL do sobrenadante foram adicionadas a 190 uL do meio de reação constituído de FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>) 625 µM em ácido sulfúrico 62,5 mM, laranja de xilenol 1 mM e sorbitol 400 mM. Após 30 minutos no escuro, as absorbâncias das amostras foram determinadas a 560 nm (GAY; GEBICKI, 2000). Os teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram estimados utilizando-se a curva de calibração preparada com padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puros.

A peroxidação de lipídios foi quantificada indiretamente pela determinação do conteúdo de **MDA** originado após reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (CAKMAK; HORST, 1991). Cerca de 50 mg de material liofilizado foram homogeneizados sequencialmente em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v) e centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos, a 4°C. Aliquotas de 420 uL de sobrenadantes foram acrescidas de 630 uL de solução de TBA 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v) e incubados a 95°C a 400 pm. Após 30 minutos a reação foi paralisada em gelo e as absorbâncias determinadas a 532 e 600nm. A concentração de MDA foi estimada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (HEATH; PACKER, 1968).

Para extração dos metabólitos glicose, frutose, sacarose, aminoácidos totais, amido e proteínas solúveis totais utilizaram-se um protocolo adaptado do protocolo de extração para perfil metabólico em Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC/MS), conforme Lisec et al. (2006). Assim, aproximadamente, de 15 mg de material liofilizado foi submetido a extração com 700 uL de metanol 100%, sendo aquecido a 70°C por 15 minutos sob agitação de 400 rpm e, em seguida, centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. O *pellet* gerado foi utilizado para extração de proteínas solúveis totais e de amido, enquanto o sobrenadante foi utilizado para quantificar açúcares solúveis e aminoácidos. O sobrenadante foi então transferido para outro *ependorff*, onde acrescentaram-se, sequencialmente, 375 uL de clorofórmio e 750 uL de água. O material foi então centrifugado por 15 minutos a 4000 rpm a 4°C, dando origem há duas fases bem características: uma aquosa (polar, superior) e uma orgânica (apolar e inferior). A fase aquosa, onde se encontram os metabólitos de interesse foi então recolhida e transferida para outro *ependorff* e posterior análise. O *pellet* foi lavado com 500 uL de acetato de etila para remoção dos lipídios, tratado com NaOH 0,1 M e aquecido por uma hora a 95 °C para extração de proteínas e, posteriormente, neutralizado com ácido acético 1M para quantificação de amido. A quantificação desses metabólitos foi realizada separadamente para cotilédone e eixo embrionário, seguindo-se as seguintes referências: os teores de **glicose**, **frutose** e **sacarose** (FERNIE et al., 2001); **aminoácidos**

**totais** (SIENKIEWICZ-PORZUCEK et al., 2008); os teores de **amido** (FERNIE et al., 2001) e o conteúdo de **proteínas solúveis totais** (BRADFORD, 1976).

Por meio da observação por microscopia eletrônica de transmissão, foi avaliada a integridade (aspecto visual) das **células** e **mitocôndrias** de tecidos da radícula do eixo embrionário das sementes em estágio inicial de germinação (fase I da curva de embebição) e possíveis alterações em sua morfologia. As sementes de cada tratamento foram colocadas para germinar no escuro, conforme Benamar et al. (2003) e, em seguida, o tegumento foi removido e o eixo embrionário separado dos cotilédones para a fixação. Uma pré-fixação dos tecidos do eixo embrionário foi realizada com Karnovsky (glutaraldeído 25%, paraformaldeído 8% e tampão fosfato 0,2M pH 7,3 - KARNOVSKY, 1965) durante uma semana em geladeira, sendo as três primeiras horas em temperatura ambiente, seguida de três lavagens de cinco minutos em tampão fosfato 0,1M. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato por duas horas, seguida de três lavagens de 10 minutos em água. Após esse processo, o material foi imerso em acetato de uranila 0,5% em água destilada por cerca de duas horas. O material obtido foi, então, desidratado em série crescente de concentração de acetona até 100%, embebido em resina Araldite® 1:1 com acetona 100% por 12 horas e em resina pura por mais 1 hora e, finalmente, emblocado. Os blocos foram então trimados e cortados em ultramicrotomo LEICA Reichert Super Nova na espessura de aproximadamente 90 nm. Em seguida, os cortes foram contrastados em solução saturada de acetato de uranila e citrato de chumbo, analisados ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit - FEI Company e fotografados. Todos os procedimentos acima descritos para as avaliações no aparelho de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram realizados conforme o protocolo de processamento de amostras para MET do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu (CME-UNESP, 2015).

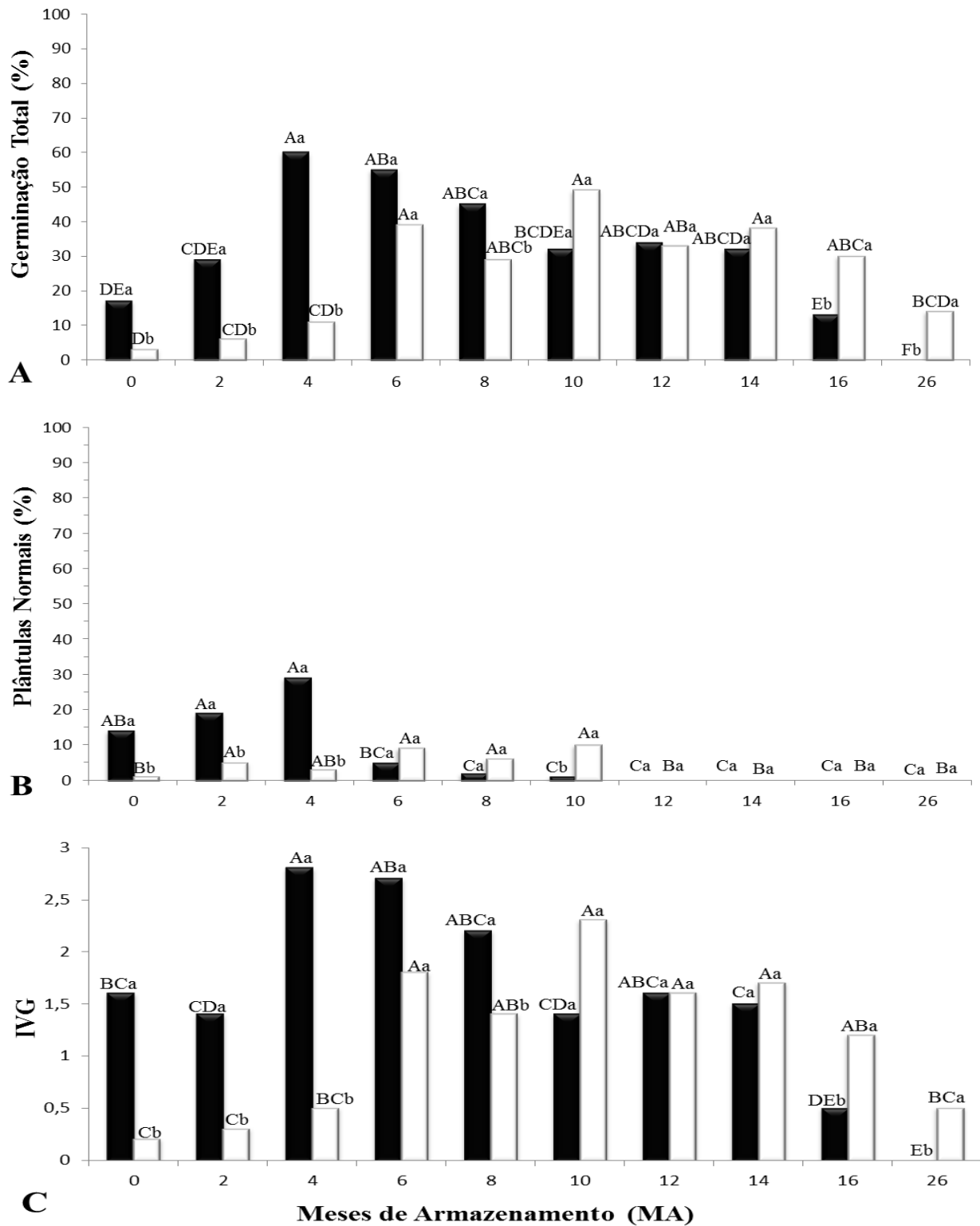
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Os dados de respiração foram submetidos à análise de regressão.

## RESULTADOS

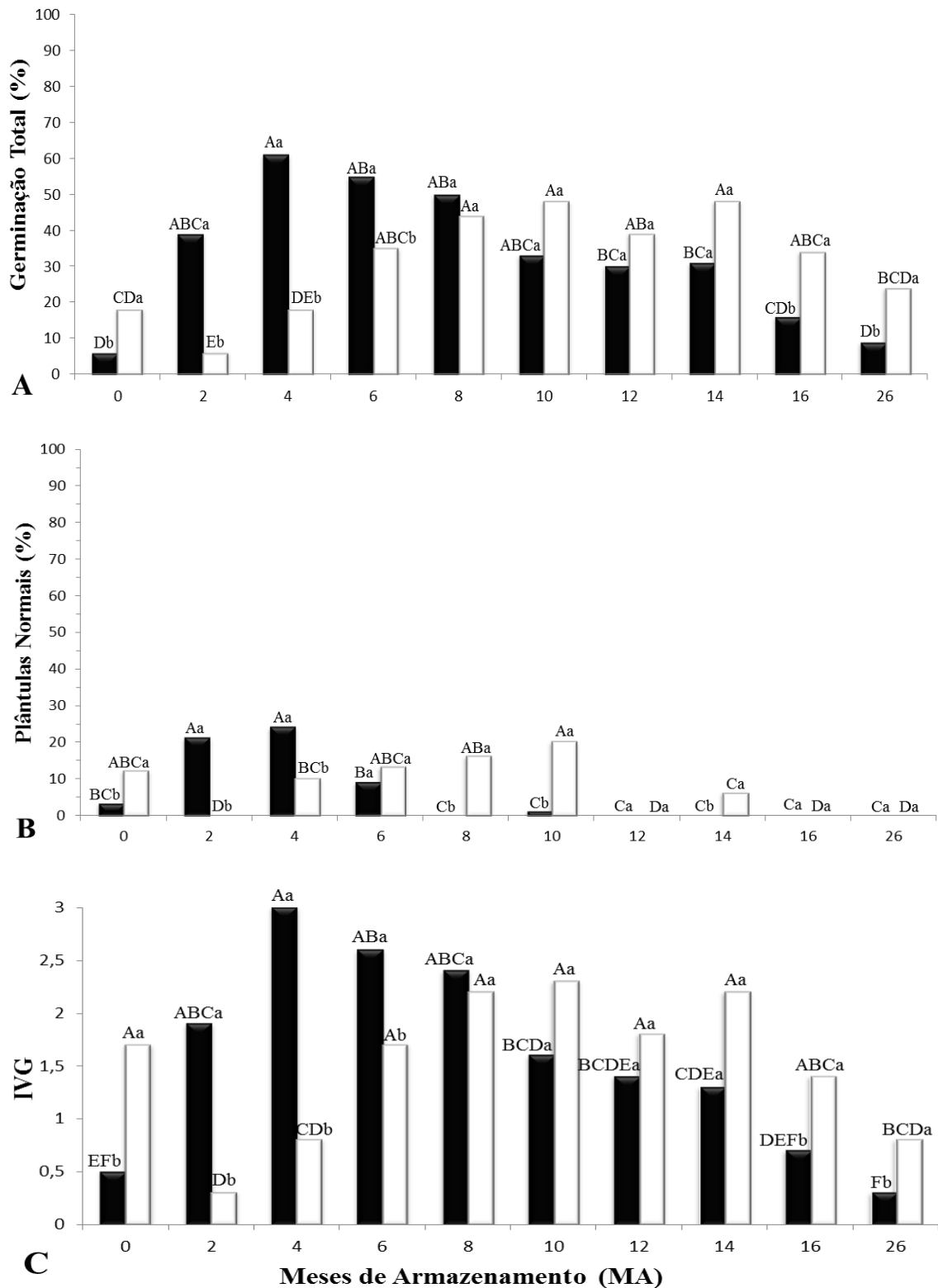
Os dados de teor de água das sementes encontram-se na tabela 2. A interação entre tratamento com etileno e períodos de armazenamento foi significativa para os testes de germinação e emergência (Fig. 1, 2 e 3). No teste de germinação verificou-se elevado nível inicial de dormência para as sementes controle (CT), que não alcançaram 5% de germinação após a colheita (Fig. 1 A). A dormência foi progressivamente perdida ao longo do tempo de armazenamento, até seis meses, com germinação mantendo-se até 16 meses. A partir de 12 meses, não se observou mais o desenvolvimento de plântulas normais (Fig. 1 B). O tratamento com etileno (ET) promoveu a superação da dormência mais rápida aos quatro meses de armazenamento; no entanto, acelerou a deterioração e antecipou a perda da capacidade de desenvolver plântulas normais, assim como a de protrusão de raiz, aos 26 meses de armazenamento (Fig. 1 A e B). Os resultados obtidos no teste realizado com fungicida foram similares (Fig. 2 A e B), embora a aplicação de fungicida em sementes ET não armazenadas não tenha resultado em melhora na germinação ou desenvolvimento de plântulas normais e, ainda, reduziu em relação às sementes CT (Fig. 2 A e B). A aplicação de fungicida ocasionou maior porcentagem de plântulas normais às sementes CT, especialmente, dos seis aos 10 meses de armazenamento (Fig. 2 B).

**Tabela 2.** Teor de água (base úmida) das sementes de amendoim forrageiro tratadas (ET) e não tratadas com ethephon (CT) durante os meses de armazenamento.

Meses de Avaliação	Teor de água (%)	
	ET	CT
0	5,8	5,5
2	6,0	5,9
4	7,2	7,1
6	7,2	7,1
8	6,3	6,8
10	5,4	5,6
12	5,9	6,0
14	5,1	5,1
16	6,1	6,1
26	5,8	6,1

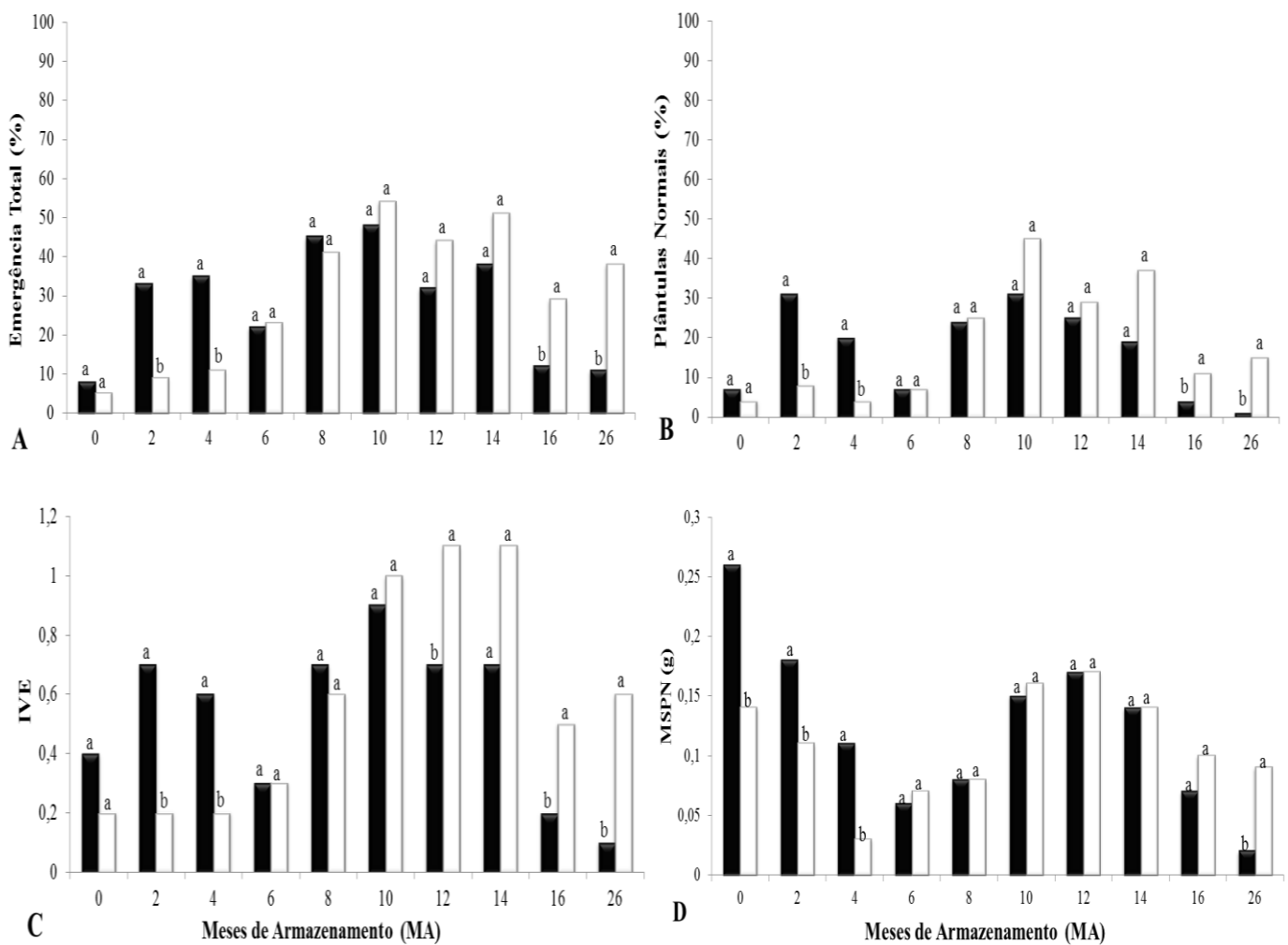


**Figura 1.** Germinação total (A), plântulas normais (B) e índice de velocidade de germinação - IVG (C) em teste de germinação, sem fungicida, de sementes de amendoim forrageiro tratadas (ET), colunas pretas, e não tratadas com ethephon (CT), colunas brancas, durante os meses de armazenamento (MA). Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre MA e minúscula entre ET e CT, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%). Coeficiente de Variação (%) = A (17,72), B (60,97) e C (9,41).



**Figura 2.** Germinação total (A), plântulas normais (B) e índice de velocidade de germinação - IVG (C), em teste de germinação, com fungicida, de sementes de amendoim forrageiro tratadas (ET), colunas pretas, e não tratadas com ethephon (CT), colunas brancas, durante os meses de armazenamento (MA). Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre MA e minúscula entre ET e CT, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%). Coeficiente de Variação (%) = A (14,71), B (20,30) e C (8,28).

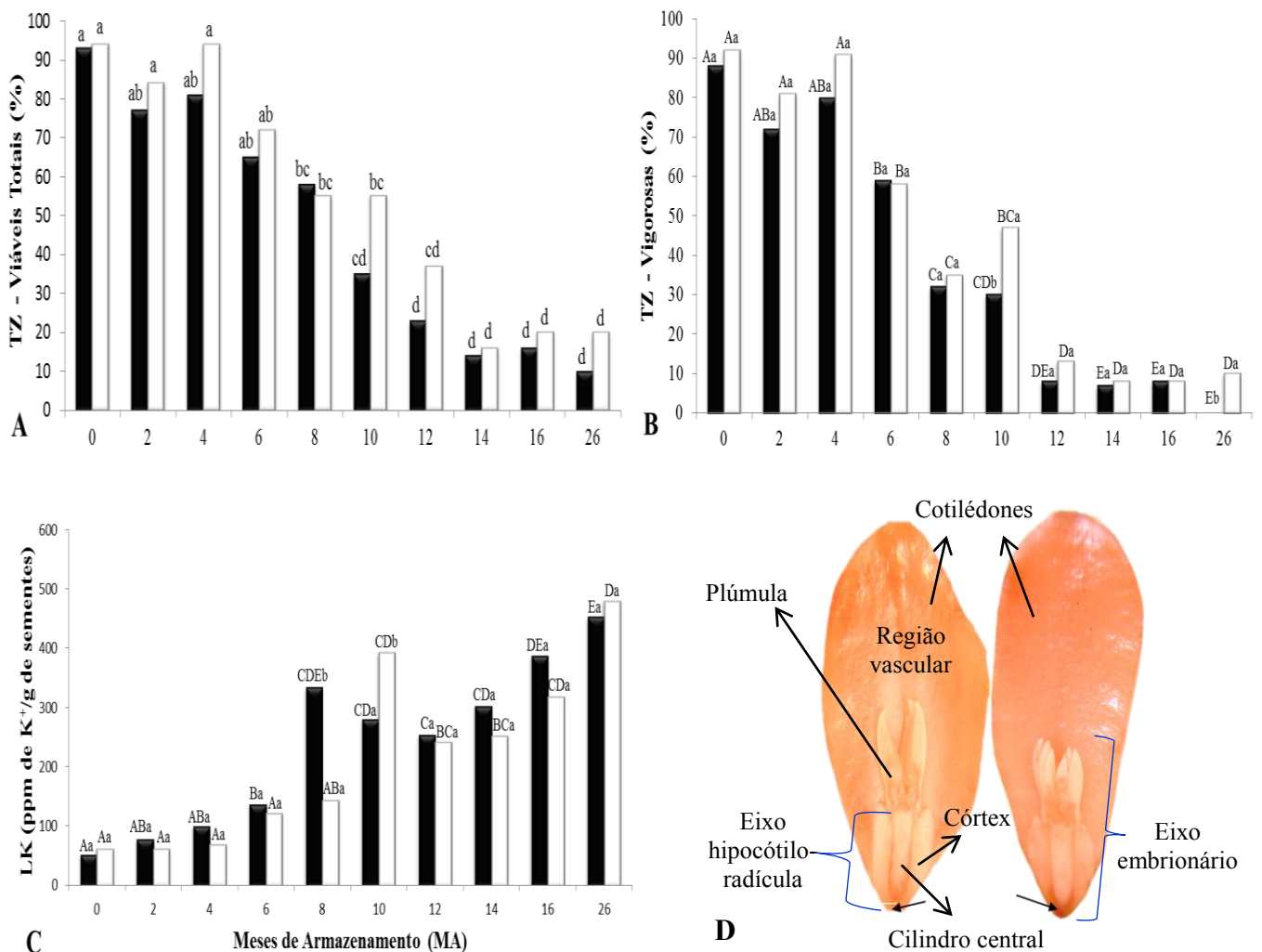
No teste de emergência, foram observadas variações elevadas de temperatura na casa de vegetação entre os meses de armazenamento, assim não foram considerados os efeitos do fator período de armazenamento e a comparação das médias foi feita apenas entre os tratamentos ET e CT (Fig. 3). O tratamento das sementes recém colhidas com etileno não afetou a emergência. A partir do 2º mês de armazenamento, a viabilidade e o vigor avaliados pelo teste de emergência (Fig. 3 A e B) equipararam-se ao apresentado no teste de germinação sem fungicida (Fig. 1 A e B), tanto para sementes ET, quanto CT.



**Figura 3.** Emergência total (A), plântulas normais (B), em porcentagem, índice de velocidade de emergência - IVE (C) e massa seca de plântula normal – MSPN (D), em grama, durante o teste de emergência de sementes de amendoim forrageiro tratadas (ET), colunas pretas, e não tratadas com ethephon (CT), colunas brancas, durante os meses de armazenamento (MA). Médias seguidas pela mesma letra entre ET e CT, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%). Coeficiente de Variação (%) = A (18,60), B (20,62), C (19,34) e D (1,17).

Quanto ao IVE as sementes ET apresentaram redução do vigor em relação às sementes CT a partir do 12º mês de armazenamento (Fig. 3 C). Cumpre mencionar que, diferentemente do observado nos testes de germinação, no de emergência o desenvolvimento de plântulas normais não foi zerado durante o armazenamento e, sim, aumentado (Fig. 3 B), possivelmente pela interferência dos fatores climáticos referidos acima.

Não foram verificadas significâncias na interação entre fatores e nem entre tratamentos ET e CT para o teste de viabilidade em tetrazólio (Fig. 4 A).



**Figura 4.** Sementes viáveis totais (A) e vigorosas (B), segundo o teste de tetrazólio (TZ), e lixiviação de potássio – LK (C) de sementes de amendoim forrageiro tratadas (ET), colunas pretas, e não tratadas com ethephon (CT), colunas brancas, durante os meses de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre MA e minúscula entre ET e CT, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%). Não houve interação entre fatores em (A). Coeficiente de Variação (%) = A (22,18), B (20,76) e C (11,70). Corte longitudinal através dos embriões de *Arachis pintoi* coloridos após reação com o sal de tetrazólio (D). Sementes vigorosas com a ponta da radícula apresentando um vermelho mais intenso, porém, sem afetar o cilindro central.



Conforme o teste de tetrazólio (Fig. 4 A e B) e lixiviação de potássio (Fig. 4 C), observou-se que o vigor das sementes ET e CT se manteve alto e inalterado nas três primeiras avaliações, inclusive, com a viabilidade e o vigor próximos de 100% e cerca de 90%, respectivamente, para tetrazólio.

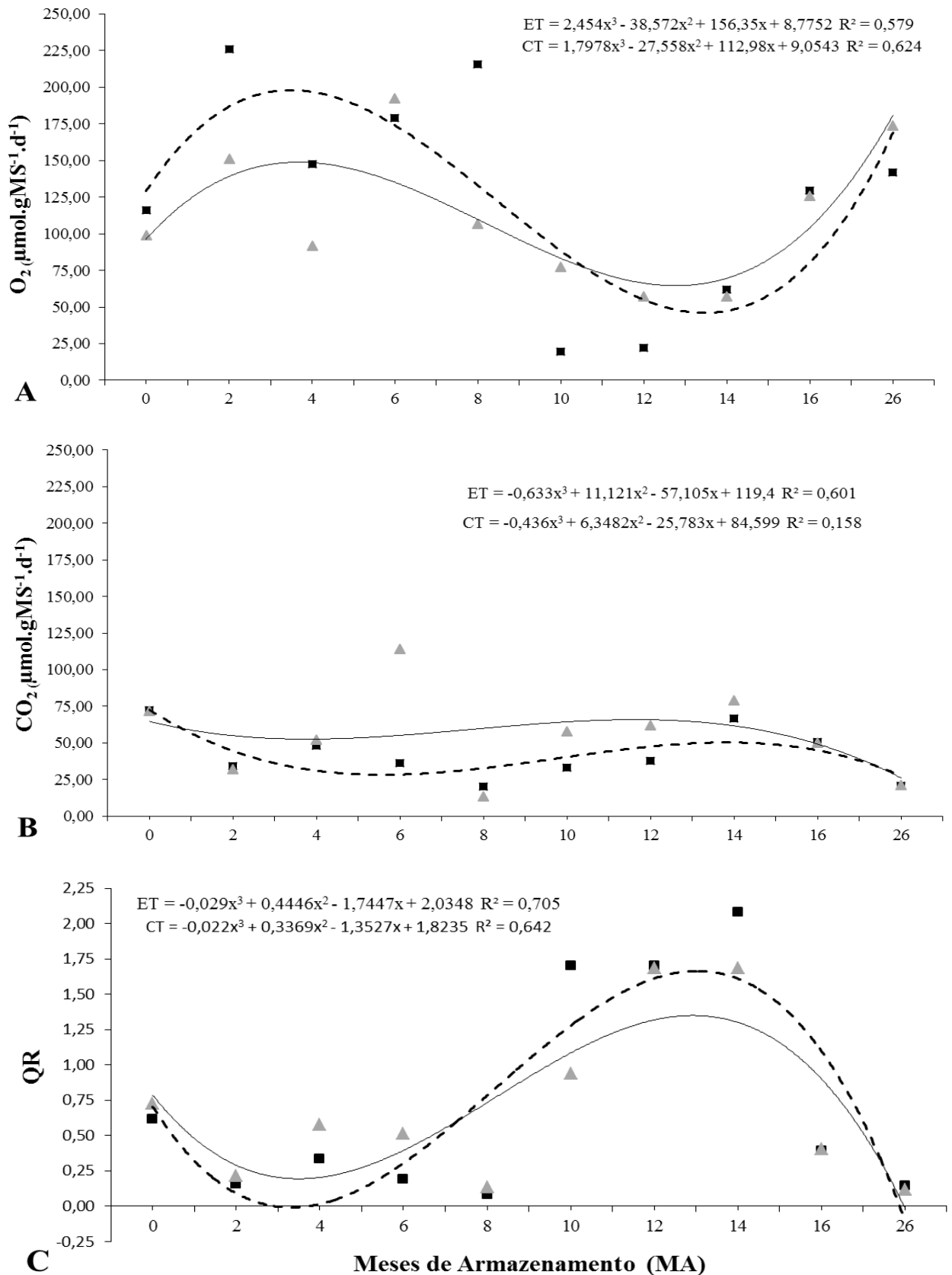
O vigor pelo teste de tetrazólio apresentou redução em relação a sementes recém colhidas no 6º e 8º mês de armazenamento e, novamente, no 12º mês, mantendo valores próximos a 10% até o último período de armazenamento, quando não foram mais encontradas sementes ET vigorosas (Fig. 4 B). Em relação ao teste de lixiviação de potássio, a diferença em relação às sementes recém colhidas para sementes ET foi no 6º mês de armazenamento e para sementes CT foi no 10º mês de armazenamento.

Os valores de consumo de O<sub>2</sub> mantiveram-se elevados, enquanto os de CO<sub>2</sub> foram relativamente baixos, para ambos os tratamentos (ET e CT) até os oito meses de armazenamento (Fig. 5 A e B). A partir desse momento houve queda de consumo de O<sub>2</sub> e aumento na liberação de CO<sub>2</sub> até aproximadamente 14 meses, quando os valores de O<sub>2</sub> voltaram a subir e os de CO<sub>2</sub> mantiveram-se baixos. Com este padrão de respiração, o quociente respiratório (QR) para as sementes em ambos os tratamentos manteve-se inferior a 1,0 até o 8º mês e nos dois últimos meses de armazenamento (Fig. 5 C). O QR apresentou valores acima de 1,0 do 10º ao 14º mês de armazenamento.

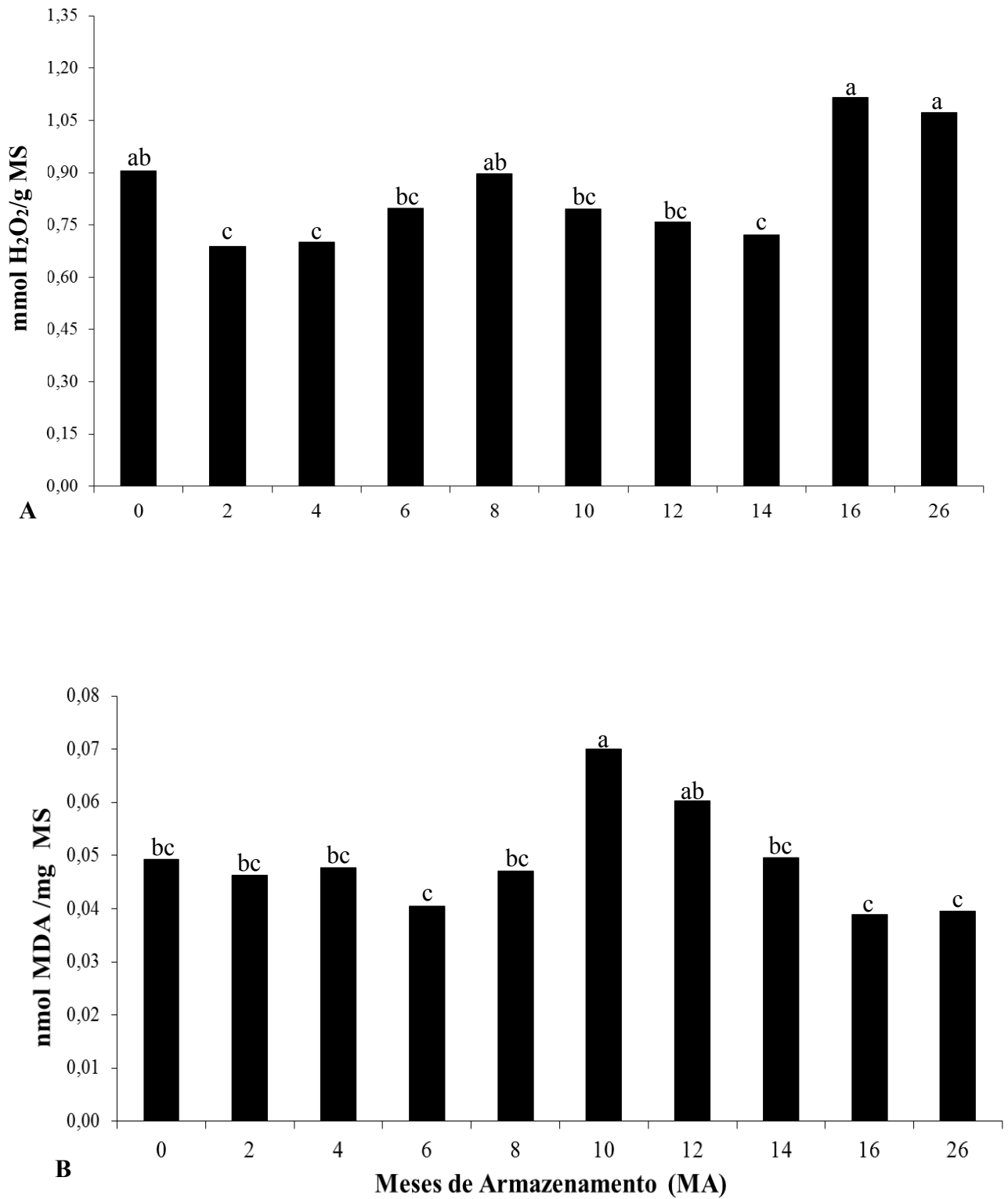
Para o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA, não ocorreu interação significativa entre fatores, assim como não houve diferença entre os tratamentos ET e CT (Fig. 6). Desse modo, os valores expressos nos gráficos representam as médias entre sementes ET e CT.

O teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas sementes reduziu nos primeiros quatro meses de armazenamento e aumentou novamente aos seis meses, igualando-se ao encontrado nas sementes recém colhidas e permaneceu até o 14º mês de armazenamento (Fig. 6 A). No entanto, nos dois últimos meses, o nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou novamente, atingindo valores iguais ao observado nas sementes recém colhidas e nas sementes armazenadas aos 8 meses.

O teor de MDA das sementes manteve-se inalterado durante os oito primeiros meses de armazenamento (Fig. 6 B). Aos 10 meses foi verificada alteração, atingindo pico de concentração, que permaneceu por mais dois meses. Na sequência, o teor de MDA caiu em relação ao 10º mês de armazenamento a valores equivalentes ao encontrado nas sementes recém colhidas e manteve-se até o último mês de armazenamento.



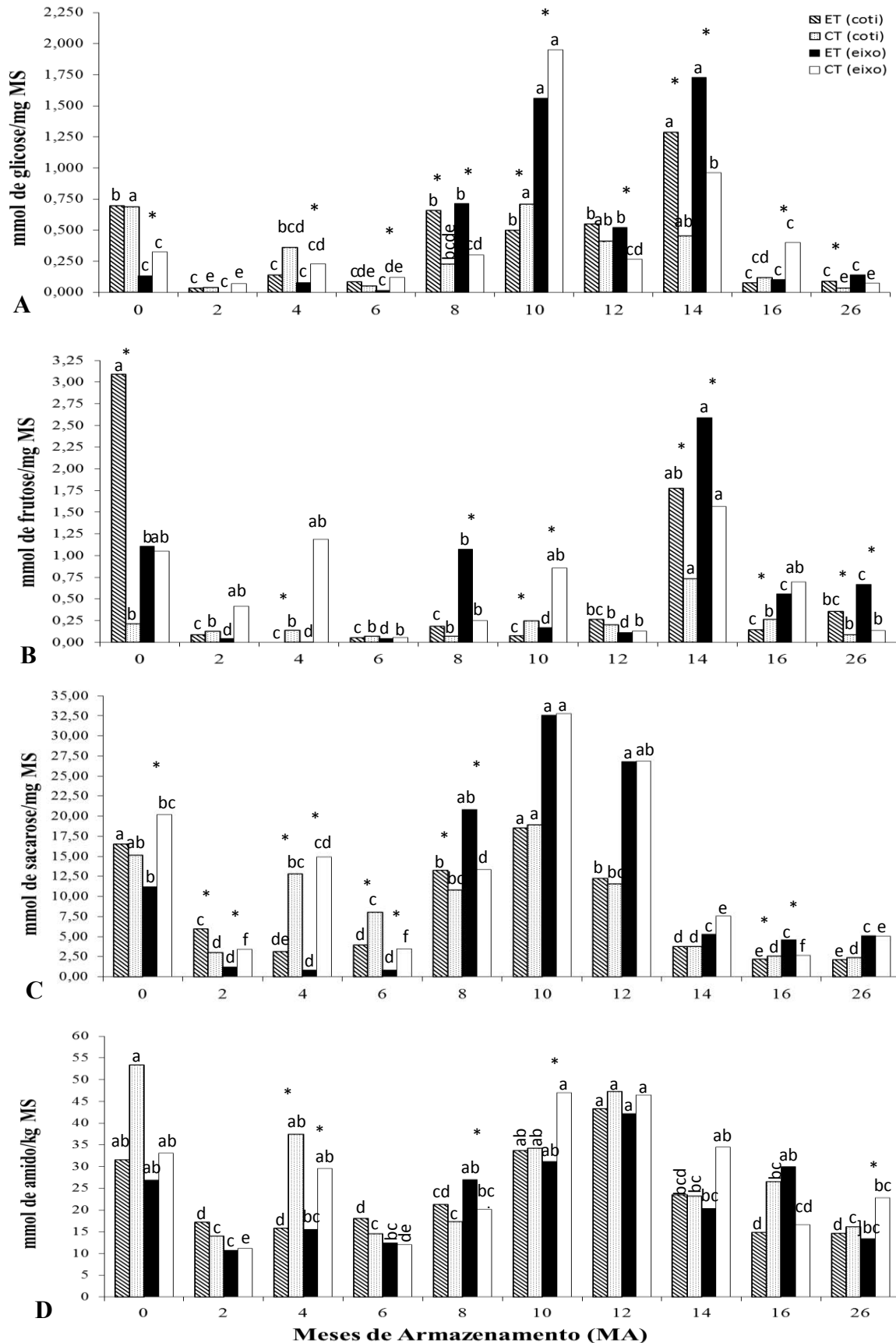
**Figura 5.** Consumo de  $O_2$  (A), liberação de  $CO_2$  (B), em  $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , e quociente respirat3rio – QR (C) de sementes de amendoim forrageiro tratadas com ethephon (ET), quadrado preto, e n3o tratadas com ethephon (CT), tri4ngulo cinza, com 21% de 3gua, durante os meses de armazenamento. Linhas de tend4ncia da an3lise de regress3o polinomial (c3bica): ET tracejado e CT cont3nua.



**Figura 6.** Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (A) e malonaldeído (MDA) (B) de cotilédone de amendoim forrageiro durante os meses de armazenamento (média entre sementes ET e CT). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%). Coeficiente de Variação (%) = A (6,16) e B (11,65).

Para avaliações de açúcares redutores (glicose e frutose), açúcar solúvel não redutor (sacarose) e de oligossacarídeo (amido), houve interação significativa entre os fatores (Fig. 7). Na avaliação dos teores de glicose dos cotilédones verificou-se redução no 2º mês de armazenamento das sementes de ambos os tratamentos, ET ou CT (Fig. 7 A). Os teores de glicose dos cotilédones das sementes ET mantiveram-se estáveis até o 8º mês, quando foi observada recuperação e manutenção até o 12º mês de armazenamento. No entanto, no 14º mês verificou-se pico do açúcar e um novo declínio nos dois últimos meses de armazenamento, equiparando-se aos valores encontrados durante o período de dois a seis meses de armazenamento. Comparando-se o teor de glicose dos cotilédones entre sementes ET e CT, observou-se diferença no 8º, 10º e 14º mês, com destaque para as sementes ET, exceto no 10º mês, em que as sementes CT apresentaram maior teor de glicose. Nas sementes CT, só houve recuperação aos 10 meses, mantendo-se estável até o 14º mês de armazenamento. Do mesmo modo que nas sementes ET, nos cotilédones das sementes CT, os teores de glicose decresceram nos dois últimos meses, equiparando-se aos valores encontrados durante o período de dois a seis meses de armazenamento. Quanto ao eixo embrionário, diferentemente do que ocorreu nos cotilédones das sementes ET, não verificou-se redução nos valores obtidos no 2º mês de armazenamento das sementes ET, mas também se mantiveram inalterados até o 8º mês de armazenamento, quando foi verificada elevação nos teores de glicose, superando ao encontrado nas sementes recém colhidas. Dois meses após, o teor do açúcar subiu mais, apresentando picos aos 10 e 14 meses de armazenamento, também voltando a cair nos dois últimos meses de armazenamento.

Com relação às sementes CT, o teor de glicose do eixo embrionário também se manteve estável até o 8º mês de armazenamento, verificando-se elevação significativa aos 10 meses e, posteriormente, declínio e nova elevação aos 14 meses de armazenamento. Nos últimos meses de armazenamento, sofreu nova redução, com valores similares ao encontrado nos dois primeiros meses. Comparando-se o teor de glicose dos eixos embrionários das sementes ET e CT, observou-se diferença após a colheita e do 4º ao 16º mês de armazenamento. As sementes ET apresentaram maior teor de glicose no 8º, 12º e 14º mês de armazenamento e as sementes CT, após a colheita, no 4º, 6º, 10º e 16º mês de armazenamento.



**Figura 7.** Glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D) de cotilédone (coti) de amendoim forrageiro tratados (ET), colunas tracejadas, e não tratados com ethephon (CT), colunas pontilhadas, e eixos embrionários (eixo) ET, colunas pretas, e CT, colunas brancas, durante os meses de armazenamento (MA). A análise estatística compara as médias de cotilédone e eixo embrionário separadamente. Médias seguidas pela mesma letra entre MA, ou não assinaladas com \* entre ET e CT, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%). C.V. (%) = **A** (cotilédone = 5,00), **A** (eixo = 4,06), **B** (cotilédone = 18,31), **B** (eixo = 14,72), **C** (cotilédone = 10,63), **C** (eixo = 6,21), **D** (cotilédone = 15,25), **D** (eixo = 11,26).

Na avaliação de frutose, também observou-se redução nos valores encontrados nos cotilédones de sementes ET, no 2º mês de armazenamento (Fig. 7 B). Porém, não houve alteração nos valores de frutose durante os 12 meses seguintes. Aos 14 meses foi verificada recuperação e posterior redução durante os dois últimos meses de armazenamento. Nas sementes CT não ocorreu redução no teor de frutose em relação às sementes recém colhidas, mas também se manteve inalterado durante os dozes meses subsequentes. Do mesmo modo que ocorreu nas sementes ET, o teor de frutose dos cotilédones das sementes CT também atingiu pico aos 14 meses, com posterior redução as 16 e 26 meses de armazenamento. Comparando-se o cotilédone das sementes ET e CT, as sementes ET apresentaram maior teor de frutose após a colheita, no 14º e no 26º mês de armazenamento e as sementes CT no 4º, 10º, e 16º mês. Com relação aos eixos embrionários, os teores de frutose das sementes recém colhidas de ambos os tratamentos foram similares. No entanto, reduziram significativamente a partir do segundo mês de armazenamento, com picos em sementes CT aos 4, 10, 14 e 16 meses e em sementes ET aos 8, 14 e 26 meses de armazenamento. Vale ressaltar que em ambos os tratamentos, tanto em cotilédone quanto em eixo embrionário, destacam-se picos nos teores de frutose aos 14 meses de armazenamento. Comparando-se o eixo embrionário das sementes ET e CT, as sementes ET apresentaram maior teor de frutose no 8º, 14º e 26º mês de armazenamento e as sementes CT apenas no 10º mês de armazenamento.

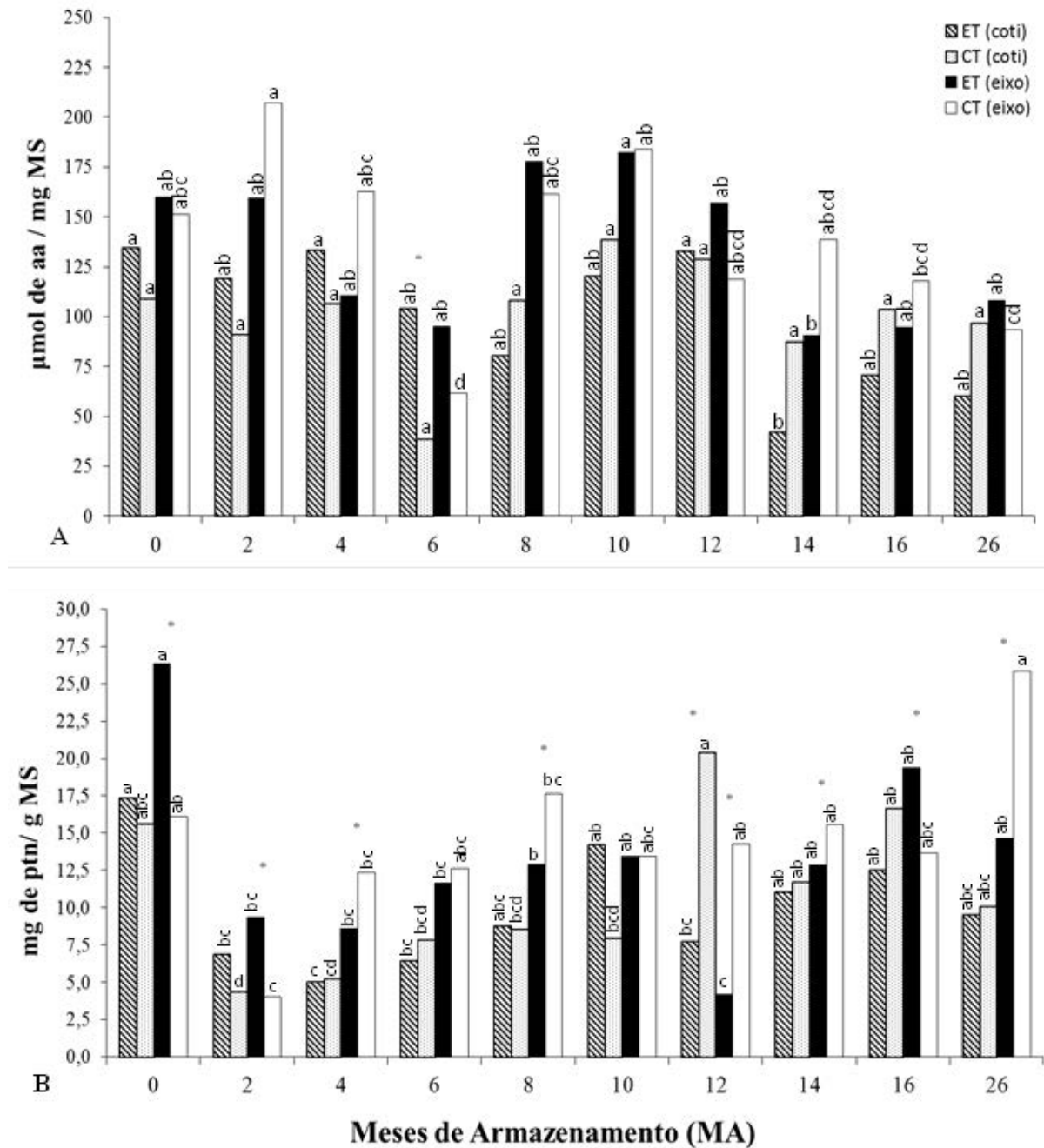
Nos resultados das avaliações de sacarose observou-se redução no teor do açúcar solúvel a partir do 2º mês de armazenamento das sementes ET e CT, tanto nos cotilédones quanto nos eixos embrionários (Fig. 7 C). Nas sementes ET do cotilédone, o teor de sacarose decresceu mais no 4º e 6º mês e na sequência apresentou recuperação gradativa aos oito e 10 meses de armazenamento, quando atingiu um novo pico, com valor igual ao encontrado antes do armazenamento. Na sequência, observou-se redução gradativa aos 12, 14 e 16 meses, mantendo-se até o final do armazenamento. Nos cotilédones das sementes CT, o valor de sacarose se recuperou no 4º mês de armazenamento e se manteve inalterado até o 8º mês. Aos 10 meses também atingiu um pico e o comportamento foi similar ao obtido nas sementes ET até o final do armazenamento. Comparando-se o cotilédone das sementes ET e CT, as sementes ET apresentaram maior teor de sacarose no 2º e 8º mês de armazenamento e as sementes CT no 4º, 6º e 16º mês. Com relação ao eixo embrionário das sementes ET, o teor de sacarose se manteve inalterado do 2º ao 6º mês. Aos oito meses, o teor de sacarose subiu e atingiu o mesmo valor encontrado antes do armazenamento. Aos 10 e 12 meses de armazenamento os valores se mantiveram estáveis, porém, superando o encontrado nos eixos

das sementes recém colhidas. Na sequência, os teores de sacarose reduziram expressivamente e, assim, se mantiveram até o final do armazenamento. Quanto aos teores de sacarose do eixo embrionário das sementes CT observaram-se oscilações até o 8º mês de armazenamento. Aos 10 meses, o teor de sacarose atingiu um pico, superando o encontrado nas sementes recém colhidas, mas mantendo-se pelos 2 meses seguintes. Do mesmo modo que no cotilédone, o teor de sacarose reduziu expressivamente a partir do 14º mês de armazenamento. Comparando-se o eixo embrionário das sementes ET e CT, as sementes ET apresentaram maior teor de sacarose no 8º e 16º mês de armazenamento e as sementes CT no 2º, 4º e 6º mês de armazenamento.

Quanto ao teor do polissacarídeo amido, também observou-se redução nos cotilédones e eixos embrionários das sementes ET e CT no 2º mês de armazenamento (Fig. 7 D). Nos cotilédones das sementes ET, os valores permaneceram iguais do 2º ao 8º mês de armazenamento, apresentando recuperação aos 10 e 12 meses, quando igualaram-se ao encontrado nas sementes recém colhidas. No 14º mês verificou-se redução em relação ao 12º mês e no período de 16 a 26 meses houve nova queda, igualando-se ao encontrado durante o período de 2 a 6 meses de armazenamento. Quanto aos cotilédones das sementes CT, os valores oscilaram até o 6º mês e manteve-se inalterado até o 8º mês de armazenamento. No 10º e 12º mês, os valores se igualaram ao encontrado antes do armazenamento e a partir do 14º mês os teores de amido reduziram aos mesmos patamares encontrados nos períodos de 2 a 8 meses de armazenamento. Comparando-se o cotilédone das sementes ET e CT, observou-se diferença entre os tratamentos apenas no 4º mês de armazenamento, com as sementes CT apresentando maior teor de amido do que as sementes ET. Com relação ao eixo embrionário, os teores de amido encontrados a partir das sementes ET se mantiveram estáveis do 4º ao 10º mês de armazenamento. Aos 12 meses, o teor de amido atingiu o seu pico, porém, não diferindo dos valores encontrados nos eixos das sementes recém colhidas e das armazenadas até o 8º e 10º mês de armazenamento. A partir deste ponto verificou-se redução nos teores de amido em relação ao 12º mês e manteve-se até o último mês de armazenamento. Com relação às sementes CT, o teor de amido do eixo embrionário subiu no 4º mês e desceu novamente no 6º mês, mantendo-se estável até o 8º mês de armazenamento. Do 10º ao 14º mês, o teor de amido manteve-se igual ao encontrado antes do armazenamento e, na sequência, os valores oscilaram até o último mês de armazenamento. Comparando-se o eixo embrionário das sementes ET e CT, as sementes ET apresentaram maior teor de amido apenas no 8º mês de

armazenamento. Já as sementes CT, apresentaram maior teor de amido no 4º, 10º e 26º mês de armazenamento.

Com relação aos compostos nitrogenados, também houve interação significativa entre os fatores (Fig. 8). No entanto, poucas diferenças foram encontradas no teor de aminoácidos solúveis totais dos cotilédones e eixos embrionários entre tratamentos ET e CT e entre períodos de armazenamento (Fig. 8 A).



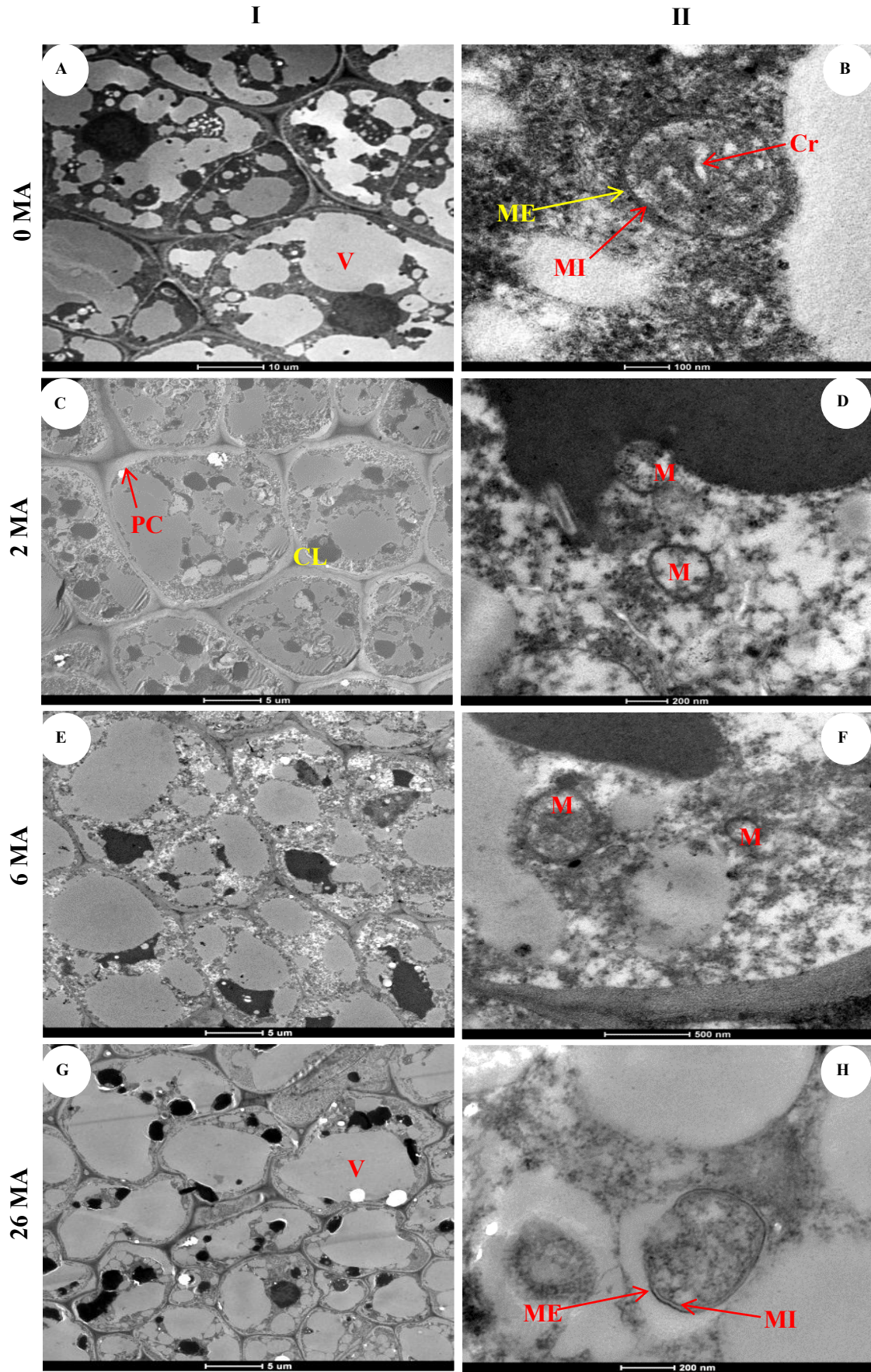
**Figura 8.** Aminoácido (A) e proteína (PTN) (B) de cotilédone (coti) de amendoim forrageiro tratados com ethephon (ET), colunas tracejadas, e não tratados com ethephon (CT), colunas pontilhadas, e eixos embrionários (eixo) ET, colunas pretas, e CT, colunas brancas, durante os meses de armazenamento (MA). A análise estatística compara as médias de cotilédone e eixo embrionário separadamente. Médias seguidas pela mesma letra entre MA, ou não assinaladas com \* entre ET e CT, não diferem significativamente entre si (Tukey, 5%). C.V. (%) = **A** (cotilédone = 29,52), **A** (eixo = 34,21), **B** (cotilédone = 7,82) e **B** (eixo = 14,85).



No 6º mês de armazenamento, os cotilédones das sementes ET apresentaram maior teor de aminoácido do que as sementes CT. No 14º mês foram encontrados menos aminoácidos nos cotilédones das sementes ET em relação às sementes recém colhidas e as sementes armazenadas por 4 e 12 meses e nos eixos embrionários das sementes ET em relação às sementes armazenadas por 10 meses. No eixo embrionário das sementes CT a concentração de aminoácidos se manteve estável até o 14º mês de armazenamento, com exceção do 6º mês. No 16º mês, o teor de aminoácidos reduziu apenas em relação ao 2º mês de armazenamento e no último mês diminuiu novamente, diferindo do 2º e do 10º mês de armazenamento.

Por outro lado, o teor de proteínas sofreu redução acentuada aos dois meses de armazenamento em relação às sementes recém colhidas, tanto para cotilédone quanto para eixo embrionário, independentemente dos tratamentos (Fig. 8 B). Em relação aos cotilédones das sementes ET recém colhidas, apenas as armazenadas do 2º ao 6º mês e no 12º mês de armazenamento apresentaram menor teor de proteína. Em contrapartida, nas sementes CT foi verificada recuperação a partir do 4º mês de armazenamento, com novo pico no teor de proteína aos 12 meses de armazenamento, porém não superando o encontrado nas sementes recém colhidas e mantendo-se até o final do período. Com relação ao eixo embrionário, foi verificada recuperação no teor de proteínas das sementes ET a partir do 10º mês de armazenamento. Nas sementes CT, a recuperação se deu já no 4º mês, sem alterações significativas nos demais meses subsequentes, com exceção no 26º mês de armazenamento.

Na avaliação em microscopia eletrônica de transmissão de cortes ultrafinos da ponta da radícula foram verificadas alterações morfológicas nas células e mitocôndrias de sementes de *A. pinto* armazenadas por 2, 6 e 26 meses em relação às de sementes recém colhidas, porém, as membranas internas e externas das mitocôndrias se preservaram (Fig. 9). Não foram detectadas diferenças relevantes entre sementes ET e CT. Nas sementes recém colhidas observam-se células intactas, inclusive com divisões celulares (Fig. 9 A). Observa-se, também, mitocôndria com as membranas externa e interna e as cristas mitocondriais preservadas (Fig. 9 B). Entretanto, a partir do segundo mês de armazenamento, já não foi mais possível distinguir as cristas das mitocôndrias e a matriz apresenta-se pouco densa (Fig. 9 D, F e H). No tecido da radícula das sementes armazenadas aos seis meses, observam-se células com ligeiras alterações no formato (Fig. 9 E). Aos 26 meses de armazenamento foi verificada desorganização celular mais evidente, além de vacúolos maiores, ocupando quase todo o espaço intracelular (Fig. 9 G).



**Figura 9.** Micrografias da microscopia eletrônica de transmissão de cortes ultrafinos de eixos embrionários de amendoim forrageiro durante os meses de armazenamento (MA). Coluna I representa visão geral das células e coluna II detalhe das mitocôndrias. (A e B) período pós-colheita, ou 0 MA, (C e D) 2 MA, (E e F) 6 MA, (G e H) 26 MA. CL = corpo lipídico, V = vacúolo, PC = parede celular, MI = membrana interna da mitocôndria, ME = membrana externa da mitocôndria, Cr = crista, M = mitocôndria.

## DISCUSSÃO

O tratamento com ethephon demonstrou-se eficaz na superação da dormência em sementes de *A. pintoii*; por outro lado, a aplicação do fungicida não só inibiu a superação da dormência como também reduziu a porcentagem de germinação de sementes recém colhidas. Efeito semelhante foi também verificado em sementes de *A. hypogaea*, cv. IAC-Caiapó (FERNANDES, 2007), indicando que o tratamento de sementes com fungicida pode alterar a ação ou disponibilidade do etileno. Nesse contexto, o efeito de um fungicida do grupo da estrobilurina na síntese e ação do etileno foi observado em sementes de trigo (GROSSMANN; RETZLAFF, 1997). Os autores propuseram que o fungicida inibe a síntese de etileno, já que foi observada redução nos níveis de auxina, que regula a síntese *de novo* da ACC-sintase, e redução da própria atividade desta enzima, que catalisa uma das etapas de síntese de etileno (ARGUESO et al., 2007).

Após dois meses de armazenamento, muitas das sementes tratadas com ethephon apresentaram superação da dormência (atingindo cerca de 60% de germinação aos quatro meses), mesmo com aplicação de fungicida durante o teste de germinação (Fig. 1 A e 2 A). Assim, é plausível sugerir que o fungicida aplicado imediatamente após o regulador vegetal tenha interferido na oxidação do ácido 2-cloroetilfosfônico (ethephon) a etileno. Pois, em sementes tratadas com ethephon e armazenadas, a conversão ocorreu sem interferências e o etileno pôde atuar na superação da dormência. Possivelmente, também estimulou novas sínteses de etileno endógeno, visto que, sementes dormentes tratadas com etileno exógeno também passam a produzir etileno no próprio embrião (KETRING; MORGAN, 1969) o que poderia explicar, ao menos parcialmente, porque sementes ET foram superando a dormência gradativamente ao longo dos primeiros meses de armazenamento.

Embora a natureza exata da interação entre o metabolismo hormonal e a germinação em sementes de *A. pintoii* não tenha sido completamente elucidada no presente trabalho, a conexão entre esses processos parece bastante evidente, uma vez que a aplicação exógena de ethephon foi eficiente na superação da dormência das sementes. Resultados similares já foram previamente observados em sementes de *A. hypogaea*, embora sem armazenamento (KETRING; MORGAN, 1969), e em sementes de *A. pintoii*, durante armazenamento em temperatura controlada (ASSIS et al., 2013a, b). Não obstante, os resultados aqui discutidos demonstram que durante a superação da dormência, mediada ou não pelo etileno, a deterioração das sementes é acelerada durante o armazenamento. De maneira interessante, em

sementes não tratadas com etileno o avanço na deterioração também se iniciou antes da superação máxima da dormência, embora de forma mais suave e lenta.

Cumprir mencionar que a antecipação da deterioração mediada pelo etileno pode ter ocorrido de forma indireta, por acelerar a perda de dormência, ou direta, por estimular a produção de ERO (BAILLY, 2004). Porém, no presente trabalho, não foi observado aumento na produção de  $H_2O_2$  em função da aplicação exógena de etileno ou do armazenamento (Fig. 6 A). No entanto, outras ERO, radicais livres e compostos tóxicos, não avaliados aqui, podem ter sido produzidos, afetando a integridade das membranas e contribuindo para os primeiros eventos na deterioração das sementes (WALTERS et al., 2010), como foi verificado com o aumento da lixiviação de potássio para as sementes ET e CT aos seis e 10 meses de armazenamento, respectivamente, e redução na capacidade de desenvolver plântulas normais, também aos seis meses, para as sementes ET, e aos 12 meses para as sementes CT. A presença de células com ligeiras alterações na morfologia, também a partir dos seis meses (Fig. 9 E), pode sugerir que as membranas já estivessem com dificuldades de se reorganizar mediante a embebição de água. Testes baseados na integridade das membranas, como o teste de lixiviação de potássio, estabelecem que sementes menos vigorosas (ou mais deterioradas) apresentam menor restabelecimento da integridade das membranas celulares durante a embebição e, em consequência, liberam maiores quantidades de solutos para o meio exterior (HAMPTON; TEKRONY, 1995; MARTINELLI-SENEME, 2004). Assim, o aumento da lixiviação de potássio ao longo do armazenamento, assim como o aumento dos tecidos em deterioração verificados no teste de tetrazólio em sementes de *A. pintoi* de ambos os tratamentos (ET e CT) indicam a evolução na desestruturação dos sistemas de membranas com o tempo de armazenamento, principalmente após o 6º mês e pode esclarecer o desenvolvimento de um pequeno número de plântulas normais.

Isso ocorre, uma vez que radicais livres produzidos reagem com os lipídios das membranas e acabam por destruir a sua estrutura, afetando, inclusive, organelas importantes como as mitocôndrias (BENAMAR et al., 2003; TIAN et al., 2008) e, conseqüentemente, a respiração celular, assim como as substâncias de reserva das sementes (Mc DONALD, 1999). Conforme o aumento do grau de deterioração, as membranas das cristas mitocondriais sofrem os primeiros danos, tornando-se indistinguíveis, e, em seguida, a matriz apresenta-se menos densa e menos homogênea (BENAMAR et al., 2003). Nesse contexto, vale ressaltar que no 2º mês de armazenamento foram verificados os primeiros danos às cristas mitocondriais, independentemente dos tratamentos com ET ou CT (Fig. 9 D). Durante todo este período de

armazenamento (2 a 8 meses), assim como nos dois últimos meses, as sementes apresentaram altos níveis de consumo de O<sub>2</sub> e baixa liberação de CO<sub>2</sub>, resultando em valores de QR abaixo de 0,5 (Fig. 5 C), podendo indicar reações oxidativas (LAMARCA; BARBEDO, 2012), possivelmente não respiratória, como a peroxidação de lipídios, com possível formação de ROS (VERTUCCI; LEOPOLD, 1987) e aumento da deterioração. Diferente do que ocorreu nas sementes recém colhidas, quando os valores de QR eram próximos de 0,7, indicando atividade respiratória de via aeróbica (KADER; SALTVEIT, 2002) e que ácidos graxos tenham possivelmente sido utilizados como substrato respiratório (TCHERKEZ *et al.*; 2003). A partir do 10<sup>o</sup> mês, até o 14<sup>o</sup> mês de armazenamento, o consumo de O<sub>2</sub> diminuiu consideravelmente e o QR saltou a valores próximos a dois, indicando atividades fermentativas e baixo vigor das sementes (ABDUL-BAKI, 1980). Ademais, a peroxidação de lipídios avaliada no presente trabalho através da determinação de MDA, mostrou-se mais evidente nesse mesmo período, ou seja, entre o 10<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> mês de armazenamento. As evidências na atividade respiratória e teor de MDA podem justificar o aumento no teor de carboidratos solúveis não redutores entre o 10<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> mês de armazenamento e dos açúcares redutores no 10<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> mês de armazenamento, visto que, em sementes oleaginosas, os lipídios são consumidos primeiro, com conversão em carboidratos (LABOURIAU, 1983, BONOME, 2006). Em sementes de espécies oleaginosas, a peroxidação lipídica parece apresentar estreita associação com o nível de MDA e o envelhecimento de sementes, como em soja (SUNG, 1996), amendoim (SUNG; JENG, 1994) e girassol (BAILLY *et al.*, 1996). Bailly *et al.* (1996) sugerem, ainda, que, a deterioração de sementes, associada com a peroxidação lipídica, também pode estar associada com redução da eficiência do sistema de defesa antioxidante. Sobretudo, o ácido graxo linoleico é mais suscetível à oxidação por radicais livres (SATTLER *et al.*, 2004) e as sementes de *A. pintoi* apresentam alto nível desse ácido graxo, cerca de 45% do total de ácidos graxos, que é de, aproximadamente 50% (GROSSO *et al.*, 2000).

Salienta-se aqui que a germinação das sementes de *A. pintoi* nunca atingiram sequer 70%, em quaisquer dos tratamentos e, mais do que isto, não atingiram 30% de plântulas normais, que, curiosamente, representa a metade do mínimo exigido pela Instrução Normativa N<sup>o</sup> 30 para a comercialização de sementes da espécie (BRASIL, 2008). Aos seis meses, as plântulas normais produzidas por sementes ET despencaram para 5%. Diante dos fatos até aqui apresentados e discutidos, é plausível afirmar que os processos de superação de dormência e deterioração tenham ocorrido simultaneamente. Os quatro meses de

armazenamento para a maior superação da dormência foram suficientes para a deterioração das primeiras sementes que tiveram a dormência superada, sobretudo por estarem expostas a condições não controladas de armazenamento.

Outras alterações a nível ultraestrutural só foram observadas aos 26 meses de armazenamento, quando as sementes perderam a capacidade de protrusão radicular, como o aumento no tamanho dos vacúolos, ocupando quase todo o espaço intracelular (Fig. 9 G), podendo significar acúmulo de proteínas (MARTY, 1999), justificando, assim, a não redução do teor de proteínas e aumento no teor de aminoácido, como seria de se esperar, com o tempo de armazenamento (LABOURIAU, 1983, BONOME, 2006). Observa-se, também, a desorganização celular mais evidente, embora ainda seja possível verificar preservação das membranas externa e interna da mitocôndria, como observado na fotomicrografia realizada com maior aumento (Fig. 9 H).

A partir do teste de tetrazólio (Fig. 4) foi possível verificar o alto potencial fisiológico em sementes dormentes e a perda de vigor com a morte gradativa dos tecidos ao longo do armazenamento, embora, a partir do 2º mês de armazenamento, imagens em microscopia eletrônica das células já mostravam alterações a nível mitocondrial (Fig. 9). Foi possível também observar coloração mais intensa na ponta da radícula, característica de maiores taxas respiratórias, inclusive em sementes vigorosas recém-colhidas, porém sem atingir o cilindro central (Fig. 4 D). Este padrão também foi observado nas sementes de *A. hypogaea* (BRASIL, 2009), o que parece ser uma característica do gênero, talvez pelo desenvolvimento subterrâneo das sementes. Ademais, o eixo embrionário é mais propenso ao envelhecimento, com evidências de mais radicais livres do que nos cotilédones e, entre as estruturas do eixo, a radícula é a mais sensível à deterioração (SHABAN, 2013). No processo de aceleração da deterioração (vermelho mais intenso) e morte dos tecidos (sem coloração), observamos uma sequência da deterioração nos cotilédones, próximo à região vascular (Fig. 4 D) e, mais adiante, a deterioração e morte dos tecidos da radícula, que atingiu o cilindro central, e, por fim, a morte dos tecidos do restante do cotilédone (Fig. 1, dados complementares).

Comparando-se duas espécies que apresentam algumas características similares, as sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), assim como a de *A. pintoii*, são tolerantes à dessecação e, se armazenadas com baixo teor de água e em temperatura ambiente, perdem rapidamente a capacidade germinativa, provavelmente, devido às elevadas taxas respiratórias e outros processos oxidativos (LAMARCA; BARBEDO, 2012). As sementes de pau-brasil apresentam elevado teor de lipídios (17,6%), com destaque para a grande quantidade do ácido

graxo linoleico (MELLO et al., 2010), que é altamente suscetível à oxidação por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (SATTLER et al., 2004). No entanto, embora as sementes de *A. pintoii*, possuam maior teor de lipídios (49,7%), inclusive do ácido graxo linoleico (GROSSO et al., 2000), é plausível sugerir que situações similares aconteçam nessas duas espécies.

Barbedo et al. (2013) consideraram que um dos fatores de redução da longevidade, especialmente nas sementes recalcitrantes, é o baixo grau de maturidade das sementes no momento do seu desprendimento da planta. Como as sementes de *A. pintoii* se desprendem facilmente da planta dentro do solo após o seu desenvolvimento (COOK; FRANKLIN, 1988), existe a possibilidade das sementes serem dispersas antes de atingirem o ponto máximo de maturidade fisiológica, embora não seja recalcitrante, e que, deste modo, os fatores de proteção e longevidade poderiam estar comprometidos. No entanto, quando comparadas às sementes de pau-brasil, que perdem a viabilidade em ambiente com temperaturas acima de 25°C em três meses de armazenamento (BARBEDO et al., 2002), as sementes de amendoim forrageiro conseguem preservar a viabilidade por mais tempo, como observado no presente estudo. O diferencial é que as sementes de *A. pintoii* são dormentes após a colheita e, talvez, por isso, consigam melhor desempenho, já que a dormência, segundo Barbedo et al. (2013), pode ser um fator de ampliação da capacidade de armazenamento. No entanto, há de se fazer uma ressalva, pois embora as sementes de amendoim forrageiro sejam mais longevas do que as sementes de pau-brasil, a perda do vigor e viabilidade durante o armazenamento é extremamente rápida, fato incomum para uma espécie com alto nível de dormência.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos indicam que a superação da dormência pode acelerar a deterioração das sementes de *A. pintoii*. No entanto, foi verificado que em condições de ambiente de armazenamento não controladas, alterações ultraestruturais das mitocôndrias, ocasionadas pela deterioração, se iniciam, aos dois meses, muito antes da superação total da dormência. Igualmente, alterações na permeabilidade seletiva das membranas e efeitos nos tecidos das sementes concorrem para a redução do número de plântulas normais, já visíveis a partir do 6º mês. Mais ainda, alterações mensuráveis de carboidratos, aminoácidos, proteínas e respiração, acompanhadas de aumento na peroxidação lipídica, foram verificadas a partir do 8º e 10º mês de armazenamento, quando as sementes, principalmente as tratadas com etileno, perderam a capacidade de produzir plântulas normais.

Processos oxidativos podem determinar a baixa longevidade natural dessas sementes e a dormência não representa uma ferramenta evolutiva para ampliar o seu potencial de armazenamento.



## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que a superação da dormência, embora ocorra lentamente, acelera a deterioração das sementes de *Arachis pinto* e os processos ocorrem simultaneamente, mediados por alterações nas mitocôndrias e nas taxas respiratórias. Em uma perspectiva aplicada, métodos artificiais podem antecipar a superação dessa dormência, mas aceleram a deterioração e, portanto, somente devem ser adotados quando próximos à semeadura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A.A. Biochemical aspects of seed vigor. **Hort Science**, v.15, p.765-771, 1980.
- AMATO, A.L.P.; MAIA, F.C.; MAIA, M. de S.; CAETANO, L.S.; SIMIONI, S.B.; CONTO, L. de; BONINI FILHO, R. de M. Estabelecimento de condições de luz e temperatura para germinação de sementes de amendoim forrageiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p.54-59, 2007.
- ARGUESO, C.T.; HANSEN, M.; KIEBER, J.J. Regulation of Ethylene Biosynthesis. **J Plant Growth Regul.**, v.26, p.92–105, 2007.
- ASSIS, G.M.L.; AZEVEDO, H.N.; SILVA, R.A. Germinação de sementes de Amendoim Forrageiro (*Arachis Pintoi*) tratadas com etefom por períodos prolongados de tempo. In: **XVIII Congresso Brasileiro de Sementes**, 2013, Florianópolis. Brasília: ABRATES, v.23, p.68, 2013a.
- ASSIS, G.M.L.; AZEVEDO, H.N.; SILVA, R.A. Germinação de sementes de Amendoim Forrageiro (*Arachis pintoi*) tratadas com etefom por períodos reduzidos de tempo. In: **XVIII Congresso Brasileiro de Sementes**, 2013, Florianópolis. Brasília: ABRATES, v.23, p.68, 2013b.
- ASSIS, G.M.L.; VALENTIM, J.F.; ANDRADE, C.M.S. DE. BRS Mandobi: a new forage peanut cultivar propagated by seeds for the tropics. **Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales**. v.1, p.39–41, 2013c.
- BAI, B.; SIKRON, N.; GENDLER, T.; KAZACHKOVA, Y.; BARAK, S.; GRAFI, G.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; FAIT, A. Ecotypic Variability in the Metabolic Response of Seeds to Diurnal Hydration–Dehydration Cycles and its Relationship to Seed Vigor. **Plant Cell Physiol**. v.53, p. 38–52, 2012.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**. v.14, p.93-107, 2004.
- BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in

- sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**. v.104, p.646–652, 1996.
- BARBEDO, C.J., BILIA, D.A.C. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). **Revista Brasileira de Botânica**. v.25, p.431-439, 2002.
- BARBEDO, C.J.; CENTENO, D. da C.; RIBEIRO, R. de C.L.F. Do recalcitrante seeds really exist? **Hoehnea**. v.40, p.583-593, 2013.
- BENAMAR, A.; TALLON, C.; MACHEREL, D. Membrane integrity and oxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing. **Seed Science Research**. v.13, p.35-45, 2003.
- BITTENCOURT, S.R.M.; VIEIRA, R.D. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de amendoim. In: KRZYANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap. 8,2, p.1-8.
- BONOME, L.T. DA S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. ADR de Juss) Müell-Arg.] durante o armazenamento**. 2006. Tese (doutorado em fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA, DNDV, CLAV, 2009. 399p.
- BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991.
- CARVALHO, N.M. de; SILVA, J.B. da; SILVEIRA, C.M. da; HORVAT, R.A. Método alternativo para submeter sementes de amendoim à solução de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.18-22, 2009.

- CME-UNESP. Protocolo de processamento de amostras para MET. Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/Home/UnidadesAuxiliares/CentrodeMicroscopiaEletronica-CME/protocolo-de-processamento-de-amostras-para-met.pdf>> CME-UNESP. Acesso em: 02 de janeiro de 2015.
- COOK, B.G.; FRNKLIN, T.G. Crop management and seed harvesting of *Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg. **Journal of Applied Seed Production**. v.6, p.26-30, 1988.
- CORBINEAU, F.; RUDNICKI, R.M; CÔME, D. Induction of secondary dormancy in sunflower seeds by high temperature. Possible involvement of ethylene biosynthesis. **Physiologia Plantarum**. v.73, p.368–373, 1988.
- CORBINEAU F.; XIA. Q; BAILLY, C; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. **Frontiers of Plant Science**. v.5, p.1-13, 2014.
- COSTA, L.H.; ROSSETTO, C.A.V. Rendimento e qualidade de sementes de amendoim forrageiro em diferentes épocas de colheita. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2358-2361, 2008.
- DELOUCHE, J.C. Seed deterioration. **Seed World**, v.92, p.14-15, 1963.
- DUDA, G.P.; GUERRA, J.G.M.; MONTEIRO, M.T.; DE-POLLI, H.; TEIXEIRA, M.G. Perennial herbaceous legumes as live soil mulches and their effects on C, N and P of the microbial biomass. **Scientia Agricola**. v.60, n.1, p.139-147, 2003.
- EL-MAAROUF-BOUTEAU, H., SAJJAD, Y., BAZIN, J., LANGLADE, N., CRISTESCU, S. M., BALZERGUE, S., BAUDOUIN, E.; BAILLY, C. Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. **Plant, Cell & Environment**. v.38, p.364–374, 2015.
- ESPINDOLA, J.A.A.; GUERRA, J.G.M.; PERIN,A.; TEIXEIRA, M.G.; ALMEIDA, D.L. DE; URQUIAGA, S.; BUSQUET, R.N.B. Bananeiras consorciadas com leguminosas herbáceas perenes utilizadas como coberturas vivas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.41, n.3, p.415-420, 2006.

- FERGUSON, J.E. Seed biology and seed systems for *Arachis pintoi*. In: KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. (Eds.). **Biology and Agronomy of Forage *Arachis***. Cali: CIAT, cap.11, 1994, p.122-133.
- FERNANDES, A.C. **Reguladores de crescimento na dormência e germinação de sementes de amendoim**. 2007. Tese (doutorado em agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.
- FERNIE, A.R.; ROSCHER, A.; RATCLIFFE, R.G.; KRUGER, N.J. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexoses phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**. v.212, p.250-263, 2001.
- GAY, C.; GEBICKI, J.M. A Critical Evaluation of the Effect of Sorbitol on the Ferric–Xylenol Orange Hydroperoxide Assay. **Analytical Biochemistry**, v.284, p.217–220, 2000.
- GROSSO, N.R.; NEPOTE, V.; GUZMA'N, C.A. Chemical Composition of Some Wild Peanut Species (*Arachis* L.) Seeds. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.806-809, 2000.
- HAMPTON, J.G.; TEKRONY, D.M. Handbook of vigour test methods. 3rd ed. Zürich: **ISTA**, 1995. 117p.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated Chloroplasts I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.126, p.189-198, 1968.
- ISSA, F.; DANIEL, F.; JEAN-FRANÇOIS, R.; HODO-ABOLO, T.; NDOYE, S.M.; TAHIR, D. A.; OUSMANE, N. Inheritance of fresh seed dormancy in Spanish-type peanut (*Arachis hypogaea* L.): bias introduced by inadvertent selfed flowers as revealed by microsatellite markers control. **African Journal of Biotechnology**. v.9, n.13, p.1905-1910, 2010.
- JYOTI; MALIK, C.P. Seed deterioration: a review. **Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res.** v.2, n.3, p.374-385, 2013.

- KADER, A.A.; SALTVEIT, M.E. Respiration and gas exchange. In: Bartz, J.A.; Brecht, J.K.; Weichmann, J, (eds.). **Postharvest physiology and pathology of vegetables**. Marcel Dekker, New York, 2002, p.7-29.
- KAPOOR, N.; ARYA, A.; SIDDIQUI, M.A.; KUMAR, H.; AMIR, A. Physiology and biochemical changes during seed deterioration in aged seeds of rice (*Oryza sativa* L.). **America Journal of Plant Physiology**. v.6, p.28-35, 2011.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. v.27, p.137A-138A, 1965.
- KEPCZYNSKI, J.; KEPCZYNSKA, E. Ethylene in seed dormancy and germination. **Physiologia Plantarum**. v.101, p.720-726, 1997.
- KETRING, D.L.; MORGAN, P.W. Ethylene as a component of the emanations from germinating peanut seeds and its effect on dormant Virginia-type peanut seeds. **Plant Physiology**. v.44, p.326-330. 1969.
- KETRING, D.L.; MORGAN, P.W. Physiology of oil seeds. II. Dormancy release in Virginia-type peanut seeds by plant growth regulators. **Plant Physiology**. v.47, p.488-492, 1971.
- KETRING, D.L.; MORGAN, P.W. Physiology of oil seeds. IV. Role of endogenous ethylene and inhibitory regulators during natural and induced after ripening of dormant virginia-type peanut seeds. **Plant Physiology**. v.50, p.382-387, 1972.
- KIBINZA, S.; VINEL, D.; CÔME, D.; BAILLY, C.; CORBINEAU, F. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging, **Physiologia Plantarum**. v.128, p.496-506, 2006.
- LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria da OEA, 1983. 173p.
- LAMARCA, E.V.; BARBEDO, C.J. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. **Hoehnea**. v.39, p.577-586, 2012.
- LINKIES, A.; MULLER, K.; MORRIS, K.; TURECKOVA, V.; WENK, M.; CADMAN, C.S.C.; CORBINEAU, F.; STRNAD, M.; LYNN, J.R.; FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. Ethylene Interacts with Abscisic Acid to Regulate

- Endosperm Rupture during Germination: A Comparative Approach Using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**. v.21, p.3803–3822, 2009.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in relation evaluation for seedling emergence vigor. **Crop Science**. v.2, p.176-177, 1962.
- MARTY, F. Plant Vacuoles. **The Plant Cell**. v.11, p.587–599, 1999.
- MARTINELLI-SENEME, A.; MARTINS, C.C.; CASTRO, M.M.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Avaliação do vigor de sementes peliculizadas de tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, p.01-06, 2004.
- McDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**. v.27, p.177–237, 1999.
- MELLO, J.I.O., BARBEDO, C.J., SALATINO, A.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.889-899, 2010.
- MENDES, C.R.; MORAES, D.M. de; LIMA, M. da G. de S.; LOPES, N.F. Respiratory activity for the differentiation vigor on soybean seeds lots. **Revista Brasileira de Sementes**. v.31, p.171-176, 2009.
- PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Evaluation of the physiological potential of tomato seeds. **Seed Technology**. Lansing, v.23, p.151-161, 2001.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de Sementes**. Brasília: Agiplan, 1977, 289p.
- ROSSETTO, C.A.V.; ALVES, E.P. tratamentos pré-germinativos em sementes de *Arachis pintoi*. **Ciência e Agrotecnologia**. v.32, n.1, p.174-179, 2008.
- SATTLER, S.E., GILLILAND, L.U., MAGALLANES-LUNDBACK, M., POLLARD, M.; DELLAPENNA, D. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. **The Plant Cell**. v.16, p.1419-1432, 2004.
- SHABAN, M. Review on physiological aspects of seed deterioration. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**. v.6, p.627-631, 2013.

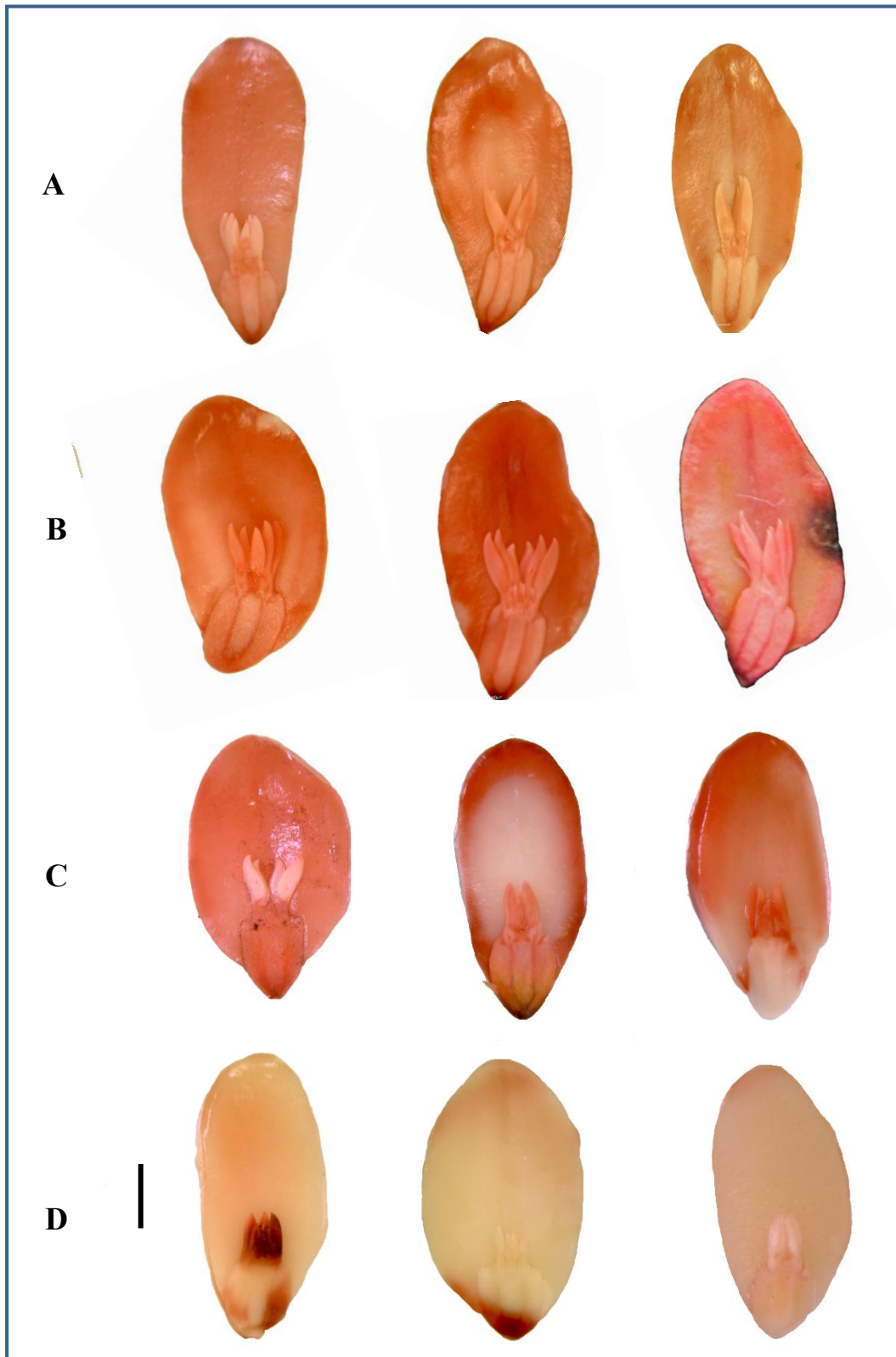
- SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A. et al. Mild Reductions in Mitochondrial Citrate Synthase Activity Result in a Compromised Nitrate Assimilation and Reduced Leaf Pigmentation But Have No Effect on Photosynthetic Performance or Growth. **Plant Physiology**. v.147, p. 115–127, 2008.
- SUNG, J.M. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. **Physiologia Plantarum**. v.97, p.85–89, 1996.
- SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**. v.91, p.51–55, 1994.
- TCHERKEZ, G., NOGUÉS, S., BLETON, J., CORNIC, G., BADECK, F.; GHASHGHAIE, J. Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO<sub>2</sub> in French bean. **Plant Physiology**. v.131, p.237-244, 2003.
- TIAN, X.; SONG, S.; LEI, Y. Cell death and reactive oxygen species metabolism during accelerated ageing of soybean axes. **Russian Journal of Plant Physiology**. v. 55, p.33-40, 2008.
- VALENTIM, J.F.; ANDRADE, C.M.S.; MENDONÇA, H.A. SALES, M.F.L. Velocidade de estabelecimento de acesso de amendoim forrageiro na Amazônia Ocidental. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.32, n.6, p.1-12, 2003.
- VALENTIM, J.F.; ASSIS, G.M.L. de; SÁ, C.P. de. Produção de sementes de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) no acre. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**. v.4, n.8, 2009.
- VANZOLINI, S.; NAKAGAWA, J. Lixiviação de potássio na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**. v.25, p.7-12, 2003.
- VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Kigel, J.; Galili, G. (eds.). **Seed development and germination**. Marcel Dekker, New York, 1995, p.237-271.
- WALTERS, C.; BALLESTEROS, D.; VERTUCCI, V.A. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time, **Plant Science**. v.179, p.565-573, 2010.



WUNSCHER, T.; SCHULTZE-KRAFT, R.; PETERS, M.; RIVAS, L. Early adoption of the tropical forage legume *Arachis pinto* in Huetar Norte, Costa Rica. **Experimental Agriculture**. v.40, p.257-268, 2004.

## DADOS COMPLEMENTARES

Saliente-se aqui que a germinação das sementes de *A. pintoi* nunca atingiram sequer 70%, em quaisquer dos tratamentos e, mais do que isto, não atingiram 30% de plântulas normais, que representa a metade do mínimo exigido pela Instrução Normativa Nº 30 para a comercialização de sementes da espécie (BRASIL, 2008). No entanto, observa-se que os processos de superação de dormência e deterioração ocorreram simultaneamente e os quatro meses de armazenamento para superação da dormência foram suficientes para a deterioração das primeiras sementes que tiveram a dormência superada, sobretudo por estarem expostas a condições não controladas de armazenamento. Sementes desta mesma cultivar, também tratadas com ethephon, porém armazenadas a 24°C e 46% de umidade relativa do ar, alcançaram cerca de 70 a 80% de plântulas normais aos oito meses de armazenamento (ASSIS et al., 2013a, b). Do mesmo modo, quando sementes da cv. Amarillo foram armazenadas em condições controladas (18°C e 50% U.R.) durante 12 meses, a germinação, em teste também realizado no rolo de papel a 25°C, foi de 74%, sendo 57% de plântulas normais (ROSSETTO; ALVES, 2008). No entanto, no presente estudo o teste de tetrazólio confirmou a deterioração das sementes durante o armazenamento, porém com menor intensidade do que foi constatado nos testes de germinação. O fato nos leva a supor que, talvez, a temperatura de 25°C adotada no teste de germinação não seja a temperatura ótima para sementes da espécie, especialmente com menor vigor, já que no teste de emergência, a porcentagem de plântulas normais das sementes CT oscilou de 29% a 45% do 10º ao 14º mês de armazenamento, quando as temperaturas dentro da casa de vegetação (dados não apresentados) atingiram valores superiores aos das externas, que variou de 25 a 30°C (Tab. 1). Da mesma forma, na produção de MSPN (Fig. 3D) também foi observada recuperação significativa do 10º ao 14º MA. Por outro lado, no sexto mês de armazenamento, após as sementes ET terem atingido perda máxima de dormência e com temperaturas externas de 23°C, uma das menores do período experimental, o desenvolvimento de plântulas normais não alcançou 10%. Conforme Marcos Filho (2005), sementes que apresentam menor potencial fisiológico exigem temperaturas mais próximas da ótima e, algumas vezes, podem, inclusive, responder melhor a temperaturas alternadas, mesmo não apresentando dormência.



**Figura 1 (dados complementares).** Sementes de amendoim forrageiro submetidas ao teste de tetrazólio. Na horizontal, (A) Sementes Classe 1– Viáveis e vigorosas; (B) Sementes Classe 2– Viáveis e não vigorosas; (C) Sementes Classe 3 – Não viáveis e (D) Sementes Classe 3 – mortas. Escala: 2 mm

#### IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhos futuros envolvendo os antioxidantes presentes nas sementes dessa espécie e a associação de suas concentrações com o ponto de maturidade fisiológica e a influência do centro de origem da espécie poderão auxiliar na elucidação dos fenômenos fisiológicos de deterioração, principalmente aqueles relacionados à respiração e outros processos oxidativos. Neste sentido, vale destacar a importância de futuras pesquisas que busquem, também, a redução do alto índice de abscisão dos frutos de *Arachis pintoii*. Informações precisas desta natureza também poderiam oferecer direcionamento a programas de melhoramento que visem à obtenção de sementes com maior longevidade.

## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A.A. Biochemical aspects of seed vigor. **Hort Science**. v.15, p.765-771, 1980.
- AMATO, A.L.P.; MAIA, F.C.; MAIA, M. de S.; CAETANO, L.S.; SIMIONI, S.B.; CONTO, L. de; BONINI FILHO, R. de M. Estabelecimento de condições de luz e temperatura para germinação de sementes de amendoim forrageiro. **Revista Brasileira de Sementes**. v.29, p.54-59, 2007.
- AMEN, R.D. A model of seed dormancy. **Botanical Review**. v.34, p.1-31, 1968.
- AN, F.; XING, Z.; ZHU, Z.; JI, Y.; HE, W.; JIANG, Z.; LI, M.; GUO, H. Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated Arabidopsis seedlings. **Cell Research**. v.22, p.915-927, 2012.
- ANDERSON, J.D. Adenylate metabolism of embryonic axes from deteriorated Soybean seeds. **Plant Physiology**. v.59, p.610-614, 1977.
- AOSA - ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. Wageningen, 1983. 93 p. (Contribution, 32 to Handbook on Seed Testing).
- APELBAUM, A.; FISHER, J.B.; STANLEY, P.B. Effect of ethylene on cellular differentiation in etiolated pea seedlings. **American Journal of Botany**. v.59, n.7, p.697-705, 1972.
- APELBAUM, A.; YANG, S.F. Biosynthesis of stress ethylene induced by water deficit. **Plant Physiology**. v.68, p.594-596, 1981.
- ARC, E.; SECHET, J.; CORBINEAU, F.; RAJJOU, L.; MARION-POLL, A. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. **Frontiers in Plant Science**. v.4, p.63, 2013.
- ARGUESO, C.T.; HANSEN, M.; KIEBER, J.J. Regulation of ethylene biosynthesis. **Journal of Plant Growth Regulation**. v.26, p.92-105, 2007.
- ARGYRIS, J.; DAHAL, P.; HAYASHI, E.; STILL, D.W.; BRADFORD, K.J. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive

expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. **Plant Physiology**. v.148, p.926-947, 2008.

ARTECA, R., ARTECA, J. Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. **Journal of Experimental Botany**. v.59, p.3019-3026, 2008.

ASSIS, G.M.L.; AZEVEDO, H.N.; SILVA, R.A. Germinação de sementes de Amendoim Forrageiro (*Arachis Pintoi*) tratadas com etefom por períodos prolongados de tempo. In: XVIII Congresso Brasileiro de Sementes. 2013, Florianópolis. Brasília: ABRATES, v.23, p.68, 2013a.

ASSIS, G.M.L.; AZEVEDO, H.N.; SILVA, R.A. Germinação de sementes de Amendoim Forrageiro (*Arachis pintoi*) tratadas com etefom por períodos reduzidos de tempo. In: XVIII Congresso Brasileiro de Sementes, 2013, Florianópolis. Brasília: ABRATES, v.23, p.68, 2013b.

ASSIS, G.M.L.; VALENTIM, J.F.; ANDRADE, C.M.S. DE. BRS Mandobi: a new forage peanut cultivar propagated by seeds for the tropics. **Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales**. v.1, p.39–41, 2013c.

BAI, B.; SIKRON, N.; GENDLER, T.; KAZACHKOVA, Y.; BARAK, S.; GRAFI, G.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; FAIT, A. Ecotypic Variability in the Metabolic Response of Seeds to Diurnal Hydration–Dehydration Cycles and its Relationship to Seed Vigor. **Plant Cell Physiology**. v.53, p.38–52, 2012.

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

BAILLY, C.; AUDIGIER, C.; LADONNE, F.; WAGNER, M.H.; COSTE, F.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**. v.52 p.701-708, 2001.

BARBA-ESPIN, G.; DIAZ-VIVANCOS, P.; JOB, D.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; HERNANDEZ, J.A. Understanding the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during pea seed germination: a

- combined proteomic and hormone profiling approach. **Plant Cell Environ.** v.34, p.1907–1919, 2011.
- BARBEDO, C.J.; CENTENO, D. da C.; RIBEIRO, R. de C.L.F. Do recalcitrante seeds really exist? **Hoehnea.** v.40, p.583-593, 2013.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology.** v.19, p.279-286, 1991.
- BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research,** v.14, p.1-16, 2004.
- BECHARA, M.D. MORETZSOHN, M.C.; PALMIERI, D.A.; MONTEIRO, J.P.; BACCI JR, M.; MARTINS JR, J.; VALLS, J.F.M.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences. **BMC Plant Biology.** v.10, p.2-12, 2010.
- BENAMAR, A.; TALLON, C.; MACHEREL, D. Membrane integrity and oxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing. **Seed Science Research.** v.13, p.35-45, 2003.
- BENNETT, A.B.; LABAVITCH, J.M. Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. **Plant Science.** v.175, p.130-136, 2008.
- BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell.** V.9, p.1055-1066, 1997.
- BIALECKA, B.; KEPCZYNSKI, J. Effect of ethephon and gibberellin A3 on *Amaranthus caudatus* seed germination and  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase activity under salinity stress. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica.** v.51, p. 119–125, 2009.
- BRADFORD, K. J. Shang Fa Yang: pioneer in plant ethylene biochemistry. **Plant Science.** v.175, p.2–7, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes.** Brasília: SNDA, DNDV, CLAV, 2009. 399p.

- CAMACHO-CRISTÓBAL, J.J.; MARTÍN-REJANO, E.M.; HERRERA-RODRÍGUEZ, M.B.; NAVARRO-GOCHICOA, M.T.; REXACH, J.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron deficiency inhibits root cell elongation via an ethylene/auxin/ROS-dependent pathway in *Arabidopsis* seedlings. **Journal of Experimental Botany**. p.2-10, 2015.
- CARA, B.; GIOVANNONI, J.J. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. **Plant Science**. v.175, p.106-113, 2008.
- CARTER, A.K.; STEVENS, R. Using ethephon and GA<sub>3</sub> to overcome thermoinhibition in “Jalapeno M” pepper seed. **Hort Science**. v.33, p.1026–1027, 1998.
- CASTELLIÓN, M.; MATIACEVICH, S.; BUERA, P.; MALDONADO, S. Protein deterioration and longevity of quinoa seeds during long-term storage. **Food Chemistry**. v.121, p.952–958, 2010.
- CHEN Y-F.; ETHERIDGE, N.; SCHALLER, G.E. Ethylene signal transduction. **Annals of Botany**. v.95, p.901-915, 2005.
- CLARK, D.G.; GUBRIUM, E.K.; BARRETT, J.E.; NELL, T.A.; KLEE, H.J. Root formation in ethylene-insensitive plants. **Plant Physiology**. v.121, p.53–59, 1999.
- CONAGIN, C.H.T.M. Morfologia da flor e formação do fruto no amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*, L.). **Bragantia**. v.14, p.259-266, 1955.
- COOK, B.G.; FRNKLIN, T.G. Crop management and seed harvesting of *Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg. **Journal of Applied Seed Production**. v.6, p.26-30, 1988.
- CORBINEAU F.; XIA. Q; BAILLY, C; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. **Frontiers of Plant Science**. v.5, p.1-13, 2014.
- CORBINEAU, F.; RUDNICKI, R.M; CÔME, D. Induction of secondary dormancy in sunflower seeds by high temperature. Possible involvement of ethylene biosynthesis. **Physiologia Plantarum**. v.73, p.368–373, 1988.
- COSTA, L.H.; ROSSETTO, C.A.V. Rendimento e qualidade de sementes de amendoim forrageiro em diferentes épocas de colheita. **Ciência Rural**, v.38, p.2358-2361, 2008.



- DEBEAUJON, I.; KOORNNEEF, M. Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. **Plant Physiology**. v.122, p.415–424, 2000.
- DELOUCHE, J.C. Seed deterioration. **Seed World**. v.92, p.14-15, 1963.
- DHAWAN, K.R.; BASSI, P.K.; SPENCER, M.S. Effects of carbon dioxide on ethylene production and action in intact sunflower plants. **Plant Physiology**. v.68, p.831-834, 1981.
- DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; RIBEIRO, D.M.; BARROS, R.S.; FLOH, E.I.S.; OTONI, W.C. Ethylene and polyamine production patterns during in vitro shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.99, p.199–208, 2009.
- DIAS, L.L.C.; RIBEIRO, D.M.; SANTA-CATARINA, C.; BARROS, R.S.; FLOH, E.I.S.; OTONI, W.C. Ethylene and polyamine interactions in morphogenesis of *Passiflora cincinnata*: effects of ethylene biosynthesis and action modulators, as well as ethylene scavengers. **Plant Growth Regul.** v.62, p.9–19, 2010.
- DIAZ-VIVANCOS, P.; BARBA-ESPIN, G.; HERNANDEZ, J.A. Elucidating hormonal/ROS networks during germination: insights and perspectives. **Plant Cell Reports**. v.32, p.1491–1502, 2013.
- DODE, J. de S.; MENEGHELLO, G.E.; MORAES, D.M. de; PESKE, S.T. Teste de respiração para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de girassol. **Revista Brasileira de Sementes**. v.34, p.686-691, 2012.
- DUDA, G.P.; GUERRA, J.G.M.; MONTEIRO, M.T.; DE-POLLI, H.; TEIXEIRA, M.G. Perennial herbaceous legumes as live soil mulches and their effects on C, N and P of the microbial biomass. **Scientia Agricola**. v.60, p.139-147, 2003.
- DUGARDEYN, J.; STRAETEN, D.VAN DER. Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. **Plant Science**. v.175, p.59-70, 2008.

- DUKE, S.H.; SCHRADER, L.E.; MILLER, M.G. Low temperature effects on soybean (*Glycine max* [L.] Merr. Cv. Wells) mitochondrial respiration and several dehydrogenases during imbibition and germination. **Plant Physiology**. v.60, p.716-722, 1977.
- EL-MAAROUF-BOUTEAU, H., SAJJAD, Y., BAZIN, J., LANGLADE, N., CRISTESCU, S. M., BALZERGUE, S., BAUDOUIN, E.; BAILLY, C. Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. **Plant, Cell & Environment**. v.38, p.364–374, 2015.
- ESASHI, Y.; OKAZAKI, M.; WATANABE, K. The role of C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> in anaerobic induction of cocklebur seed germination. **Plant and Cell Physiology**. v.17, p.1151-1158, 1976.
- ESPINDOLA, J.A.A.; GUERRA, J.G.M.; PERIN, A.; TEIXEIRA, M.G.; ALMEIDA, D.L. DE; URQUIAGA, S.; BUSQUET, R.N.B. Bananeiras consorciadas com leguminosas herbáceas perenes utilizadas como coberturas vivas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.41, p.415-420, 2006.
- EZURA, H.; OWINO, W.O. Melon, an alternative model plant for elucidating fruit ripening. **Plant Science**. v.175, p.121-129, 2008.
- FERGUSON, J.E. Seed biology and seed systems for *Arachis pintoi*. In: KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. (Eds.). **Biology and Agronomy of Forage Arachis**. Cali: CIAT, cap.11, 1994, p.122-133.
- FERGUSON, J.M.; TeKRONY, D.M.; EGLI, D.B. Changes during early soybean seed and axes deterioration: I. Seed quality and mitochondrial respiration. **Crop Science**. v.30, p.175-179, 1990.
- FERGUSON, M.E.; JARVIS, A.; STALKER, H.T.; WILLIAMS, D.E.; GUARINO, L.; VALLS, J.F.M.; PITTMAN, R.N.; SIMPSON, C.E.; BRAMEL, P.J. **Biogeography of wild Arachis (Leguminosae): distribution and environmental characterisation**. Biodiversity and Conservation, v.14, p.1777-1798, 2005.
- FINCH-SAVAGE, W.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**. v.171, p.501-523, 2006.

- GALLARDO, M.; DELGADO, M.D.; SANCHEZ-CALLE, I.M.; MATILLA, A.J. Ethylene Production and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Conjugation thermoinhibited *Cicer arietinum* L. **Seeds Plant Physiology**. v.97, p.122-127, 1991.
- GARCIA I.S.; SOUZA A.; BARBEDO C.J.; DIETRICH S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO R.C. L. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* LAM. (Brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology**. v.66, p.739-745, 2006.
- GORECKI, R.J.; ASHINO, H.; SATOH, S.; ESASHI, Y. Ethylene production in pea and cocklebur seeds of differing vigour. **Journal of Experimental Botany**. v.42, p.407-414, 1991.
- GREGORY, W.C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M.P. 1980. Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. In: SUMMERFIELD, R.J.; BUNTING, A.H. **Advances in Legume Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, v.2, p.469-481.
- GROOT, S.P.C.; KARSSSEN, C.M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: A study with gibberellin-deficient mutants. **Planta**. v.171, p.525-531, 1987.
- GROSSMANN, K.; RETZLAFF, G. Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). **Pesticide Science**, v.50, p.11-20, 1997.
- GROSSO, N.R.; NEPOTE, V. GUZMÁN, C.A. Chemical Composition of Some Wild Peanut Species (*Arachis* L.) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.48, p.806-809, 2000.
- GURUSINGHE, S.; BRADFORD, K.J. Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. **Seed Science Research**. v.11, p.121-133, 2001.
- HILHORST, H.W.M. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. **Seed Science Research**. v.5, p.61-73, 1995.
- HIRAYAMA, T.; KIEBER, J.J.; HIRAYAMA, N.; KOGAN, M.; GUZMAN, P.; NOURIZADEH, S.; ALONSO, J.M.; DAILEY, W.P.; DANCIS, A.; ECKER, J.R.

- RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. **Cell**. v.97, p.383-393, 1999.
- ISHIBASHI, Y.; KODA, Y.; ZHENG, S.-H.; YUASA, T.; IWAYA-INOUE, M. Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species. **Ann. Bot.** v.111, p.95–102, 2013.
- HOFFMAN, N.E.; FU, J.R.; YANG, S.F. Identification and metabolism of 1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid in germinating peanut seeds. **Plant Physiology**. v.71, p.197-199, 1983.
- HOFFMAN, N.E.; YANG, S.F.; McKEON, T. Identification of 1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.104, p.765–770, 1982.
- HOGSETT, W.E; RABA, R.M; TINGEY, D.T. Biosynthesis of stress ethylene in soybean seedlings: similarities to endogenous ethylene biosynthesis. **Physiologia Plantarum**. v.53, p.307-14, 1981.
- HUA, J.; MEYEROWITZ, E. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**. p.94, p.261-271, 1998.
- HUNT, L.; GRAY, J.E. The relationship between pyridine nucleotides and seed Dormancy. **New Phytologist**. v.181, p.62–70, 2009.
- HYODO, H; NISHINO, T. Wound induced ethylene formation in albedo tissue of citrus. **Plant Physiology**. v.67, p.421-423, 1981.
- ISSA, F.; DANIEL, F.; JEAN-FRANÇOIS, R.; HODO-ABOLO, T.; NDOYE, S.M.; TAHIR, D. A.; OUSMANE, N. Inheritance of fresh seed dormancy in Spanish-type peanut (*Arachis hypogaea* L.): bias introduced by inadvertent selfed flowers as revealed by microsatellite markers control. **African Journal of Biotechnology**. v.9, p.1905-1910, 2010.
- JUNG, J.; SHIN, R.; SCHACHTMAN, D.P. Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**. v.21, p.607–621, 2009.

- KAPOOR, N.; ARYA, A.; SIDDIQUI, M.A.; KUMAR, H.; AMIR, A. Physiology and biochemical changes during seed deterioration in aged seeds of rice (*Oryza sativa* L.). **America Journal of Plant Physiology**. v.6, p.28-35, 2011.
- KAPOOR, R.; ARYA, A.; SIDDIQUI, M.A.; AMIR, A. KUMAR, H. Seed Deterioration in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under Accelerated Ageing. **Asian Journal of Plant Sciences**. v.9, p.158-162, 2010.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. Taxonomia del genero *Arachis* (leguminosae). **Bonplandia**. v.8, p.1-186, 1994.
- KAWAKAMI, E.; OOSTERHUIS, D.; SNIDER, J.; FITZSIMONS, T. High Temperature and the Ethylene Antagonist 1-Methylcyclopropene Alter Ethylene Evolution Patterns, Antioxidant Responses, and Boll Growth in *Gossypium hirsutum*. **American Journal of Plant Sciences**. v.4, p.1400-1408, 2013.
- KAZAMA, H.; DAN, H.; IMASEKI, H.; WASTENEYS, G.O. Transient Exposure to Ethylene Stimulates Cell Division and Alters the Fate and Polarity of Hypocotyl Epidermal Cells. **Plant Physiology**. v.134, p.1614–1623, 2004.
- KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.44, p.283-307, 1993.
- KEPCZYNSKI, J.; CORBINEAU, F., CÔME, D. Responsiveness of *Amaranthus retroflexus* seeds to ethephon, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and gibberellic acid in relation to temperature and dormancy. **Plant Growth Regulation**. v.20, p.259–265, 1996.
- KEPCZYNSKI, J.; KEPCZYNSKA, E. Ethylene in seed dormancy and germination. **Physiologia Plantarum**. v.101, p.720-726, 1997.
- KEPCZYNSKI, J.; SZNIGIR, P. Participation of GA<sub>3</sub>, ethylene, NO and HCN in germination of *Amaranthus retroflexus* L. seeds with various dormancy levels. **Acta Physiologiae Plantarum**. v.36, p.1463–1472, 2014.
- KETRING, D.L.; MORGAN, P.W. Physiology of oil seeds. II. Dormancy release in Virginia-type peanut seeds by plant growth regulators. **Plant Physiology**. v.47, p.488-492, 1971.

- KETRING, D.L.; MORGAN, P.W. Ethylene as a component of the emanations from germinating peanut seeds and its effect on dormant Virginia-type peanut seeds. **Plant Physiology**. v.44, p.326-330. 1969.
- KETRING, D.L.; MORGAN, P.W. Physiology of oil seeds. IV. Role of endogenous ethylene and inhibitory regulators during natural and induced after ripening of dormant virginia-type peanut seeds. **Plant Physiology**. v.50, p.382-387, 1972.
- KIBINZA, S.; VINEL, D.; CÔME, D.; BAILLY, C.; CORBINEAU, F. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging, **Physiologia Plantarum**. v.128, p.496-506, 2006.
- KIKUTI, A.L.P.; MARCOS FILHO, J. Physiological potential of cauliflower seeds. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v.65, p.374-380, 2008.
- KIKUTI, H.; MEDINA, P.F.; KIKUTI, A.L.P.; RAMOS, N.P. Teste de lixiviação de potássio para avaliação do vigor de sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília, v.30, n.1, p.10-18, 2008.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**. v.8, p.1-186. 1994.
- LAMARCA, E.V.; BARBEDO, C.J. Methodology of the tetrazolium test for assessing the viability of seeds of *Eugenia brasiliensis* Lam., *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia pyriformis* Cambess. **Journal of Seed Science**. v.36, p.427-434, 2014.
- LAU, O.L.; YANG, S.F. Synergistic effect of calcium and kinetin on ethylene production by the mung bean hypocotyl. **Planta**. v.118, p.1-6, 1974.
- LAVIA, G.I., ORTIZ, A.M.; FERNÁNDEZ, A. Karyotypic studies in wild germoplasm of *Arachis* (Leguminosae). **Genetic Resources and Crop Evolution**. v.56, p.755-764, 2009.
- LEWAK, S. Metabolic control of embryonic dormancy in apple seed: seven decades of research. **Acta Physiologiae Plantarum**. v.33, p.1-24, 2011.

- LI, NING. The dual-and-opposing-effect of ethylene on the negative gravitropism of *Arabidopsis* inflorescence stem and light-grown hypocotyls. **Plant Science**. v.175, p.71-86, 2008.
- LINKIES, A.; MULLER, K.; MORRIS, K.; TURECKOVA, V.; WENK, M.; CADMAN, C.S.C.; CORBINEAU, F.; STRNAD, M.; LYNN, J.R.; FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. Ethylene Interacts with Abscisic Acid to Regulate Endosperm Rupture during Germination: A Comparative Approach Using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v.21, p.3803–3822, 2009.
- LINKIES, A.; LEUBNER-METZGER, G. Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. **Plant Cell Rep.** v.31, p.253–270, 2012.
- LOTT, J.N.; CAVDEK, V.; CARSON, J. Leakage of K, Mg, Cl, Ca and Mn from imbibing seeds, grains and isolated seed parts. **Seed Science Research**. New York, v. 1, n. 4, p. 229-233, 1991.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.
- MANZANO, S.; MARTÍNEZ, C.; GARCÍA, J.M.; MEGÍAS, Z.; JAMILÉNA, M. Involvement of ethylene in sex expression and female flower development in watermelon (*Citrullus lanatus*). **Plant Physiology and Biochemistry**. v.85, p.96–104, 2014.
- MARTINEZ-REINA, G.; MATILLA, A.J.; MARTIN-REMESAL, C.; GALLARDO, M.; RUEDA, P. M. de. Biochemical properties of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate aminomalonyltransferase activity from early growing embryonic axes of chick-pea (*Cicer arietinum* L.) seeds. **Journal of Experimental Botany**. v.47, p.1771-1778, 1996.
- MATILLA, A.J. Ethylene in seed formation and germination. **Seed Science Research**. v.10, p.111-126, 2000.
- MATILLA, A.J.; MATILLA-VAZQUEZ, M.A. Involvement of ethylene in seed physiology. **Plant Science**. v.175, p.87–97, 2008.
- MATTHEWS, S. Physiology of seed ageing. **Outlook on Agriculture**. v.14, p.89-94, 1985.

- MENDES, C.R.; MORAES, D.M. de; LIMA, M. da G. de S.; LOPES, N.F. Respiratory activity for the differentiation vigor on soybean seeds lots. **Revista Brasileira de Sementes**. v.31, p.171-176, 2009.
- MIN, X.-J.; BARTHOLOMEW, D. P. Effect of plant growth regulators on ethylene production, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity, and initiation of inflorescence development of pineapple. **Journal of Plant Growth Regulation**. v.15, p.121-128, 1996.
- MIRANDA, D.M.; NOVENBRE, A.D.L.C.; CHAMMA, H.M.C.P.; MARCOS FILHO, J. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de pimentão pelo teste de lixiviação de potássio. **Informativo ABRATES**. Londrina, v.13, p.275, 2003.
- MIRANDA, E.M. **Fungos micorrízicos arbusculares em amendoim forrageiro (*Arachis pinto* Krap. & Greg.)**. 2008. Tese (doutorado em ciência do solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.
- MIRANSARI, M.; SMITH, D.L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**. v.99, p.110–121, 2014.
- MIYAZAKI, J.H.; YANG, S.F. Metabolism of 5-methylthioribose to methionine, **Plant Physiology**. v.84, p.277–281, 1987a.
- MIYAZAKI, J.H.; YANG, S.F. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. **Physiologia Plantarum**. v.69, p.366–370, 1987b.
- MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v52, p.561–591, 2001.
- MORRIS, D.A.; LARCOMBE, N.J. Phloem transport and conjugation of foliar-applied 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Plant Physiology**. v.146, p.429–436, 1995.
- MUDAY, G.K.; RAHMAN, A.; BINDER, B.M. Auxin and ethylene: collaborators or competitors? **Trends Plant Science**. v.17, p.181–195, 2012.



- MURTHY, U.M.N.; SUN, W.Q. Protein modification by Amadori and Maillard reaction during seed storage: Roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany**. v.51, p.1221–1228, 2000.
- NEGM, F.B.; SMITH, O.E.; KUMAMOTO J. Interaction of carbon dioxide and ethylene in overcoming thermodormancy of lettuce seeds. **Plant Physiology**. v.49, p.869–872, 1972.
- NEGM, F.B.; SMITH, O.E. Effects of ethylene and carbon dioxide on the germination of osmotically inhibited lettuce seeds. **Plant Physiology**. v.62, p.473-476, 1978.
- OGAWA, M. ; HANADA, A.; YAMAUCHI,Y.; KUWAHARA, A.; KAMIYA,Y.; YAMAGUCHI, S. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. **Plant Cell**. v.15, p.1591–1604, 2003.
- OLIVEIRA, C.A.; SCOTTI, M.R.M.M.L.; PURCINO, H.A.; VASCONCELLOS, C.A.; MARRIEL, I.E.; N.M.H.S. Decomposition of *Arachis pintoi* litter intercropped with forage grass In Cerrado soil in the dry and wet seasons. **Biology and Fertility of Soils**. v.36, p.405-410, 2002.
- PACURAR, D.I.; PACURAR, M.L.; BUSSELL, J.D.; SCHWAMBACH, J.; POP, T.I.; KOWALCZYK, M.; GUTIERREZ, L.; CAVEL, E.; CHAABOUNI, S.; LJUNG, K.; FETT-NETO, A.G.; PAMFIL, D.; BELLINI, C. Identification of new adventitious rooting mutants amongst suppressors of the *Arabidopsis thaliana superroot2* mutation. **Journal of Experimental Botany**. v.65, p.1605-1618, 2014.
- PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Evaluation of the physiological potential of tomato seeds. **Seed Technology**, Lansing, v.23, n.2, p.151-161, 2001.
- PAULSEN, T.R.; COLVILLE, L.; KRANNER, I.; DAWS, M.I.; HÖGSTEDT, G.; VANDVIK, V.; THOMPSON, K. Physical dormancy in seeds: a game of hide and seek? **New Phytologist**. v.198, p.496–503, 2013.
- PECH, J.C.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A. Climacteric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. **Plant Science**. v.175, p.114-120, 2008.

- PENG J.; HARBERD, N.P. The role of GA-mediated signalling in the control of seed Germination. **Current Opinion in Plant Biology**. v.5, p.376–381, 2002.
- PERL, M. ATP synthesis and utilization in the early stage of seed germination in relation to seed dormancy and quality. **Physiologia Plantarum**. v.66, p.177–182, 1986.
- PETRUZZELLI, L., STURARO, M., MAINIERI, D.; LEUBNER-METZGER, G. Calcium requirement for ethylene-dependent responses involving 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase in radicle tissues of germinated pea seeds. **Plant, Cell and Environment**. v.26, p.661-671, 2003.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de Sementes**. Brasília: Agiplan, 1977, 289p.
- PRUSINSKI, J; KHAN, A.A. Relationship of ethylene production to stress alleviation in seeds of lettuce cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. v.115, p.294–298, 1990.
- QU, L.; WANG, X.; HOOD, E.; SCALZO, R. Ethephon Promotes Germination of *Echinacea angustifolia* and *E. pallida* in Darkness. **Horticultural Science**. v.39, p.1101-1103, 2004.
- RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed germination and vigor. **Annual Review of Plant Biology**. v.63, p.507–533, 2012.
- REEDY, M.E; KNAPP, A.D. Ethanol evolution during the early germination of artificially aged soybean seeds. **Journal of seed technology**. v.14, p.74-82, 1990.
- RIOV, J.; DAGAN, E.; GOREN, R.; YANG, S.F. Characterization of Abscisic Acid-Induced Ethylene Production in Citrus Leaf and Tomato Fruit Tissues. **Plant Physiology**. v.92, p.48-53, 1990.
- RIVAS, L.; HOLMANN, F. Early adoption of *Arachis pintoi* in the humid tropics: the case of dual-purpose livestock systems in Caquetá, Colombia. **Livestock Research for Rural Development**. v.12, 2000.
- RODO, A.B.; MARCOS FILHO, J. Teste de lixiviação de potássio para avaliação rápida do potencial fisiológico de sementes de cebola. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.11, p.183, 2001.

- RODRIGUEZ, F.; ESCH, J.; HALL, A.; BINDER, B.; SCHALLER, G.E.; BLEECKER, A.B. A copper cofactor for the ETR1 receptor from *Arabidopsis*. **Science**. v.283, p.996-998, 1999.
- ROSSETTO, C.A.V.; ALVES, E.P. tratamentos pré-germinativos em sementes de *Arachis pintoi*. **Ciência e Agrotecnologia**. v.32, p.174-179, 2008.
- SAMIMY, C.; TAYLOR, A.G. Influence of seed quality on ethylene production of germinating snap bean seeds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. v.108, p.767-769, 1983.
- SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L. de; VILLELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**. v.26, p.110-119, 2004.
- SHABAN, M. Review on physiological aspects of seed deterioration. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**. v.6, p.627-631, 2013.
- SILVA, P.O.; MEDINA, E.F.; BARROS, R.S.; RIBEIRO, D.M. Germination of salt-stressed seeds as related to the ethylene biosynthesis ability in three *Stylosanthes* species. **Journal of Plant Physiology**. v.171, p.14-22, 2014.
- SINSKA, I. Interaction of ethephon with cytokinin and gibberellin during the removal of apple seed dormancy and germination of embryos. **Plant Science**. v.64, P.39-44, 1989.
- SINSKA, I.; LEWANDOWSKA, U. Polyamines and ethylene in the removal of embryonal dormancy in apple seeds. **Physiologia Plantarum**. v.81, p.59-64, 1991.
- SUBBIAH, V.; REDDY, K.J. Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in *Arabidopsis*. **Journal of Biosciences**. v.35, p.451-458, 2010.
- STEWART, E.R.; FREEBAIRN, H.T. Ethylene, Seed Germination, and Epinasty. **Plant Physiology**. v.44, p.955-958, 1969.
- TANIMOTO, M.; ROBERTS, K.; DOLAN, L. Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**. v.8, p.943-948, 1995.

- TeKRONY, D.M. Precision is an essential component in seed vigor testing, **Seed Science and Technology**. v.31, p.435–447, 2003.
- URSIN, V.M.; BRADFORD, K.J. Auxin and ethylene regulation of petiole epinasty in two developmental mutants of tomato, diageotropica and Epinastic. **Plant Physiology**. v.90, p.1341-1346, 1989.
- VALENTIM, J.F.; ANDRADE, C.M.S.; MENDONÇA, H.A. SALES, M.F.L. Velocidade de estabelecimento de acesso de amendoim forrageiro na Amazônia Ocidental. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1-12, 2003.
- VALENTIM, J.F.; ASSIS, G.M.L. de; SÁ, C.P. de. Produção de sementes de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) no acre. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**. v.4, 2009.
- VALLS, J.F.M.; SIMPSON. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**. v.14, p.35-65, 2005.
- WALTERS, C.; BALLESTEROS, D.; VERTUCCI, V.A. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time, **Plant Science**. v.179, p.565-573, 2010.
- WANG, K.L.C.; LI, H.; ECKER, J.R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**. v.14, Suppl., p.S131–S151, 2002.
- WANG, S.Y.; ADAMS, D.O.; LIEBERMAN, M. Recycling of 50-methylthioadenosine ribose carbon into methionine in tomato tissue in relation to ethylene production, **Plant Physiology**. v.70 p.117–121, 1982.
- WANG, W.; ESCH, J.J.; SHIU, S-H.; AGULA, H.; BINDER, B.M.; CHANG, C.; PATTERSON, S.E.; BLEECKER, A.B. Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of *Arabidopsis*. **Plant Cell**. v.18, p.3429-3442, 2006.
- WILD, H.P.J. DE; OTMA, E.C.; PEPPELENBOS, H.W. Carbon dioxide action on ethylene biosynthesis of preclimacteric and climacteric pear fruit. **Journal of Experimental Botany**. v.54, p.1537-1544, 2003.
- WILLIS, C.G., BASKIN, C.C., BASKIN, J.M., AULD, J.R., VENABLE, D.L., CAVENDER-BARES, J., DONOHUE, K., DE CASAS, R.R. & The NESCent

- Germination Working Group. The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. **New Phytologist**. v.203, p.300–309, 2014.
- WOLTERING, E.J. Interorgan translocation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene coordinates senescence in emasculated *Cymbidium* flowers. **Plant Physiology**. v.92, p.837-845, 1990.
- WUNSCHER, T.; SCHULTZE-KRAFT, R.; PETERS, M.; RIVAS, L. Early adoption of the tropical forage legume *Arachis pintoi* in Huetar Norte, Costa Rica. **Experimental Agriculture**. v.40, p.257-268, 2004.
- YANG, S.F., HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**. v.35, p.155-189, 1984.
- YOO, S.D.; CHO, Y.H.; SHEEN, J. Emerging connections in the ethylene signaling network. **Trends in Plant Science**. v.14, p.270–279, 2009.
- ZAPATA, P.J.; SERRANO, M.; PRETEL, M.T.; AMORÓS, A.; BOTELLA, M.Á. Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. **Plant Science**. v.167, p.781–788, 2004.
- ZHU, X.; LIN QI, LIU, X.; CAI, S.; XU, H.; HUANG, R.; LI, J.; WEI, X.; ZHANG, Z. The wheat ethylene response factor transcription factor PATHOGEN-INDUCED ERF1 mediates host responses to both the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia cerealis* and freezing stresses. **Plant Physiology**. v.164, p.1499-1514, 2014.