
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DURANTE O
ARMAZENAMENTO E A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
Tabebuia roseoalba (RIDL.) SANDWICH (BIGNONIACEAE)

LETICIA CARAVITA ABBADE

Dissertação/tese apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Doutora em Biologia Vegetal.

Julho - 2012

LETICIA CARAVITA ABBADE

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DURANTE O
ARMAZENAMENTO E A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
Tabebuia roseoalba (RIDL.) SANDWICH (BIGNONIACEAE)**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutora em Biologia Vegetal

Orientador: Massanori Takaki

Rio Claro
2012

582.0467 Abbade, Leticia Caravita
A122a Alterações bioquímicas e fisiológicas durante o
armazenamento e a germinação de sementes de *Tabebuia*
roseoalba (RIDL.) SANDWICH (BIGNONIACEAE) /
Leticia Caravita Abbade. - Rio Claro : [s.n.], 2012
60 f. : il., figs., gráfs., fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Massanori Takaki

1. Sementes. 2. Ipê-branco. 3. Mobilização reservas. 4.
Atividade enzimática. 5. Eletroforese. 6. Viabilidade. I.
Título.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), em especial ao Departamento de Bôtanica, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa durante o doutorado.

Ao meu orientador, professor Massanori Takaki, por toda atenção, apoio, amizade, conselhos e incentivo.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao meu marido, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis e, principalmente, por sempre incentivar minha carreira profissional.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meus profundos agradecimentos, com todo o carinho.

RESUMO

Tabebuia roseoalba (Ridl.) Sandwith é uma espécie nativa de árvores brasileiras com ampla ocorrência, principalmente na floresta semidecídua. Sua floração exuberante favorece o uso em arborização urbana, paisagismo e para o reflorestamento de solos secos e rochosos. Suas sementes são pequenas, leves, aladas, e dispersadas pelo vento. A absorção de água é de suma importância para a germinação, pois permite a retomada das atividades metabólicas, as quais contribuem nos processos de mobilização e assimilação de reservas e alongamento celular. Já a tolerância da perda de água nas sementes implica na capacidade desta se manter viva, possibilitando a viabilidade após períodos de seca. O presente trabalho teve como objetivos: testar diferentes protocolos para a extração de proteínas totais de sementes de ipê-branco e avaliar os extratos obtidos por meio de análise eletroforética em gel de poliacrilamida; investigar as alterações bioquímicas das sementes durante a germinação e sua viabilidade durante o armazenamento, para isso, foram avaliadas a porcentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG) e o conteúdo de lipídios, proteínas, compostos fenólicos e a atividade das enzimas: peroxidase, polifenol oxidase e catalase e adequação do teste de tetrazólio em sementes submetidas ao armazenamento durante o armazenamento por 24 meses. O tampão mais eficiente para a extração de proteínas totais foi o Trisma base (50mM, NaCl 500mM, EDTA 50mM, MgCl₂ 5mM, (pH 7,5), a extração a quente promoveu maior rendimento e o tampão Trisma base foi o único que permitiu o aparecimento de bandas no gel de eletroforese. Durante a germinação, houve um rápido consumo de amido, carboidratos, lipídios e uma rápida mobilização de proteínas, porém não houve diferença entre as bandas da eletroforese. No armazenamento, a perda de viabilidade das sementes foi seguida pela redução dos níveis de lipídios, proteínas, peroxidase e catalase e aumento de compostos fenólicos e da atividade da polifenoloxidase. O teste de tetrazólio na concentração de 0,1% a 36°C durante 24 horas foi o mais adequado para avaliar a viabilidade das sementes de ipê-branco. Sementes submetidas ao armazenamento apresentaram a redução na porcentagem de germinação, comprimento e peso seco das plântulas. Obteve-se também que a germinação das sementes em viveiro foi bruscamente reduzida com o armazenamento das sementes no período de 24 meses. De acordo com os resultados obtidos as sementes de *T. roseoalba* podem

ser classificadas como intermediárias e permanecem viáveis por um período de 1 ano sob armazenamento a temperatura de 5°C.

ABSTRACT

Tabebuia roseoalba (Ridl.) Sandwith is a native Brazilian tree with wide occurrence, especially in semi-deciduous forest. Its exuberant blooming favors the use for urban forestry, landscaping and reforestation of dry and rocky soils. Its seeds are small, light, winged and dispersed by the wind. The water absorption is very important for germination, as it allows the resumption of metabolic activities, which contribute to the processes of assimilation and mobilization of reserves and cell elongation. The water loss rate is lower than the absorption which implies the ability to stay alive, enabling the viability after periods of drought. For the protein analysis by electrophoretic techniques, it is necessary to fix the appropriate methodology for different species. This study aimed to: test different protocols for extraction of total protein and evaluate by polyacrylamide gel electrophoretic analysis; investigate the biochemical changes during seed germination and viability during storage, for this, the total germination, the germination speed index (GSI) and the content of lipids, proteins, phenolic compounds and the activity of enzyme, peroxidase, polyphenol oxidase and catalase, were evaluated during storage for 24 months. The methodology for conducting the tetrazolium test in seeds subjected to storage was also established. The buffer for more efficient extraction of total proteins was Trisma base (50mM Trizma base, 500mM NaCl, 50mM EDTA, 5mM MgCl₂ (pH 7.5), the hot extraction provided higher yields and was the only Trisma base that the allowed appearance of protein bands on gel electrophoresis. During germination, there was a rapid consumption of starch, carbohydrates, lipids and proteins with a rapid mobilization of proteins during germination but no difference between the bands of electrophoresis. The loss of viability seeds during storage was followed by reduction in the levels of lipids, proteins, peroxidase and catalase, and increase of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity. The tetrazolium at a concentration of 0.1% at 36 ° C for 24 hours was the most appropriate to assess the viability of ipê white. Seeds subjected to storage presented reduction in the percentage of germination, seedling length and dry weight. In the nursery the germination of seeds was sharply reduced within 24 months storage. According to the results of the seeds of *T. roseoalba* can be classified as intermediate and remain viable for a period of 1 year under storage at 5 ° C.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
3. OBJETIVOS DO ESTUDO	9
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
 CAPÍTULO I	13
ADEQUAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS TOTAIS EM SEMENTES DE <i>TABEBUIA ROSEOALBA</i> (RIDL.) SANDWITH (BIGNONIACEAE)	13
RESUMO	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4. CONCLUSÕES	20
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
 CAPÍTULO II	22
MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>TABEBUIA ROSEOALBA</i> (RIDL.) SANDWITH (BIGNONIACEAE)	22
 CAPÍTULO III	32
ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E ADEQUAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS SEMENTES DE <i>TABEBUIA</i> <i>ROSEOALBA</i> (RIDL.) SANDWITH (BIGNONIACEAE) SUBMETIDAS AO ARMAZENAMENTO	32
RESUMO	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4. CONCLUSÕES	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução

As árvores do gênero *Tabebuia*, conhecidas como ipês, são admiradas pelo efeito ornamental que apresentam quando floridas, apresentam propriedades medicinais, e podem ainda ser utilizadas para fins madeireiros e em programas de restauração florestal (Lorenzi, 2000; Carvalho, 2003).

Muitas das espécies do gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae) são nativas do Brasil, pertencem ao grupo ecológico das secundárias tardias (Ferretti et al., 1995) e o nome vulgar de cada espécie é complementado pela coloração das flores, que pode ser branca, amarela, rosa ou roxa. Dentre as espécies nativas do Brasil mais cultivadas, *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith. é a única que produz flores brancas (Maeda e Matthes, 1984).

Apesar da importância do gênero *Tabebuia* no contexto nacional, o alto grau de desmatamento e destruição de áreas florestais, seja pela expansão das fronteiras agrícolas, construção de rodovias ou exploração indevida, tem levado à diminuição das populações e à destruição das árvores deste gênero, incluindo *T. roseoalba* (Oliveira, 2004).

A propagação dessa espécie é feita principalmente por sementes (Rizzini, 1971), porém poucos estudos são realizados objetivando definir metodologias adequadas para avaliar a capacidade de germinação dessas sementes (Stockman et al, 2007; Borba Filho, 2009).

2. Referencial Teórico

2.1. Caracterização Geral da Família Bignoniaceae

Esta família compreende 120 gêneros, de ampla distribuição nas regiões tropicais de todo o mundo, especialmente frequentes nos trópicos americanos (Joly, 1998). São plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, e também trepadeiras; folhas compostas, raramente simples, de disposição oposta; flores grandes e vistosas, diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, de simetria zigomorfa. Fruto capsular seco, loculicida ou septicida, sempre com sementes aladas, raramente indeiscentes com sementes não aladas (Joly, 1998).

2.2. Gênero *Tabebuia*

Compreende cerca de 100 espécies de árvores e arbustos neotropicais, ocorrendo desde os 28º de latitude norte (Sonora e Chihuahua, México e Ilhas Bahamas) até o norte da Argentina e Uruguai (Gentry 1973, 1992), apresentando flores de diferentes colorações.

A maioria das espécies de *Tabebuia* caracteriza-se pela floração sazonal, com produção maciça de flores durante 3 a 10 semanas, ou por floração explosiva durante apenas alguns dias - florações dos tipos "cornucópia" e "big-bang", respectivamente, segundo a classificação proposta por Gentry (1974).

Exemplares do gênero, os ipês, são extremamente ornamentais, e nos últimos anos têm sido muito utilizados na arborização de ruas, parques e em reflorestamentos destinados à recomposição de vegetação arbórea, e a sua madeira pode ser empregada na construção civil.

2.3. A espécie

A espécie *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith, é encontrada em altitudes de 20 a 1.600m, em regiões com precipitação média anual de 1.500mm, com verão chuvoso e período de 3 a 5 meses de déficit hídrico, tolera temperaturas médias anuais de 14°C a 21°C, sendo a temperatura do mês mais frio de 10°C a 20°C e do mês mais quente de 18°C a 26°C, em diversos tipos climáticos (Joly, 1998). Ocorre no Brasil, principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e ainda, em alguns estados do nordeste. A espécie apresenta crescimento muito lento e é particularmente encontrada em terrenos secos, pedregosos e encostas com afloramentos rochosos. É uma espécie de hábito arbóreo, com porte entre 5 a 10 m, com copa alongada. Possui tronco ereto, de 40 a 50 cm de diâmetro (Pott e Pott, 1994). A madeira do ipê-branco é moderadamente pesada, macia, com superfície lustrosa, de boa qualidade e ótima durabilidade em ambientes internos, sendo usada na construção civil para assoalhos e vigamentos; na construção naval e em obras externas como postes, mourões e esteios (Lorenzi, 2000).

Os ramos jovens são revestidos de tricomas e as folhas são compostas, trifolioladas, com longo pecíolo, folíolos ovais ou oval-oblongos, levemente pubescentes em ambas as faces. As flores são grandes, brancas ou rosadas enquanto os frutos são em forma de cápsula arredondada, muito longa e fina, com numerosas sementes aladas. Floresce, principalmente durante os meses de agosto a outubro com a planta totalmente despida de folhas. A frutificação é pequena em relação à florada (Pott e Pott, 1994).

As sementes de *T. roseoalba* (Figura 1) são cordiformes e apresentam uma leve assimetria nas alas, com diâmetro médio de $2,3\text{ cm} \pm 0,3$ com alas e $0,92\text{ cm} \pm 0,17$ sem alas, não sendo detectada poliembrião (Ortolani, 2007). A assimetria das alas das sementes é uma característica favorável na dispersão anemocórica, pois proporciona maior distância percorrida pelas sementes (Oliveira et al., 2006).

A germinação das sementes é indiferente à luz, com a faixa de temperatura ótima entre 20 e 30°C (Santos et al., 2005). A curta longevidade natural das sementes de ipê está ligada à pequena quantidade de substâncias de reserva armazenadas na semente (Kageyama e Marquez, 1981) e ao elevado teor de óleo em sua composição química.

Embora seja uma espécie de grande valor, existem poucas informações a respeito de sua biologia reprodutiva e diversidade genética (Borba Filho et al., 2009; Stockman et al., 2007).



Figura 1. Aspecto visual de uma planta adulta (A), de um ramo com flores (B) e de sementes (C) de Ipê-branco (foto: Leticia C. Abbade, 2010).

2.4. Teor de água das sementes

O teor de água, grau de umidade ou conteúdo de umidade é um dos fatores mais importantes que afetam a viabilidade de grãos e sementes. Sementes ortodoxas secas e viáveis podem ser mantidas sob armazenamento apropriado por muitos anos, mas sementes úmidas podem se deteriorar rapidamente em poucos dias (Luz, 2002).

Para se obter sementes de alta qualidade, é necessário observar vários aspectos durante a realização dos processos a que essas sementes são submetidas antes de sua utilização nos plantios. Um dos aspectos mais importantes é o teor de água das sementes, já que o conhecimento dessa característica permite a escolha dos procedimentos mais adequados para a colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento, o que possibilita a preservação da qualidade física, fisiológica e sanitária (Nery et al., 2004).

A determinação do teor de água, estabelecida pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), baseia-se na perda de peso das sementes quando secadas em estufa. A aplicação de calor, sob condições controladas, possibilita que a água contida nas sementes seja expelida em forma de vapor, ao mesmo tempo em que são minimizadas a oxidação, a decomposição e a perda de outras substâncias voláteis durante a operação; a redução do peso reflete a perda de água das sementes e, baseado neste princípio, as pesagens realizadas antes e após a secagem (Brasil, 2009).

A perda de peso das sementes, que ocorre durante a secagem, é dependente tanto da temperatura sob a qual estão submetidas quanto do período de exposição a essa temperatura. Com isso, diferentes combinações de temperatura e de período de exposição vêm sendo adotadas na determinação do teor de água de sementes recalcitrantes, como $75 \pm 1^\circ\text{C}$ até o peso constante (Anjos e Ferraz, 1999), 80°C por 48 horas (Valio e Ferreira, 1992), 100°C até o peso constante (Barrueto et al., 1986), $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 17 horas (Barrueto et al., 1986) e 105°C por 48 horas (Bacchi, 1961), muito embora a de $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas (Brasil, 2009) seja a mais utilizada nas pesquisas realizadas no Brasil.

2.4. Germinação de sementes

A germinação é o processo de retomada do crescimento ativo do eixo embrionário. Consiste da sequência ordenada de atividades metabólicas, que inicia com a embebição das sementes, estabelece a retomada do desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula normal, depende de umidade, temperatura e oxigênio.

Segundo Bewley e Black (1994), a embebição pode ser definida como o conjunto de processos físicos que ocorrem em função das propriedades dos colóides e suas dimensões variam com a permeabilidade do tegumento, a composição química da semente, da área de contato entre a semente e a água, com a pressão hidrostática e o estado fisiológico da própria semente.

Para a retomada do crescimento do embrião, a semente deve estar madura, bem constituída, com poder germinativo e ao mesmo tempo deve receber do meio exterior, água e oxigênio em quantidade suficiente para assegurar um intenso metabolismo (Borges e Rena, 1993).

De uma maneira geral, durante a formação da semente, observa-se inicialmente, um acúmulo de açúcares tais como sacarose, frutose e glicose, bem como, compostos nitrogenados como aminoácidos e amidas. Estas substâncias drenadas da planta mãe são os principais metabólitos para a formação dos tecidos da semente e das substâncias de reserva que serão acumuladas para fornecimento de energia e substâncias básicas para o desenvolvimento do processo de germinação. Desta forma, à medida que a semente vai se desenvolvendo há uma diminuição na quantidade destas substâncias mais simples e, ao mesmo tempo, um acúmulo de moléculas maiores e mais complexas como as proteínas, amido, lipídios, celulose, etc. (Guimarães, 1999).

O processo de hidrólise das reservas e sua transformação em substâncias solúveis e difusíveis, até os pontos de crescimento do embrião, ocorrem por meio da hidrólise. Esse processo é realizado pela atividade de várias enzimas hidrolíticas, as quais têm sido avaliadas no intuito de detectar várias reações metabólicas, que envolvem a síntese e a degradação de substâncias que ocorrem durante o processo de germinação. Alguns polissacarídeos de reserva podem ocorrer na parede celular do endosperma, como no cafeeiro. Os polissacarídeos presentes nas sementes de cafeeiro, são degradadas durante a germinação por enzimas hidrolíticas, principalmente, a endo- β -mananase, resultando no enfraquecimento das paredes celulares do endosperma (Silva et al., 2004; Takaki, e Dietrich, 1980).

Para ipê-branco, Lorenzi (2000) relata que as sementes germinam em baixa porcentagem, geralmente próxima a 40%. Degan et al. (2001), trabalhando com sementes de ipê-branco colhidas no estágio maduro, obtiveram germinação máxima de 56,7%. Mello e Eira (1995), também obtiveram germinação máxima variando de 50 a 60%, para a mesma espécie. Valores esses bastante baixos para produção de mudas em larga escala.

2.5. Armazenamento de sementes

O armazenamento de sementes de espécies florestais pode ser uma técnica relativamente econômica para assegurar valiosos germoplasmas (Bonner, 1990), considerando-se a não-ocorrência de frutificação de algumas espécies; além da intervenção do homem por meio de derrubadas e, ou, queimadas, eliminando áreas

produtoras de sementes e espécies que frutificam de dois em dois anos (Souza et al., 1980). Dentre as espécies florestais, destaca-se o ipê-branco, cujas sementes apresentam longevidade curta, com anos de baixa ou nenhuma produção, o que limita a distribuição natural, bem como sua utilização em viveiros para reflorestamento e comércio de mudas, tornando-se necessário conhecer suas condições ideais de armazenamento. Leão (1984) afirmou que a conservação de sementes de essências florestais é de fundamental importância quando se visa ao desenvolvimento de programas silviculturais.

Grande parte de nossas espécies nativas apresenta uma baixa longevidade natural para suas sementes, restringindo o seu aproveitamento em plantações, já que perdem rapidamente sua viabilidade, requerendo utilização imediata na semeadura, esse é o caso, das sementes dos Ipês (Kano et al., 1978). A manutenção da viabilidade das sementes através do armazenamento, em condições de ambiente controlado, vem sendo uma das linhas de pesquisa mais importante para as sementes de grande número de espécies de baixa longevidade (Kano et al., 1978)

Para Martins et al. (1999), uma germinação rápida e uniforme das sementes, seguida por imediata emergência das plântulas são características altamente desejáveis, pois quanto mais tempo a plântula permanecer nos estádios iniciais de desenvolvimento e demorar a emergir no solo, mais vulnerável estará às condições adversas do meio. O bom substrato deve manter a proporção adequada entre a disponibilidade de água e aeração, não devendo ser umedecido em excesso para evitar que a película de água envolva completamente a semente, restringindo a entrada e absorção de oxigênio (Villagomez et al, 1979). Sendo assim, a escolha do tipo de substrato deve ser feita em função das exigências da semente em relação ao seu tamanho e formato (Brasil, 2009).

As sementes do gênero *Tabebuia* perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas, mantendo-se viáveis por cerca de quatro meses (Pinto et al., 1986; Cabral et al., 2003; Lorenzi, 2002).

2.6. Teste de Tetrazólio

O emprego de testes rápidos em programas de controle de qualidade de sementes é uma ferramenta imprescindível para a avaliação de sua qualidade fisiológica, e por isso têm merecido permanente atenção dos tecnologistas, produtores e pesquisadores. Isso reflete o refinamento da demanda de materiais que proporcionem maior segurança para fins de semeadura e/ou armazenamento, principalmente das espécies que requerem um

longo período para completar o teste de germinação (McDonald, 1998; Marcos Filho, 1994).

Dentre os testes considerados rápidos para a avaliação da qualidade das sementes, destaca-se o teste de tetrazólio, que possibilita a avaliação da viabilidade e em algumas espécies também o vigor, além de fornecer informações valiosas sobre o potencial fisiológico das sementes, para fins de semeadura. O teste permite a identificação dos fatores que influenciam a qualidade das sementes, como danos mecânicos, danos ocasionados por secagem, insetos e deterioração por umidade (Krzyzanowski et al., 1999).

De modo geral, as sementes que são conduzidas ao teste de tetrazólio devem ser pré-condicionadas, procedimento que, além de provocar o amolecimento da semente e facilitar a penetração de solução de tetrazólio, também ativa o sistema enzimático que resulta numa coloração mais nítida.

O teste de tetrazólio reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração. Este teste tem sido aceito, segundo Deswal e Chand (1997), não somente como uma técnica para estimar a viabilidade, mas também o vigor das sementes.

3. Objetivos do estudo

O objetivo desse trabalho foi caracterizar a germinação, as alterações bioquímicas das sementes do ipê-branco durante a mobilização de reservas e no armazenamento.

4. Referências Bibliográficas

ANJOS, A.M.G. e FERRAZ, I.D.K. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). **Acta Amazonica** v. 29, p. 337-348, 1999.

BACCHI, O. Estudos sobre a conservação de sementes. IX- Ingá. **Bragantia**, Campinas. v.20, n.35, p.805-14, 1961.

BARRUETO, L.P.; PEREIRA, I.P.; NEVES, M.A. Influência da maturação fisiológica e do período entre a coleta e o início do armazenamento, sobre a viabilidade da semente de seringueira. **Turrialba**, San José, v.36, n.1, p.65-75, 1986.

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

BONNER, F.T. Storage of seeds. Potential and limitations for germoplasm conservation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.35, n. 1-2, p. 35-43, 1990.

BORBA FILHO, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A. Armazenamento de sementes de ipê-branco e ipê-roxo em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 259-269, 2009.

BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coord.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p.83-136.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 399 p. 2009.

CABRAL, E.L.; BARBOSA, D.C.A.; SIMABUKURO, E.A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. F. ex. S. Moore. **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v.17, n.4, p.609-617, 2003.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. v.1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.335-341.

DEGAN, P. et al. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de ipê branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 492-496, 2001.

DESWAL, D.P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi e Ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v.25, p.409-417, 1997.

FERRETTI, A. R. et al. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecofisiológicos para revegetação com nativas no estado de São Paulo. **Floresta Estatístico**, v. 3, n. 7, p. 73-77, 1995.

GENTRY, A. H. Generic delimitations of Central American Bignoniaceae. **Brittonia**, New York, v. 25, p. 226-242. 1973.

GENTRY, A.H. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. **Biotropica** v. 6, n. 1, p.64-68, 1974

GENTRY, A.H. Bignoniaceae - Part II (Tribe Tecomeae). **Flora Neotropica**. Monograph v. 25, p 1-130, 1992.

GUIMARÃES, R.M. **Fisiologia de sementes** – produção e tecnologia de sementes. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 129 p.

JOLY, A B. **Introdução a Taxonomia Vegetal** . 12 ed. São Paulo: Nacional, 1998.

KAGEYAMA, P.Y.; MARQUES, F.C.M. **Comportamento de sementes de curta longevidade armazenadas com diferentes teores de umidade inicial: gênero**

Tabebuia. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, 1981. p.347-352 (Publicación Especial, n.35)

KANO, N.K.; MARQUES, F.C.M.; KAGEYAMA, P.Y. Armazenamento de sementes de ipê-dourado (*Tabebuia* sp.). **Revista: IPEF**, v.1, n.17, p.12-33, 1978.

KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p

LEÃO, N.V.M. Conservação de sementes de morototó (*Didymopanax morototoni* (Aublet) Decne. **Boletim de Pesquisa**, 64, EMBRAPA-CPATU, Belém. 16 p. 1984.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. v. 1, 368 p.

LUZ, M. L. Medidores de umidade. **Seed news**, v. 6 n. 1., jan./fev., 2002 .

MAEDA, J.A.; MATTHES, L.A.F. Conservação de sementes de ipê. **Bragantia**, v.43, p.45-50, 1984.

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

MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M.L.A. Desiccation tolerance of four seedlots from *Euterpe edulis* Mart. **Seed Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 1-13, 1999

McDONALD. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, p. 265-275, 1998.

MELLO, C.M.C.; EIRA, M.T.S. Conservação de sementes de ipês (*Tabebuia* spp.). **Revista Árvore**, v.19, n.4, p.427-432, 1995.

NERY, M. C; CARVALHO, M. L. M; OLIVEIRA, L. M. Determinação do grau de umidade de sementes de ipê-do-cerrado (*Tabebuia ochracea* ((Cham.) Standl.) pelos métodos de estufa e forno de microondas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1299-1305, 2004

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

OLIVEIRA, L.M., **Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl. Nich. e *T. impetiginosa* (Martius Ex A. P. De Candolle Standley) envelhecidas natural e artificialmente**. Lavras: UFLA, 2004. 160p. Tese (Doutorado).

ORTOLANI, F. A. **Morfo-anatomia, citogenética e palinologia em espécies de ipês (Bignoniaceae)**. 2007.106p. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

PINTO, M.M.; SADER, R.; BARBOSA, J.M. Influência do tempo de secagem e do armazenamento sobre a viabilidade das sementes de ipê-rosa. **Revista Brasileira de Sementes**, v.8, p.37-47, 1986

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA/CPAP – SPI, 1994. 320p.

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. São Paulo: E. Blücher, 1971.

SANTOS, A. F. S; ARGOLO, A. C. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from Moringa oleifera seeds. **Water Research** v. 39, p. 975-980, 2005.

SILVA, M.C.; GAYER, C.R.; LOPES, C.S.; CALIXTO, N.O.; REIS, P.A.; PASSAES, C.P.; PAES, M.C.; DALMAU, S.R.; SABINO, K.C.; TODESCHINI, A.R.; COELHO, M.G. Acute and Topic Anti-Edematogenic Fractions Isolated from the Seeds of Pterodon Pubescens. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** . v. 56, p. 135-141, 2004.

SOUZA, S.M.; DRUMOND, M.A.; SILVA, H.O. Estudos de métodos para superar a dormência de sementes de *Piptadenia obliqua* (Pers), *Pithecellobium parvifolium* (Willd.) Benth e *Cassia excelsa* S. Chard. Pesquisa Florestal no nordeste semi- árido: sementes e mudas. **Boletim de Pesquisa**, n. 2, p.1-14, 1980.

STOCKMAN, A.L.; BRANCALION, P.H.S.; NOVENBRE, A.D.L.C.; CHAMMA, H.M.C.P. Sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand. - Bignoniaceae): temperatura e substrato para o teste de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p.121-125, 2007.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S.M.C. Effect of GA3 and lighton polysaccharide levels and metabolism in germinating coffee seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 31, p. 1643-1649, 1980.

VALIO, I.F.M. AND FERREIRA, Z.L. Germination of seed of Myrciaria cauliflora (Mart.) Berg. (Myrthaceae). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, p. 95–98, 1992.

VILLAGOMEZ, A.Y.; VILLASENOR, R.R. e SALINAS, M.J.R. **Lineamento para el funcionamiento de un laboratorio de semillas**. México: INIA, 1979

Capítulo I

ADEQUAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS TOTAIS EM SEMENTES DE *Tabebuia roseoalba* (RIDL.) SANDWICH (BIGNONIACEAE)

Resumo

Para a aplicação da técnica de eletroforese em seus diversos usos, é necessário realizar a adequação da sua metodologia para a espécie que se pretende estudar. O presente trabalho teve como objetivo testar diferentes protocolos para a extração de proteínas totais de sementes de ipê-branco e avaliar os extratos obtidos por meio de análise eletroforética em gel de poliacrilamida. Foram utilizadas sementes recém colhidas de frutos de ipê-branco localizados dentro do Campus da UNESP/Rio Claro. O tampão que permitiu a melhor resolução das bandas foi definido como o mais eficiente para a extração das proteínas de sementes de ipê-branco. Para a eletroforese, as amostras contendo quantidades conhecidas de proteínas foram adicionadas a igual volume de tampão de amostra (glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M), fervidas por 5 minutos, centrifugadas e aplicadas no gel. Os géis de 10% de SDS-poliacrilamida com 1,5 mm de espessura foram confeccionados e submetidos a uma corrente de 30 mA, com voltagem constante. Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue e descorados com ácido acético a 10% (v/v), sendo posteriormente escaneados. O tampão mais eficiente para a extração de proteínas totais foi o Trisma base (50mM, NaCl 500mM, EDTA 50mM, MgCl₂ 5mM, (pH 7,5), a extração a quente promoveu maior rendimento e o tampão Trisma base foi o único que permitiu o aparecimento de bandas no gel de eletroforese.

Termos para indexação: tampão, eletroforese, SDS-Ppage.

1. Introdução

A eletroforese vem sendo utilizada no estudo de proteínas e isoenzimas com relação não apenas às mudanças na qualidade fisiológica de sementes, mas também nas regulações gênica, bioquímica e ontogênica, entre outros (ISTA, 2007). Na tecnologia de sementes, uma das maiores dificuldades para avaliar a qualidade de sementes refere-se ao tempo para execução dos testes. Desse modo, novos testes devem ser realizados para obter resultados efetivos e mais rápidos, na tentativa de prever a qualidade dos lotes que chegam ao laboratório.

Durante o período de armazenamento de sementes, é necessário manter condições adequadas de temperatura e umidade, na tentativa de preservar a qualidade destas. Muitas vezes, a falta de conhecimento das condições ideais de armazenamento torna difícil a manutenção da qualidade fisiológica das sementes, pois o envelhecimento é um processo natural. Um dos primeiros eventos da deterioração de sementes é a perda da integridade das suas membranas, o que afeta a permeabilidade, a compartimentalização e a separação dos sistemas metabólicos (BASU, 1995). De acordo com esse autor, muitas enzimas estão associadas aos sistemas de membranas, e qualquer mudança nessa integridade teria consequências fisiológicas e bioquímicas. Além da perda da integridade das membranas, observam-se redução na produção de ATP e na síntese de proteínas e ácidos nucleicos e degeneração cromossômica (BEWLEY e BLACK, 1994).

Os ajustes metabólicos que conferem à semente ortodoxa a tolerância extrema e rápida à perda de água durante seu desenvolvimento (Ellis et al., 1987), têm, sobretudo, uma função protetora contra os efeitos deletérios da desidratação, em diferentes componentes celulares (membranas, citoplasma e proteínas). Tal função protetora é atribuída, basicamente, aos processos bioquímicos tais como: acúmulo de oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) e açúcares solúveis (sacarose) que protegem a integridade estrutural das membranas, prevenindo sua fusão e suas fases de transição e separação durante a desidratação e provendo as interações hidrofílicas necessárias à estabilidade das proteínas e das atividades enzimáticas; habilidade de prevenir, tolerar e reparar o ataque de radicais livres durante a desidratação; síntese de proteínas específicas, com caráter hidrofílico, que manteriam a integridade estrutural dos componentes intracelulares durante a perda de água, por meio do “seqüestro” de íons e da proteção de outras proteínas ou membranas (Salomão et al., 2002).

A etapa de extração deve proporcionar uma concentração eficiente da proteína, minimizando a presença de impurezas (compostos fenólicos, carboidratos, óleo, etc.) no restante do processo (Miranda et al., 2007)

Para a aplicação da técnica de eletroforese em seus diversos usos, é necessário realizar a adequação da sua metodologia para a espécie que se pretende estudar. Esse trabalho teve como objetivo definir um protocolo de extração de proteínas para sementes de ipê-branco.

2. Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fotomorfogênese de Plantas, no departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista em Rio Claro – SP. Foram utilizadas sementes recém colhidas de frutos de ipê-branco localizados dentro do Campus da UNESP/Rio Claro. Amostras contendo 1 g de sementes com alas foram moídas em moinho de facas na presença de 100mg de PVPP (polivinilpolipirrolidona) para eliminar os compostos fenólicos resultantes da extração, com 10 mL de diferentes tampões de extração: tampão fosfato de sódio [0,2 mM, pH 6.5], tampão trisma base [50 mM Tris, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7.5] e tampão acetato [0,1M, pH 5.5]. Posteriormente, testou-se 3 diferentes incubações a frio e a quente, sempre seguidas de centrifugações durante 30 minutos e 10.000G a 4°C ou em temperatura ambiente, conforme se observa na tabela 1.

Os extratos foram levados ao liofilizador para concentrar as amostras. Após a sua concentração, as amostras foram novamente centrifugadas por 5min a 10.000G, e determinou-se o teor de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), calculou-se a eficiência de cada tampão de extração e realizou-se a corrida eletroforética para verificar a presença de bandas nos diferentes extratores. A eficiência de extração foi calculada pela porcentagem de proteínas presente no extrato pelo volume do tampão. A escolha dos tampões de extração de proteínas baseou-se nos resultados obtidos por Farrant et al. (1992), Blackman et al. (1991), Anti (2000), Carvalho et al. (1994) e Corrêa et al. (1997). O tampão que permitir a melhor resolução das bandas será definido como o mais eficiente para a extração das proteínas de sementes de ipê-branco.

Para a eletroforese, as amostras contendo quantidades conhecidas de proteínas foram adicionadas a igual volume de tampão de amostra (glicerol 10%, β -mercaptoetanol

5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M), fervidas por 5 minutos, centrifugadas rapidamente e aplicadas no gel. Os géis de 10% de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970) com 1,5 mm de espessura foram confeccionados e submetidos a uma corrente de 30 mA, com voltagem constante. Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue (Oakley et al., 1980) e descorados com ácido acético a 10% (v/v), sendo posteriormente escaneados.

Tabela 1. Tampões e pH utilizados na extração de proteínas de sementes de ipê-branco.

Tratamento	Tampão	Tempo de Incubação	Centrifugação
1	Fosfato de Sódio 0,2M (pH 6,5)	Fervidas por 5 minutos	Ambiente
3		Gelo por 30 minutos	Ambiente
4	Trisma base 50mM NaCl 500mM EDTA 50mM MgCl ₂ 5mM (pH 7,5)	Fervidas por 5 minutos	4°C
5		Gelo por 30 minutos	Ambiente
6			4°C
7		Fervidas por 5 minutos	Ambiente
8	Acetato de sódio 0,1M (pH 5,5)	Gelo por 30 minutos	Ambiente
9			4°C

3. Resultados e discussão

Na Tabela 2 constam os dados de quantificação dos extratos proteicos totais de sementes de ipê-branco obtidos utilizando-se diferentes tampões de extração descritos na literatura.

Tabela 2. Teor de proteínas e eficiência em cada método de extração

Tratamento	Teor de proteínas (mg.mL ⁻¹)	Eficiência da Extração (%)
1	2,58	3,23
2	0,52	0,39
3	0,44	0,18
4	4,98	12,45
5	4,70	4,25
6	4,84	1,78
7	2,30	8,33
8	0,71	0,92
9	0,50	0,25

1Fostato fervido centrifugado ambiente; 2 Fosfato gelo centrifugado ambiente; 3 Fosfato gelo centrifugado frio; 4 Trisma base fervido centrifugado ambiente; 5 Trisma base gelo centrifugado ambiente; 6 Trisma base gelo centrifugado frio; 7 Acetato fervido centrifugado ambiente; 8 Acetato gelo centrifugado ambiente; 9 Acetato gelo centrifugado frio. Eficiência da extração corresponde a porcentagem de proteínas presente no extrato pelo volume do tampão.

A comparação dos métodos de extração revelou valores de rendimento bastante distintos. De acordo com os resultados obtidos, o tampão Trisma base, foi o que proporcionou maior rendimento na extração de proteínas totais, quando comparados com os demais tampões, também foi o que promoveu extratos mais claros, o que indica a menor oxidação de compostos fenólicos (Figura 1). Nos extratos com esse tampão foram observados valores médios de 4,84 mg.mL⁻¹, enquanto para os tampões fosfato e acetato, os valores máximos apresentados foram 2,58 e 2,30mg.mL⁻¹, respectivamente.

Um rendimento menor foi observado também em extratos obtidos com os tampões fosfato e acetato (0,18 e 0,25%, respectivamente), enquanto para o tampão trisma base o valor médio foi de 6,2%. Silva e Souza (2009) também evidenciaram que o tampão fosfato foi o que apresentou menor rendimento para a extração de folhas e raízes de *Piper nigrum* Link., e Miranda et al. (2007) concluíram que o tampão fosfato a pH 7,5 não é eficiente para a extração de proteínas de caráter hidrofóbico de sementes de milho Desta forma, em termos quantitativos o tampão Trisma base fervido foi o mais eficiente, visto que também apresentou maior rendimento.

Analisando as extrações a frio e fervida, a que se obteve maior rendimento foi a fervida, mesmo com os diferentes tampões. Em sementes de milho, a temperatura

ambiente (25°C) também promoveu a melhor extração de proteínas (Miranda et al., 2007). Isso se deve ao fato das sementes de milho apresentarem alta concentração de enzimas, que promovem a degradação das proteínas, pois uma vez fervidas, são desnaturadas, inativando-as. A extração e centrifugação a frio, tratamentos 3, 6 e 9 (figura 1), por sua vez, promoveram maior preservação dessas enzimas, os teores de proteínas totais possuindo os menores valores médios, 1,92 mg.mL⁻¹.

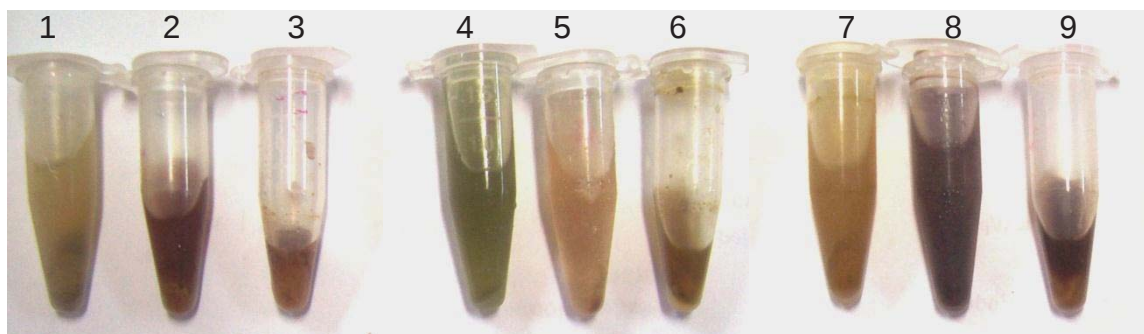


Figura 1. Características visuais de cada extrato: 1 Fosfato fervido centrifugado ambiente; 2 Fosfato gelo centrifugado ambiente; 3 Fosfato gelo centrifugado frio; 4 Trisma base fervido centrifugado ambiente; 5 Trisma base gelo centrifugado ambiente; 6 Trisma base gelo centrifugado frio; 7 Acetato fervido centrifugado ambiente; 8 Acetato gelo centrifugado ambiente; 9 Acetato gelo centrifugado frio.

Na corrida eletroforética, as proteínas extraídas com os tampões fosfato e acetato, não formaram bandas. O tampão trisma base, promoveu além da melhor extração, a formação de bandas nos tratamentos fervidos, e extraídos e centrifugados a frio.

Após a corrida eletroforética com todos os padrões, foi realizada outra corrida apenas com o melhor extrator, que foi o tampão Trisma base, para melhorar a resolução das bandas, com o mesmo extrato e o gel descritos na metodologia. Sem a interferência dos outros tampões, a corrida seguiu como se esperava. As análises em SDS-PAGE (Figura 2) mostraram que os extratos protéicos de sementes obtidos com os tampão Trisma base apresentou bandas que variaram de 10 a 220 kDa. Comparando-se os padrões das bandas, pode-se observar que as amostras obtidas tem maiores concentrações das proteínas mais leves. Isso também ocorre em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf., com a banda mais intensa em 16,4kDa (Carvalho et al, 2006).

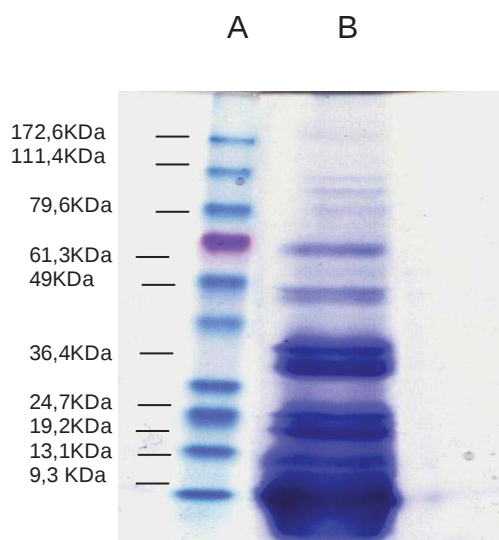


Figura 2. Gel de poliacrilamida com o padrão (A) e o extrator Trisma base (B)

O presente trabalho é pioneiro na análise de padrões proteicos de ipê-branco e contribui para a identificação de tampões de extração adequados para a obtenção de amostras de proteínas totais em estudos sobre os diversos aspectos da fisiologia das sementes.

4. Conclusões

O tampão mais eficiente para a extração de proteínas totais foi o Trisma base (Trisma base 50mM, NaCl 500mM, EDTA 50mM, MgCl₂ 5mM, (pH 7,5)).

A extração a quente promoveu maior rendimento.

O tampão Trisma base foi o único que permitiu o aparecimento de bandas de proteínas no gel de eletroforese.

5. Referencias Bibliográficas

ANTI, A. B. Caracterização de germoplasma de soja e de feijão através de eletroforese de isoenzimas da semente. **Bragantia**, Campinas, v. 59, n. 2. 2000.

BLACKMAN, S.A.; WETTCLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, v.96, p.868-874, 1991.

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

CARVALHO, D.; FERREIRA, R. A.; OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, A. F.; GEMAQUE, R. C. R. Eletroforese de proteínas e isoenzimas em sementes de *Copaifera Langsdorffii* Desf. (Leguminosae Caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente. **Revista Árvore**, v. 30, n. 1, p.19-24, 2006.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. v.1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.p.335-341.

CORREIA, P.C.; SILVA, C.G.; MIANDA, L.C.G. Qualidade da bebida do café (*Coffea arabica* L.) avaliada por espectrofotometria. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.22, p.9-12, 1997.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. 1987.The development of desiccation tolerance and maximum seed quality during seed maturation of six grain legumes. **Annals of Botany**, London, v. 59, p. 23-29.

FARRANT, J. M.; BERJACK, P.; PAMMENTER, N. W. Proteins in development and germination of a desiccation sensitive (recalcitrant) seed species. **Plant Growth Regulation**, Dorcrecht, v. 11, p. 257-265, 1992.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227,p.680-685, 1970.

MIRANDA, E. A.; LEITE, A.; FARINAS, S. F. Processo de extração de proteínas de endosperma de sementes. Int. Cl.: CO7K 1/14, CO7K 14/62 A61P 3/10, 25 set 2007. **Revista da Propriedade Industrial**, nº 1916, p. 74, 2007

OAKLEY, B.R., KIRSCH, D.R., MORRIS, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.105, n.2, p.361-363, 1980.

SALOMÃO, A. N.; LIMA L. H. C.; Ferreira M. A. 2002. Adaptação de método para a extração de proteínas de sementes de cerejeira (*Amburana cearensis* (Fr.All.) A.C.Smith). **Comunicado Técnico**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, nº 64, Setembro, 2002, 6p.

SILVA, R. S; SOUZA, C. R. B. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. **Acta Amazonica**, v. 39 (2), p. 255-260. 2009.

Capítulo II

MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Tabebuia roseoalba* (RIDL.) SANDWITH (BIGNONIACEAE)

*(Formatted according to paper accepted for publication in
Seed Science and Technology)*

Research Note

Mobilisation of reserves during germination of seeds of *Tabebuia roseoalba* (Bignoniaceae)

L.C. ABBADE AND M. TAKAKI*

Instituto de Biociências, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, Departamento de Botânica, CP 199, Rio Claro, SP, 13506-900, Brazil (E-mail: massa@rc.unesp.br)

(Accepted April 2012)

Summary

Tabebuia roseoalba is a native Brazilian tree species with wide occurrence, particularly in semi-deciduous forest. The tree has lush flowering and is used in landscaping, arboriculture and for reforestation of dry and rocky soils. Its seeds are small, lightweight and winged, and are wind-dispersed. The objective of this study was to investigate the biochemical changes in *T. roseoalba* seeds during germination. We determined the content of starch, structural polysaccharides, lipid and soluble protein, and analysed the proteins by SDS-PAGE. There was a rapid consumption of starch, structural polysaccharides, lipids and proteins during germination of *T. roseoalba* seeds. The rapid mobilization of protein during germination, was accompanied by the synthesis of high molecular mass proteins and degradation of low molecular mass proteins.

Experimental and discussion

Proteins, lipids and carbohydrates are the main components stored during the late stages of seed development, and during the germination process those reserves are hydrolysed and mobilized to the growing embryo (Kidson and Westboy, 2000). Munshi et al. (2007) found a rapid decrease in the lipid content during germination of seeds of *Helianthus annuus* L.. Liu and Brown (1996) emphasized that germinating seeds synthesized fatty acids used in the formation of membrane lipids in the growing embryos. The process of hydrolysis of reserve substances and their transformation into soluble and

diffusible compounds is the main biochemical process responsible for germination and growth of the embryo and this is accomplished by the activity of several enzymes involved in the degradation and the synthesis of compounds important for those processes. During early post-germination embryo growth, stored compounds are broken down into soluble molecules which can be transported around the developing seedling. *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith is a Brazilian tree species with wide occurrence, particularly in semi-deciduous forest, and is widely used in landscaping, arboriculture and for reforestation of dry and rocky soils (Lorenzi, 2002). Since there is scarce information about the seed storage compounds and the process of mobilization of those reserves of tropical tree species during germination, the aim of this work was to investigate the biochemical changes in *T. roseoalba* seeds during germination.

The seeds of *T. roseoalba* were collected from open fruits on trees located at Rio Claro, São Paulo, Brazil. Harvested seeds were stored inside sealed plastic germination boxes and kept at 5 °C. At the time of storage, the water content of seeds was 10%, determined by drying the seeds at 103 °C for 17 hours, according to Brasil (2009). The tests were carried out with one month stored seeds.

For the germination test and biochemical analysis, 4 replicates with 25 seeds were sown, on two layers of filter paper moistened with deionized water inside 90mm diameter Petri dishes, and maintained at 25 °C with continuous white light provided by day-light fluorescent lamps with fluency of $32.85\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ at seed level. Every six hours samples were taken for biochemical analysis. For carbohydrate, lipid and protein analysis, the seed samples were initially milled in a knife mill and then homogenised with extraction solution with the aid of a pestle and mortar. Starch extraction was performed according to McCready et al. (1950) and quantified by the method of Dubois et al. (1956) using starch as standard sugar.

The differential extraction of structural polysaccharide mobilization was performed according to Takaki and Dietrich (1980) resulting in four fractions: a. free soluble sugars; b. cold water soluble polysaccharides (hemicelluloses, mainly galactomanan and xyloglucan like polysaccharides); c. hot oxalic acid soluble polysaccharides (pectin like polysaccharides); and d. total alkali soluble polysaccharides (hemicelluloses strongly linked to cellulose, not extracted by previous treatments) and quantified according to Dubois et al. (1956) using glucose as standard sugar.

The extraction of lipids was performed according to Bligh and Dyer (1959) and the total lipid content determined gravimetrically.

The protein extraction was performed according to Alfenas (1998), using 0.1 M Trisma base-HCl pH 7.5 as extraction solution with 100 mg polyvinylpyrrolidone (PVPP). The quantification of proteins was done according to Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA) as standard protein. In addition, the total protein pattern during germination was analyzed by SDS-PAGE. Samples containing known amounts of protein were added to an equal volume of sample buffer (glycerol 10%, 5% β -mercaptoethanol, 2.3% SDS, 0.0625 M TRISMA BASE-HCl pH 6.8,), boiled for 5 minutes, centrifuged and applied to a 1.5 mm thick 10% SDS-polyacrylamide gel. The loaded gels were subjected to a current of 30 mA with constant voltage (Laemmli, 1970). After running, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (Oakley et al., 1980), bleached with 10% (v:v) acetic acid and subsequently scanned.

The experimental design was completely randomized. It uses a multiple stepwise regression method (Draper and Smith, 1981).

The dry matter of seeds of *T. roseoalba* comprises about 10% starch, 77% lipids, 9.5% protein and 3.5% of not determined compounds. The germination of seeds of *T. roseoalba* started at 24 hours from sowing and at 42 hours almost all seeds had

germinated (figure 1A). Starch was almost completely consumed before the onset of radicle emergence (Figure 1B).

Dantas et al. (2008) found a decrease in starch content at imbibition and germination in seeds of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp showed starch accumulation in the embryonic axes, as results of translocation of products of starch hydrolysis stored in the cotyledons followed by synthesis of starch in the axes (Prisco et al., 1981).

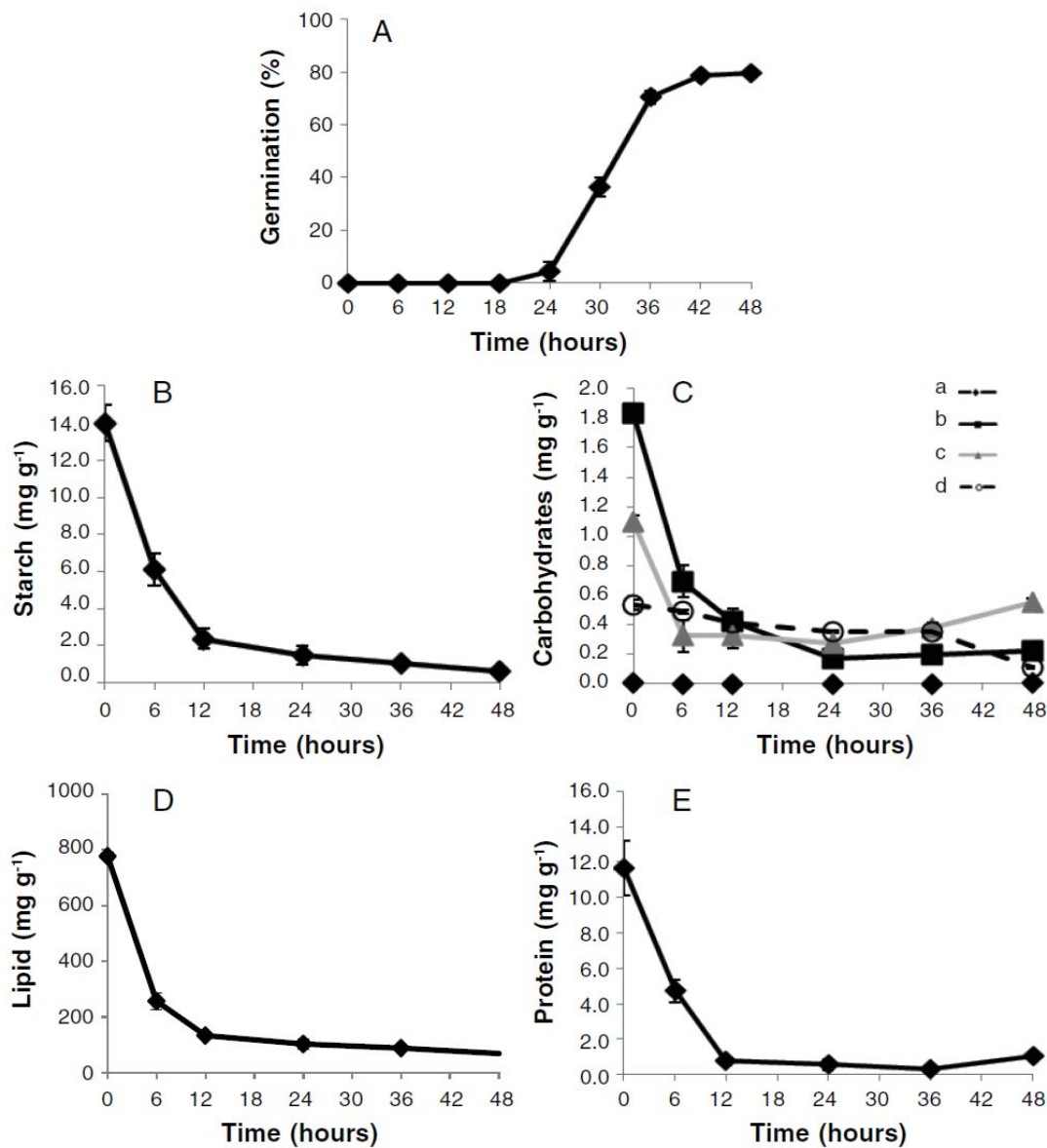


Figure 1. Germination percentage (A), starch (B), structural polysaccharides (C) - a: free soluble sugar; b: hemicelluloses; c: pectin-like polysaccharides and d: hemicelluloses strongly linked to cellulose, lipids (D) and soluble protein (E) during seed germination in *Tabebuia roseo-alba* (Ridl). Sandwith.

No detectable level of free sugars were observed during *T. roseoalba* seed germination (figure 1C), but pectin like compounds were mobilized and then slowly increased after 24 hours after sowing, possibly present in newly formed cell walls. Hemicelluloses were degraded during seed germination, indicating a possible presence of storage cell wall polysaccharides that are consumed during the germination process as observed in seeds of *Coffea Arabica* L., with galactomannan (Takaki and Dietrich, 1980) and in *Copaifera langsdorffii* Desf. with xyloglucan (Buckeridge et al., 2000).

The lipid content decreased greatly in the first few hours of imbibition (Figure 1D). The high lipid content of seeds, more unstable than carbohydrates, is responsible for a rapid deterioration of oilseeds (Harrington, 1972). Kitajima (1996) reported that high lipid content in seeds of some species must indicate a compensatory selection (higher energy: volume), as lighter seeds are highly selected, for example, for better dispersion. This fits perfectly for *T. roseoalba*: light seeds, dispersed by wind and with high lipid content.

The rate of lipid degradation in the initial hours of imbibition of the seed is high before start of radicle protrusion, close to 24 hours after contact with water. Rapid consumption of lipids was found by Suda and Giorgini (2000) in seeds of *Euphorbia heterophylla* L., whose degradation of lipids started soon after imbibition, reaching about 70% decrease between three and four days from sowing. In *Cucumis sativus* L., the degradation of lipids started at two days after germination, leaving only 3% of the initial after six days. In this case, the rapid degradation begins with the appearance of primary roots and ends with the complete expansion of cotyledons (Matsui et al., 1999). In seeds of *Caesalpinia peltophoroides* Benth., germination occurs between 5 to 10 days from sowing, during which there was a strong decrease in the concentration of lipids (Corte et al., 2006). Tozzi and Takaki (2011) concluded that *Passiflora edulis* Sims seeds consume mainly lipids as their reserve material for germination and its product may be accumulated

as starch after the germination process; hydrolysis of protein bodies was also observed in the cotyledons during germination.

Soluble protein is degraded before the protrusion of the radicle and synthesised after germination (Figure 1E). These results are consistent with Bewley and Black (1994) and with those obtained by Corte et al. (2006) for the mobilization of soluble proteins in seeds of *Caesalpinia peltophoroides* and in seeds of *Euphorbia heterophylla* during germination when proteins are continuously degraded after the start of imbibition (Suda and Giorgini, 2000). Accompanying the rapid mobilization of protein during germination, we observed slight increases in the content of 88.3, 41 and 13.1 KDa proteins and decreases in 36.4 and 14.8 KDa proteins (Figure 2). The 14.8 KDa protein has been isolated from *Zea mays* L. seedlings and it is responsible for phospholipid transfer which facilitates movements of phospholipid from different types of membranes (Douady et al., 1986). 41 KDa protein isolated from seedlings of *Zea mays* was reported to be a peripheral membrane component present in plasmodesmata (Epel et al., 1996) and in *Hordeum vulgare* was reported to be a peptide transporter, important for mobilization of stored protein during seed germination (Stacey et al., 2002). Apparently those proteins important for lipid transfer and peptide transport are present in seeds of *T. roseoalba* during germination, but detailed analysis of those proteins are necessary.

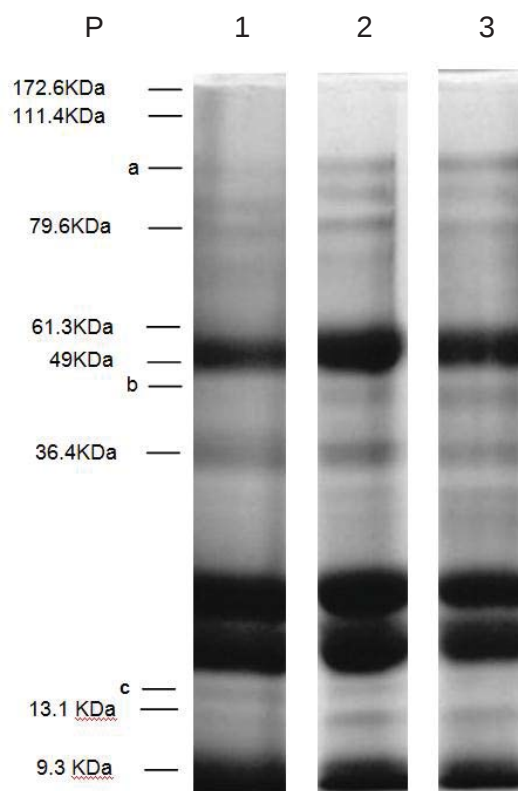


Figure 2. 8-18% gradient SDS-PAGE of total proteins of dry seeds (1), 24 (2) and 48 hours (3) of germination in *Tabebuia roseo-alba* (Ridl). Sandwith. S: protein standard; a: 88.3KDa; b: 41KDa and c: 14.8KDa, determined according to Neville (1971).

References

- Alfenas, A.C. (1998). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. [*Isoenzyme electrophoresis and related proteins: fundamentals and applications in plants and microorganisms*] pp. 574, UFV, Viçosa.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of Development and Germination*, 2nd edn. New York, NY: Plenum.
- Bligh, E.G.; Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911-917.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brasil (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes [Rules to seed analyses]*/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 399 p.

- Buckeridge, M.S.; dos Santos, H.P.; Tiné, M.A.S. (2000) Mobilization of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, **38**, 141-156.
- Corte, V.B.; Borges, E.E.L.; Pontes, C.A.; Leite, I.T.A.; Ventrella, M.C.; Mathias, A.A. (2006). Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae) [Mobilization of reserves during seed germination and seedling growth of *Caesalpinia peltophoroides*. (Leguminosae-Caesalpinioideae)] *Revista Árvore*, **30**, 6, 941-949.
- Dantas, B.F.; Correia, J.S.; Marinho, L.B.; Aragão, C.A. (2008). Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) [Biochemical changes during seed imbibition catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.)] *Revista Brasileira de Sementes*, **30**, 1, 221-227.
- Douady, M.; Grosbois, M.; Guerbette, F.; Kader, J.C. (1986). Phospholipid transfer protein from maize seedlings is partly membrane-bound. *Plant Science*, **45**, 151-156.
- Draper, N. M., H. Smith. (1981). *Applied Regression Analysis*, 2.ed., Wiley, New York.
- Dubois, M.; Gilles, J. K.; Hamilton, P. A.; Rebers, F. S. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annals of Chemistry*, **28**, 350-356.
- Epel, D.L.; van Lent, J.W.M.; Cohen, L.; Kotlizky, G.; Katz, A.; Yahalom, A. (1996) A 41 kDa protein isolated from maize mesocotyl cell walls immunolocalizes to plasmodesmata. *Protoplasma*, **191**, 70-78.
- Harrington, J.F. (1972) Seed storage and longevity. Pp. 145-245 in , in T.T., Kozlowski. (Ed.) *Seed Biology*, Vol. 3, Academic Press, Inc., New York.
- Kidson, R.; Westboy, M. (2000). Seed mass and seedling dimension in relation to seedling establishment. *Oecologia*, **125**, 1, 11-17.
- Kitajima, K. (1996). Ecophysiology of tropical tree seedlings. In: MULKEY, S.S.; CHAZDON, R.L.; SMITH, A.P. *Tropical forest plant ecophysiology*. 559-596, Chapman & Hall, New York.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Liu, K.S., E.A. Brown, (1996). Fatty acid composition in newly differentiated tissues of soybean seedlings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **44**, 1395-1398.
- Lorenzi, H. (2002). Árvores Brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. [*Brazilian tree*], vol. 1 – 4ª. Ed. pp 384, Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP
- Matsui, K.; Hijiya, K.; Tabuchi, Y.; Kajiwara, T. (1999). Cucumber cotyledon lipoxygenase during postgerminative growth. Its expression and action on lipid bodies. *Plant Physiology*, **119**, 1279-1287.

- McCready, R.M., Guggolz, J., Silveira, V.; Owens, H.S. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. *Analytical Chemistry*, **22**, 1156-1158.
- Munshi, S. K., Sandhu, S.; Sharma, S. (2007). Lipid composition in fast and slow germinating sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Gen. Appl. Plant Physiology*, **33** (3-4), 235-246.
- Oakley, B. R., Kirsch, D. R., and Morris, N. R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**, 361-363.
- Prisco, J.T.; Enéas Filho, J.; Gomes Filho, E. (1981). Effect of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp seeds. *Revista Brasileira de Botânica*, **4**, 63-71.
- Stacey, G.; Koh, S.; Granger, C.; Becker, J.M. (2002). Peptide transport in plants. *Trends in Plant Science*, **7**, 257-263.
- Suda, C.N.K.; Giorgini, J.F. (2000). Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal*, **12**, 3, 226-245.
- Takaki, M.; Dietrich, S.M.C. (1980). Effect of GA3 and light on polysaccharide levels and metabolism in germinating coffee seeds. *Journal of Experimental Botany*, **31**, 1643-1649.
- Tozzi, H. H.; Takaki, M. (2011). Histochemical analysis of seed reserve mobilization in *Passiflora edulis* Sims fo. flavicarpa O. Deg. (yellow passion fruit) during germination. *Brazilian Journal of Biology*, **71**, 3, 701-708.

Capítulo III

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E ADEQUAÇÃO DO TESTE DE
TETRAZÓLIO NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS SEMENTES DE *Tabebuia
roseoalba* (RIDL.) SANDWITH (BIGNONIACEAE) SUBMETIDAS AO
ARMAZENAMENTO**

Resumo

Tabebuia roseoalba (Ridl.) Sandwith é uma espécie florestal brasileira, ocorrendo principalmente na floresta semidecídua e tem grande utilidade em arboricultura, paisagismo e reflorestamento em solos secos e rochosos. Suas sementes são pequenas, leves, aladas e dispersadas pelo vento. As avaliações de germinação foram realizadas diariamente através da contagem de plântulas normais, com raízes visíveis e cotilédones. Germinação total e o índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação, peso seco, comprimento de plântulas e emergência foram calculados após 30 dias. Analisaram-se a cada 6 meses o conteúdo de lipídios, proteínas, compostos fenólicos e a atividade das enzimas: peroxidase, polifenol oxidase e catalase, e estabeleceu-se o protocolo para a realização do teste de tetrazólio submetidas ao armazenamento durante o armazenamento por 24 meses em frascos de vidro hermeticamente fechados a 5°C sob temperatura de 5°C. A perda de viabilidade das sementes durante o armazenamento foi seguido por redução dos níveis de lipídeos, proteínas, peroxidase e catalase e aumento de compostos fenólicos e da atividade da polifenol oxidase. O teste de tetrazólio na concentração de 0,1% a 36°C durante 24 horas foi o mais adequado para avaliar a viabilidade das sementes de ipê-branco. Sementes submetidas ao armazenamento apresentaram a redução na porcentagem de germinação, comprimento e peso seco das plântulas. Obteve-se também que a germinação das sementes em viveiro é bruscamente reduzida com o armazenamento das sementes no período de 24 meses.

Termos de indexação: longevidade; armazenamento; atividade enzimática; tetrazólio

1. Introdução

As espécies do gênero *Tabebuia* são propagadas sexualmente e a utilização de sementes de alta qualidade é fundamental para a obtenção de plantas vigorosas para o sucesso nos diversos programas florestais em que são requeridas e na restauração de áreas degradadas (Oliveira et al., 2005)

O conhecimento de como os fatores ambientais afetam a germinação das sementes é de extrema importância. Assim, eles poderão ser controlados e manipulados de forma a melhorar a porcentagem, velocidade e uniformidade de germinação, resultando na produção de mudas mais vigorosas para plantio e minimização dos gastos (Nassif et al., 1998).

O emprego de testes rápidos em programas de controle de qualidade de sementes é uma ferramenta imprescindível para a avaliação de sua qualidade fisiológica, e por isso têm merecido permanente atenção dos tecnologistas, produtores e pesquisadores. Isso reflete o refinamento da demanda de materiais que proporcionem maior segurança para fins de semeadura e/ou armazenamento, principalmente das espécies que requerem um longo período para completar o teste de germinação (McDonald, 1998; Marcos Filho, 1994).

Dentre os testes considerados rápidos para a avaliação da qualidade das sementes, destaca-se o teste de tetrazólio, que possibilita a avaliação da viabilidade e em algumas espécies também o vigor, além de fornecer informações valiosas sobre o potencial fisiológico das sementes, para fins de semeadura. O teste permite a identificação dos fatores que influenciam a qualidade das sementes, como danos mecânicos, danos ocasionados por secagem, insetos e deterioração por umidade (Krzyzanowski et al., 1999).

O teste de tetrazólio reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração. Este teste tem sido aceito, segundo Deswal e Chand (1997), não somente como uma técnica para estimar a viabilidade, mas também o vigor das sementes. Além do pré-condicionamento, a utilização de concentração da solução de tetrazólio, tempo e temperatura de condicionamento e avaliação adequada da coloração das sementes, são fundamentais para que se obtenham resultados confiáveis sobre a qualidade das sementes. De acordo com Todd-Bockarie et al. (1993), embriões de *Cassia sieberiana* podem ser submetidos a 0,1% da solução de tetrazólio por 9 horas a 35°C na realização do teste. Para *Tabebuia serratifolia* é indicada a concentração da solução de 0,5% de tetrazólio por 12 horas a 30°C (Oliveira, et al., 2005).

A longevidade das sementes está relacionada à sua tolerância à dessecação das mesmas. Cabral et al. (2003), Lorenzi (2000) e Pinto et al. (1986) afirmaram que as sementes do gênero *Tabebuia* perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas, mantendo-se por cerca de quatro meses. Por outro lado, Roberts (1973), classificou essas sementes como ortodoxas, pela sua alta porcentagem de germinação e possibilitando o seu armazenamento com baixos teores de água. A separação clássica ortodoxas x recalcitrantes passou a ser questionada, procurando-se identificar, com maior consistência, as espécies com sementes recalcitrantes ou os níveis de recalcitrância (Chin et al. 1984; Berjak e Pammenter 1984; Nautiyal e Purohit 1985; Nautiyal et al., 1985; Farrant et al. 1989; Hong e Ellis 1990); espécies consideradas ortodoxas podem ter diferentes níveis de tolerância à dessecação. Além disso, as sementes podem ser agrupadas por características intermediárias entre as das ortodoxas e as das recalcitrantes (Farrant et al. 1997; Sacande et al. 1997), tornando-se difícil classificá-las em algum grupo, por apresentarem características de ortodoxas, mas possuírem longevidade muito curta (Pence 1996; Vertucci et al. 1996).

O elevado teor de lipídios das sementes, mais instável do que os carboidratos, é responsável por uma deterioração mais rápida das sementes (Harrington, 1972). A curta longevidade natural das sementes de ipê está ligada à pequena quantidade de substâncias de reserva armazenadas na semente e ao elevado teor de óleo em sua composição química (Degan et al, 2001).

Kitajima (1996) relatou que os altos conteúdos de lipídios nas sementes de algumas espécies deve indicar uma seleção compensatória (maior energia:volume), à medida que as sementes mais leves são fortemente selecionadas, por exemplo, para melhor dispersão. Isso se enquadra perfeitamente para o ipê-branco, sementes leves, dispersas pelo vento e com alta concentração de lipídios.

Durante o período de armazenamento de sementes, é necessário manter condições adequadas de temperatura e umidade, na tentativa de preservar a qualidade destas. Muitas vezes, a falta de conhecimento das condições ideais de armazenamento torna difícil a manutenção da qualidade fisiológica das sementes, pois o envelhecimento é um processo natural. Um dos primeiros eventos da deterioração de sementes é a perda da integridade das suas membranas, o que afeta a permeabilidade, a compartimentalização e a separação dos sistemas metabólicos (Basu, 1995). De acordo com esse autor, muitas enzimas estão associadas aos sistemas de membranas, e qualquer mudança nessa integridade teria consequências fisiológicas e bioquímicas. Além

da perda da integridade das membranas, observam-se redução na produção de ATP e na síntese de proteínas e ácidos nucleicos e degeneração cromossômica (Bewley e Black, 1994).

No sistema enzimático, relacionado com a deterioração de semente, merecem destaques as enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase removedoras de radicais livres e de peróxidos, bem como a malato desidrogenase, fosfatase ácida, glutamato desidrogenase que funcionam como indicadores de deterioração, uma vez que estão envolvidas no metabolismo celular (Vieira, 2009).

Polifenoloxidasas são enzimas que catalisam a oxidação dependente de oxigênio de monofenóis (ex. tirosinases) ou orto-difenóis (ex. catecolases, lacases) (Steffens et al., 1994). Funções distintas foram atribuídas a polifenoloxidase, tais como: pigmentação e enegrecimento do tecido vegetal (Boonsiri et al., 2007; Valentines et al., 2005); ação na reação de Mehler, na regulação do consumo de oxigênio durante a foto-respiração (Thipyapong et al., 2004) e proteção de plantas contra pragas e patógenos (Constabel e Ryan, 1998).

A catalase é uma enzima intracelular, encontrada no glioxissoma nos vegetais, com capacidade de transformar formas reativas de oxigênio em formas inofensivas, bem como a decomposição do peróxido de hidrogênio (Lehninger, 2006).

A peroxidase, assim como a catalase, têm papel importante na desintoxicação celular ao eliminar o peróxido de hidrogênio, espécie reativa de oxigênio (Lehninger, 2006). Peroxidasas são enzimas que agem de forma parecida com polifenoloxidasas, mas possuem como substrato principal peróxido de hidrogênio e uma outra molécula como doador de elétrons, que geralmente é um fenol mas pode ser uma infinidade de outros compostos orgânicos (Takahama e Oniki, 2000). Peroxidasas podem atuar tanto diretamente na defesa de plantas a patógenos, como também ser uma enzima chave em vias de sinalização relacionadas a diversos processos fisiológicos em plantas, inclusive resposta de defesa. A atividade dessa enzima varia com o tipo de tecido e estágio de desenvolvimento da planta, sendo sua atividade inversamente proporcional ao crescimento do indivíduo. Esse sistema enzimático tem sido usado como modelo para estudar o controle hormonal e os processos de crescimento nas plantas (Denna e Alexander, 1975). Pode também estar relacionada à peroxidação de lipídios e, assim como as fosfatases ácidas, ao processo de envelhecimento (Wilson e Mc Donald Jr, 1986; Vieira e Carvalho, 1994).

Danos celulares causados pela peroxidação de lipídios podem ser reduzidos ou prevenidos por mecanismos protetores, entre os quais podem-se citar os provenientes das ações de enzimas removedoras de radicais livres e de peróxidos, como a superóxido dismutase, a catalase e a peroxidase (Basavarajappa et al., 1991; Sung e Jeng, 1994; Bailly et al., 1996; Brandão Junior et al., 1999; Vieira, 1996).

As polifenoloxidasas são enzimas que catalisam a oxidação de diidrofenois produzindo importantes compostos ligados à defesa das plantas, que podem ser utilizados posteriormente para reações de síntese de compostos fenólicos como a lignina e fitoalexinas, importantes na redução na severidade de doenças (Inoue et al., 2010). Segundo Zawistowski et al. (1991), a polifenoloxidase está presente na membrana plasmática das sementes e com a desestruturação dessas membranas a enzima entra em contato com os compostos fenólicos catalisando a sua oxidação e reduzindo o seu conteúdo nas sementes.

A incapacidade de os tecidos das sementes sensíveis à dessecação efetuarem adequada proteção contra eventos oxidativos, conseqüentes do metabolismo desorganizado existente durante a desidratação e o armazenamento, pode ser considerada como uma das principais causas da sensibilidade à dessecação e da reduzida longevidade (Leprince et al., 1993). Dessa forma, o balanço entre geração e remoção de radicais, durante a secagem e o armazenamento das sementes, relaciona-se com a longevidade das mesmas.

Substâncias inibidoras, de diferentes categorias químicas, podem ser encontradas em sementes de várias espécies, interferindo no processo germinativo. Bewley e Black (1994) relacionaram diversas espécies que apresentam compostos inibidores localizados em diferentes estruturas da semente. Dentre estas substâncias, destacam-se os fenóis.

Maciel et al. (1992), trabalhando com sementes florestais, concluíram que a inibição promovida pelos fenóis é variável de acordo com sua localização na semente. Henderson e Nitsch (1962) mostraram que estes constituintes podem atuar como ativadores ou como inibidores do sistema enzimático, favorecendo ou não a atividade de auxina, influenciando, conseqüentemente, o crescimento da plântula. Nessa mesma linha, Zenk e Muller (1963), avaliando a ação de vários compostos fenólicos sobre o sistema enzimático AIA-oxidase, constataram efeitos sinérgicos com os ácidos clorogênico, caféico, diidrocaféico e sinápico, os quais atuaram para a manutenção do nível endógeno de auxina. Também Einhelling et al. (1982) demonstraram efeitos sinérgicos de fenóis no alongamento da raiz, crescimento de plântulas e germinação de sementes.

Segundo Carvalho e Nakagawa (2000), existem tegumentos que são impermeáveis ao oxigênio, sendo que a restrição à entrada deste gás no interior da semente, de acordo com Edwards (1973), é controlada basicamente pela presença de compostos fenólicos na casca. Vários compostos fenólicos podem atuar como inibidores do alongamento celular, ou consumir oxigênio durante o processo de oxidação, restringindo a quantidade de oxigênio que chega ao embrião (Bewley e Black, 1994).

Assim, torna-se evidente a necessidade de aprofundamento nos conhecimentos relacionados aos mecanismos envolvidos na perda da viabilidade das sementes de ipê-branco. Dessa forma, a presente pesquisa foi realizada com o objetivo de identificar os efeitos do armazenamento sobre a viabilidade e o vigor das sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith.

2. Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fotomorfogenese de Plantas, no departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista em Rio Claro – SP. As sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith) foram coletadas no período de abertura dos frutos nos meses de setembro e outubro em árvores localizadas no Campus da UNESP de Rio Claro. Foram utilizadas sementes recém colhidas e sementes armazenadas até 24 meses, em caixas plásticas hermeticamente fechadas, a 5°C mantidas em uma incubadora para BOD de acordo com Borba Filho e Perez (2009). retirando a cada 6 meses lotes para os experimentos durante um período de dois anos.

Na ocasião do armazenamento, o teor de água das sementes foi de 10%, determinado pela secagem das sementes em estufa a 105+ 3° C por 24 horas, de acordo com Brasil (2009).

Lipídeos – As sementes foram moídas em moinho de facas e posteriormente moídas com o auxílio de pistilo e almofariz, em solução de clorofórmio-metanol-água destilada (1:2:1 v:v), de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959). O conteúdo de lipídios totais foi determinado por método gravimétrico. Utilizou-se 4 repetições de 1g de sementes.

Proteínas – As sementes dos diferentes períodos de armazenamento foram maceradas, com o auxílio de pistilo e almofariz, em 25 mL de tampão fosfato 0,2M e pH 7,0 e centrifugadas a 5.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi, então, coletado e

quantificado. A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976), utilizando o reagente Comassie Blue G-250. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 595nm e comparadas com a curva de referência obtida com concentrações conhecidas de soro-albumina bovina - BSA. Foram utilizados 3 repetições com duplicatas.

Enzimas – A extração das peroxidases, catalase e polifenoloxidasas foi feita conforme Lee (1971). Sementes proveniente dos diferentes tempos de armazenamento foram deixadas para embeber durante 12 horas e moídas em moinho de facas e posteriormente maceradas com o auxílio de pistilo e almofariz em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,0 contendo 10mg de polivinilpolipirrolidona, sempre na presença de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 5.000 rpm a 5°C durante 30 minutos. Foram utilizadas 3 repetições de 1g.

Peroxidase - A atividade peroxidásica foi determinada utilizando-se como doador de H^+ o guaiacol 13mM em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 6,0 e peróxido de hidrogênio 5mM. A reação foi iniciada com a adição do extrato enzimático contendo 1mg de proteína e incubada a 37°C. A leitura foi realizada a 470nm (Lee, 1971). Foram utilizados 3 repetições com duplicatas.

Catalase - A atividade catalásica foi realizada conforme Goldblith e Proctor (1950). Os extratos enzimáticos foram incubados com peróxido de hidrogênio 0,01N em tampão fosfato 50mM, pH 6,8 a 25°C. A reação foi paralisada com ácido sulfúrico, adicionado permanganato de potássio ($KMnO_4$) na concentração final de 0,005N e a leitura foi realizada a 515nm. Foram utilizados 3 repetições com duplicatas.

Polifeniloxidase - A atividade polifenoloxidásica foi determinada segundo Campos et al. (2004). Em tubo gelado, foram colocados 3,6 mL de tampão fosfato 50mM, pH 6,0, 1mL do extrato enzimático, 0,1 mL de catecol 0,1 M, e a mistura foi agitada por 15 segundos e logo em seguida incubadas a 30°C por 30 minutos. Após este período os tubos foram transferidos para um banho de gelo. À mistura foi adicionado 0,2 mL de ácido perclórico a 1,4% e após agitação a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos. Após a leitura foi efetuada imediatamente a 395nm. Foram utilizados 3 repetições com duplicatas.

Compostos Fenólicos – As sementes foram moídas em moinho de facas, e posteriormente maceradas com o auxílio de pistilo e almofariz em uma solução de acetona (80%). O extrato foi centrifugado a 5.000 rpm por 30 min e diluído na proporção de 1:10. Utilizou-se 4 repetições de 1g de sementes. A metodologia utilizada para determinação de compostos fenólicos totais foi adaptada de Swain e Hillis (1959), em que para cada tubo de ensaio foram pipetados 250µL da amostra, adicionados 4mL de água destilada deionizada e 250µL do reagente Folin-Ciocalteu (0,25N), foram agitados e mantidos por 3 minutos para reagir. Após adicionou-se 500µL de carbonato de sódio (1N), que novamente foram agitados com vortex e deixados em repouso durante 15 minutos em um banho de água a 50°C. O espectrofotômetro foi zerado com o controle (branco) e foram feitas as leituras da absorbância no comprimento de onda de 760nm. Foram utilizados 3 repetições com duplicatas.

Teste de tetrazólio – As sementes foram pré-condicionadas em imersão em água por 12 horas, a 25°C. Decorrido este período, retirou-se as alas das sementes e os embriões foram colocados em frascos de vidro de cor âmbar, sendo totalmente submersos em solução de cloreto de 2, 3, 5 trifenil tetrazólio (pH 6,5) nas concentrações de 0,05% e 0,1% e mantidos no escuro a 36°C por 24 horas. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, seguindo a metodologia de Oliveira et al. (2005). Após o desenvolvimento da coloração, os embriões foram lavados em água corrente e deixados submersos em água até o momento da avaliação. Os embriões submetidos ao teste de tetrazólio foram separados no sentido longitudinal, abrangendo os cotilédones e o eixo embrionário.

As duas metades foram individualmente examinadas e, de acordo com a extensão, intensidade dos tons avermelhados, presença de áreas brancas leitosas, aspecto dos tecidos e localização destas colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento, os embriões foram individualmente colocados em categorias de viáveis e inviáveis, de acordo com padrões publicados por ISTA (2007).

Germinação – O teste de germinação foi realizado, de acordo com Stockman et al. (2007), em câmara de germinação a 30°C, sob luz branca constante. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para cada lote. As sementes foram colocadas para germinar em caixas gerbox com papel germtest e umedecidos com água destilada. A

avaliação do teste de germinação foi realizada diariamente a partir do 2º dia até o 15º dia após a montagem do teste, em porcentagem de germinação.

Comprimento de plântulas – As sementes foram colocadas para germinar em caixas gerbox com papel germtest e umedecidos com água destilada, permanecendo em câmara de germinação a 30°C, sob luz branca constante até o momento das avaliações, que se realizaram aos 30 dias após a semeadura. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para cada lote. Avaliou-se, com auxílio de um paquímetro, o comprimento da parte aérea e o sistema radicular (através da avaliação da raiz primária). O resultado foi expresso como média das plântulas observadas em cada tratamento e submetidas a análise de variância.

Peso seco de plântulas – Após a verificação do comprimento de plântulas, as mesmas foram acondicionada em sacos de papel e levadas à estufa com circulação forçada de ar, regulada a temperatura de 50°C, até atingir peso constante.

Após atingir peso constante, as plântulas foram pesadas em balança analítica e submetidas a análise de variância.

Emergência em viveiro – A semeadura foi conduzida em bandejas contendo terra e areia (2:1 v:v), com irrigação diária. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para cada lote. As avaliações foram feitas diariamente, até o 15º dia após a semeadura, considerando normais as plântulas que apresentavam a parte aérea e raiz em perfeito desenvolvimento.

Foram avaliados os tempos de armazenamento a cada 6 meses por um período de 24 meses e a testemunha (recém colhidas), totalizando 5 tratamentos, sendo cada um com 4 repetições. Os dados obtidos nos testes de tetrazólio, germinação, emergência, comprimento de plântulas e peso seco foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, os dados que apresentaram normalidade, realizou-se a ANOVA e as equações de regressão linear foram obtidos conforme Levine et al. (2008).

Além disso, os dados foram submetidos à análise de correlação, calculando-se o coeficiente de correlação Pearson (r) e testando a sua significância com o teste t (Zar 1996). Com o estudo da correlação, foram selecionadas as variáveis que apresentaram correlações significativas, a 5% de probabilidade.

Índice de velocidade de germinação (IVG) - calculado pelo somatório do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação, de acordo com a fórmula de Maguire (1962) citada por Nakagawa (1994):

$$IVG = G1/ N1 + G2/ N2 +... + Gn /Nn; \text{ onde}$$

IVG = índice de velocidade de germinação;

G1, G2, Gn = número de sementes germinadas computadas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem.

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

Os dados foram submetidos à análise da variância e, quando significativo, aplicaram-se regressão polinomial para as doses e comparação de médias, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), de todos os tratamentos, através do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2008).

3. Resultados e Discussão

As sementes recém-colhidas de *T. roseoalba* apresentam 98,75% germinação e no final dos dois anos de armazenamento a germinação caiu para 52% (Figura 1A) e, ao mesmo tempo, o índice de velocidade de germinação (IVG) diminuiu 6,7 para 3,9 (Tabela 1) com diferenças significativas em ambos os parâmetros que indicam claramente a diminuição do vigor dessas sementes. Comparando-se os testes realizados em laboratório e em casa de vegetação, a análise da variância detectou diferença entre as porcentagens, com acentuada queda na emergência de sementes armazenadas após 12 meses. Durante os meses de armazenamento, porém, para a germinação e todos os outros fatores avaliados houve diferença após 6 meses de armazenamento. As sementes recém-colhidas tiveram em todos os fatores avaliados, maior desempenho em relação às sementes submetidas ao armazenamento, o que permite inferir que o período entre a colheita e a semeadura, exerce influência na porcentagem, índice de velocidade de germinação, comprimento de plântulas e peso seco das plântulas e principalmente na emergência em viveiro, que apresentou queda maior ao longo de 24 meses de armazenamento (14,5%) (Figura 1C e Figura 2). Esses resultados coincidem com o teste

de tetrazólio, pois este indicou redução na porcentagem de semente viáveis a partir de 6 meses de armazenamento.

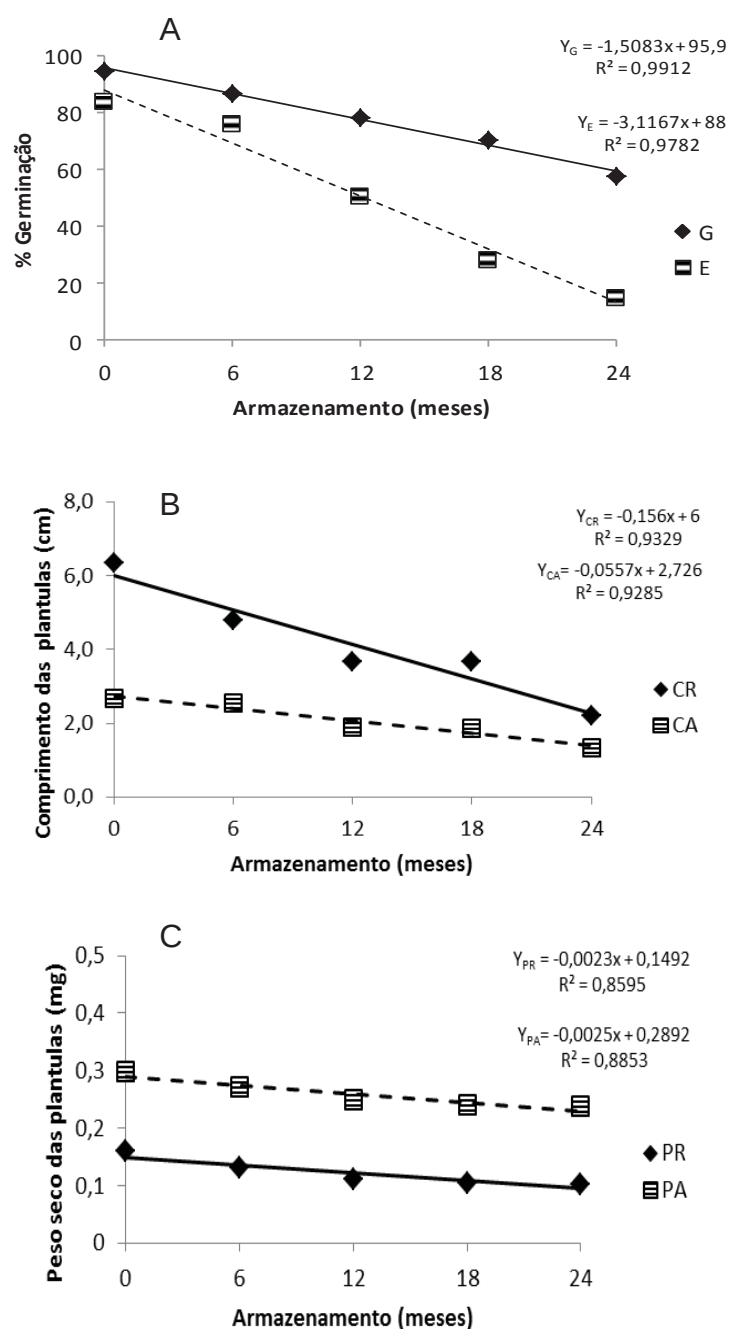


Figura 1. Resultados dos testes de porcentagem de germinação; comprimento da raiz e parte aérea das plântulas (B) e peso seco de raiz e parte aérea de plântulas (C) após 30 dias de germinação de sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith), submetidas ao armazenamento. (G – germinação; E – emergência; CR – comprimento da raiz; CA – comprimento da parte aérea; PR – peso raiz; PA – peso da parte aérea).

A análise de variância das variáveis: germinação, índice de velocidade de germinação, emergência de plântula em viveiro, peso seco e comprimento de raiz e parte aérea de plântulas, mostraram diferença significativa para os períodos de armazenamento a 0,1% de probabilidade pelo teste F (Tabela 1).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação de sementes (G), emergência em viveiro (E) e comprimento de raiz (CR), comprimento de parte aérea (CA), peso seco de raiz primária (PR) e peso seco da parte aérea (PA) de plântulas de de ipê-branco aos 30 dias em diferentes períodos de armazenamento.

FV	GL	Quadrados Médios					
		G	E	CR	CA	PR	PA
Armazenamento	4	826,30*	3575,7*	21,02*	2,70*	0,00217*	0,0025*
Erro	15	19,60	12,13	2,277	0,35	0,0002	0,0001
Total	19						
CV (%)		5,69	6,88	36,51	28,6	3,66	2,85
2							

* Significativo, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

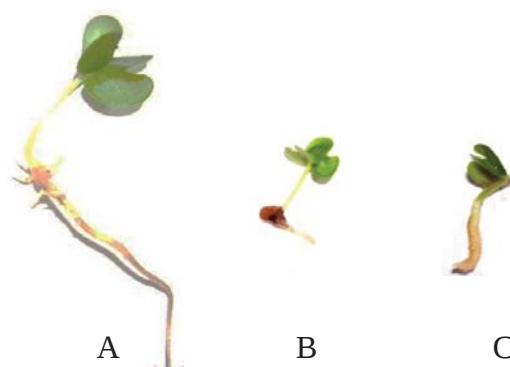


Figura 2. Aspecto das plântulas de ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith) após 30 dias de germinação, recém colhidas (A) e submetidas ao armazenamento de 12 (B) e 24 (C) meses.

As sementes dos lotes de ipê-branco com 0, 6, 12, 18 e 24 meses estavam todas com valores de teor de água próximas a 10%, na ocasião da realização dos testes, não sendo observadas diferenças estatísticas entre eles.

Na avaliação do teste de tetrazólio foram encontradas 6 categorias de sementes viáveis e inviáveis, sendo as viáveis encontradas apenas nas categorias de 1 a 3 (Figura 3).

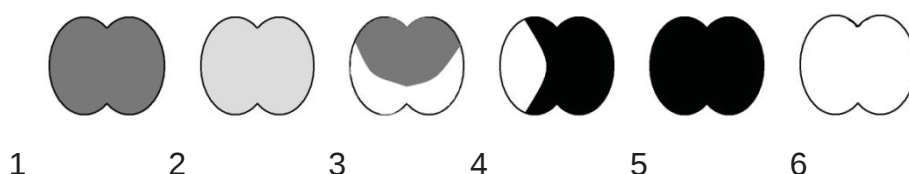


Figura 3. Categorias de colorações de sementes de ipê-branco encontradas no teste de tetrazólio: **Viáveis:** 1 - embrião com coloração rosa ou mais escura e tecidos com aspecto normal e firme; 2 – embriões com coloração rosa mais clara e tecidos firmes (eixo intacto); 3 - menos de 50% dos cotilédones descoloridos não afetando a região do eixo embrionário; **Inviáveis:** 4 - mais de 50% dos cotilédones descoloridos ou com coloração preta, afetando ou não do eixo embrionário; 5 - embrião com coloração preta e 6 - embrião completamente descolorido, com os tecidos flácidos.

A concentração de 0,1% possibilitou a diferenciação dos lotes de ipê-branco, correspondendo aos resultados obtidos no teste de germinação (Tabela 2), além de facilitar a análise visual por ter uma coloração mais nítida dos embriões. A escolha da metodologia adequada para o emprego do teste de tetrazólio deve basear-se na facilidade para a diferenciação de tecidos viáveis e inviáveis e na capacidade de diferenciar lotes de qualidades fisiológicas distintas (Oliveira, et al., 2004).

Tabela 2 - Porcentagens de sementes viáveis no teste de tetrazólio em ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith), para as diferentes concentrações e tempo de armazenamento.

Concentração de tetrazólio	Armazenamento (meses)				
	0	6	12	18	24
0,05%	98,75 Aa	77,50 Ab	62,50 Abc	43,75 Bc	41,50 Bc
0,1%	88,75 Aa	76,25 Aab	63,75 Aab	65,00 Ab	68,75 Ab

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

Várias concentrações da solução de tetrazólio podem ser utilizadas na condução do teste, dependendo da espécie avaliada, do método de preparo das sementes e da permeabilidade do tegumento, sendo que, para sementes de espécies florestais, essas concentrações variam de 0,05% a 1% (Marcos Filho et al., 1987).

Entretanto, as menores concentrações são mais indicadas por apresentarem menor custo com o reagente químico e por possibilitarem melhor visualização dos distúrbios de coloração e identificação de diferentes tipos de injúrias (França Neto et al., 1998). O teste de tetrazólio utilizando a concentração de 0,1% pode ser usado na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de ipê-branco durante o armazenamento, onde os maiores tempos de armazenamento resultaram em menor coloração do embrião.

Os resultados dos testes de tetrazólio e de germinação geralmente coincidem, porém, esses resultados podem apresentar discrepâncias consideráveis, isto porque, no teste de tetrazólio, somente o embrião é avaliado, não considerando a influência das estruturas externas das sementes nos resultados do teste de germinação, devido a possíveis infestações com patógenos no lote. Dessa forma, nem todas as anormalidades encontradas nas plântulas podem ser observadas nos embriões e, como consequência, o teste de tetrazólio pode apresentar resultados maiores que o do teste de germinação e emergência (CATIE, 2000).

As correlações lineares entre o armazenamento e as variáveis analisadas, demonstram que todas as variáveis foram significativas, negativas e altas. Quando se relaciona as variáveis com o tempo de armazenamento, a correlação foi significativa, porém negativa, inferindo que o aumento no tempo do armazenamento é desfavorável a todas as variáveis (Tabela 3).

Tabela 3. Matriz de coeficientes de correlações de Pearson das variáveis: porcentagem de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de emergência (E), porcentagem de sementes viáveis pelo teste de tetrazólio (Tv), peso seco da raiz de plântulas (PR), peso seco da parte aérea de plântulas (PA), comprimento da raiz das plântulas (CR) e comprimento da parte aéreas das plântulas (CP)

	Armaz.	G	IVG	E	Tz	P R (g)	P A (g)	C R (cm)	C P (cm)
Armazenamento	1,00	-0,95*	-0,94*	-0,98*	-0,57*	-0,91*	-0,91*	-0,91*	-0,91*
% Germ		1,00	0,94*	0,93*	0,46*	0,84*	0,84*	0,83*	0,84*
IVG			1,00	0,93*	0,40 ^{*NS}	0,76*	0,76*	0,77*	0,76*
% Emerg				1,00	0,58*	0,87*	0,89*	0,87*	0,89*
Tetrazolio (%viáveis)					1,00	0,62*	0,71*	0,67*	0,71*
Peso Raiz(g)						1,00	0,93*	0,99*	0,93*
Peso Aérea (g)							1,00	0,94*	1,00*
C Raiz (cm)								1,00	0,94*
C Aérea (cm)									1,00

Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. *NS não significante

As sementes de ipê-branco possuem em sua composição altos teores de lipídeos (63%), são, portanto classificadas como oleaginosas. Durante o armazenamento, os teores de lipídeos foram reduzidos. Nos primeiros 6 meses houve pouca variação sendo uma queda de aproximadamente 9%, seguida de redução brusca após 1 ano, sendo reduzidos a apenas 23% (Figura 3A).

Redução progressiva no teor de lipídios também foi encontrado em sementes de *Melanoxylon brauna* com o aumento da deterioração de sementes armazenadas e inferere que o aumento da peroxidação de lipídios, mediado por radicais livres e peróxidos é uma das prováveis razões para a perda da viabilidade de sementes durante o armazenamento. (Corte et al., 2010).

Os teores de proteínas nas sementes de ipê-branco são baixos e verifica-se que as proteínas tiveram queda ao longo de todo o período de armazenamento (Figura 3B).

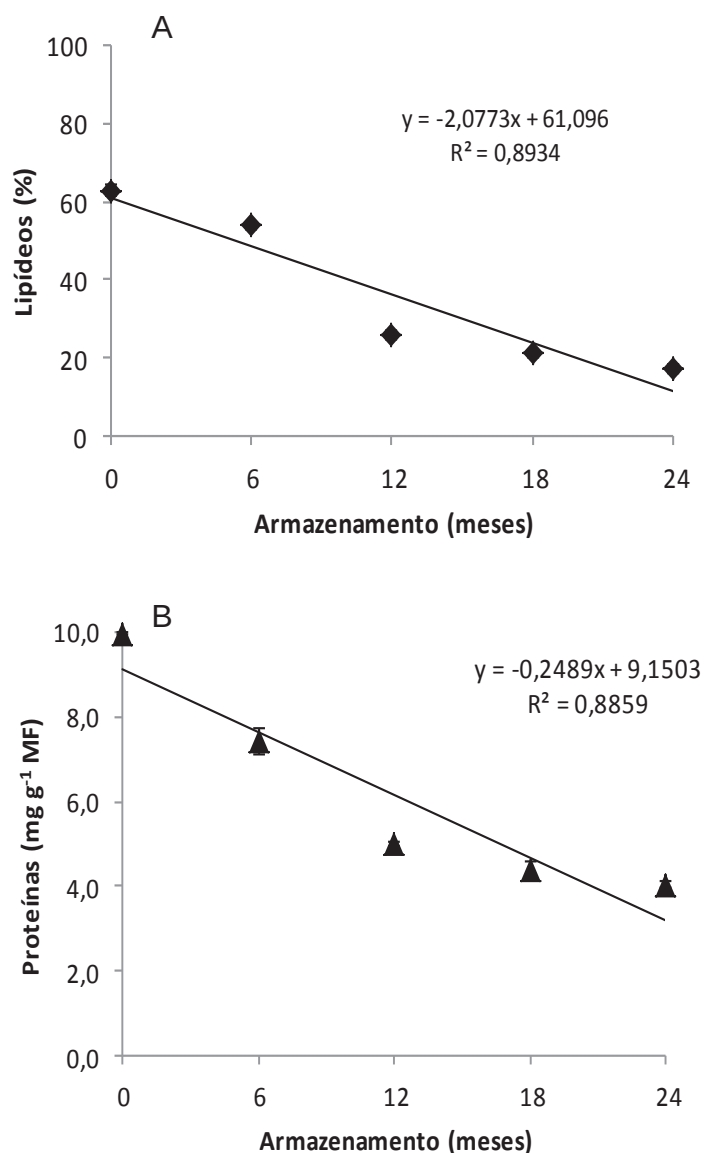


Figura 3. Teor de lipídeos (A) e proteínas (B) nos diferentes tempos de armazenamento de sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl). Sandwith).

Eichelberger et al. (2002) também obtiveram degradação de proteínas durante o armazenamento de sementes de azévm (*Lolium multiflorum*), sugerindo que o consumo de proteínas liberou aminoácidos para o consumo das atividades metabólicas e da respiração das sementes.

A maior atividade da peroxidase nas sementes pode contribuir para a preservação da sua qualidade fisiológica, mas no entanto, quanto maior o período de armazenamento das sementes de ipê-branco, menor a atividade da peroxidase, sugerindo que as sementes estão possivelmente no processo deteriorização (Figura 4A). Um decréscimo

de proteção enzimática contra o ataque oxidativo também foi associado à perda de viabilidade em sementes durante a secagem (Hendry et al., 1992).

Leprince et al. (1990) e Leprince (1992) verificaram redução da atividade da enzima peroxidase em raízes de milho intolerantes à dessecação. Hendry et al. (1992) e Finch-Savage et al. (1993), verificaram um aumento de radicais livres e uma diminuição das atividades de enzimas removedoras desses radicais durante a desidratação dos eixos embrionários de sementes de *Quercus rubur*, que são sensíveis à dessecação.

O declínio na atividade da peroxidase, também foi observado em *Copaifera langsdorffii* (Desai et al., 1997). Em sementes não viáveis, ocorre a redução da atividade de enzimas como acitocromo oxidase, malato e álcool desidrogenase, desidrogenase succínica e glutâmica e catalase, que podem contribuir significativamente para a redução da atividade respiratória (Desai et al., 1997).

De modo contrário, a produção de enzimas respiratórias é um indicador de que o embrião está viável. Nesse sentido, a ausência de mecanismos que tornem essas sementes capazes de corrigir tais deficiências, durante o desenvolvimento ou armazenamento, pode estar associada à perda da viabilidade da semente.

A catalase apresentou decréscimos significativos durante o armazenamento (Figura 4B). A atividade foi alta no tempo zero, com decréscimos significativos após 6 meses. A estabilização da atividade da enzima a partir de 12 meses de armazenamento coincidiu com o teor de lipídios, que estabilizou o seu decréscimo a partir desse período. Esses resultados corroboram os dados apresentados por Corte et al. (2010) onde a atividade da catalase diminuiu e estabilizou no mesmo tempo da estabilização dos lipídeos em sementes de *Melanoxylon braúna* submetidas ao armazenamento.

O decréscimo da atividade da catalase durante o armazenamento, está relacionado à eliminação de EROs formados durante o desenvolvimento da sementes (Corte et al., 2010). Em sementes de *Ginkgo biloba* armazenadas a 4°C a atividade da catalase manteve-se estável no embrião e endosperma, reduzindo significativamente sua atividade apenas aos 12 meses, ao passo que quando expostas a 25°C essa queda na atividade foi antecipada para os 6 meses de armazenamento (Tommasi et al., 2006).

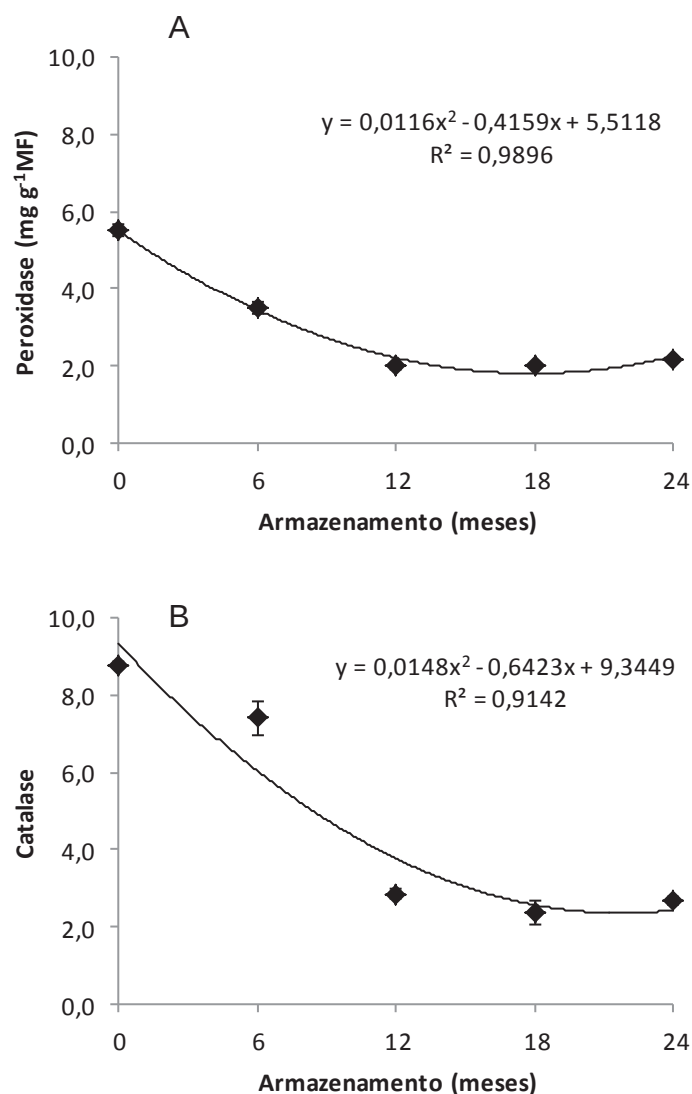


Figura 4. Atividade da peroxidase (A) e da catalase (B) nos diferentes tempos de armazenamento de sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl). Sandwith).

A atividade da enzima polifenoloxidase e o teor de fenóis da sementes de *T. roseoalba* elevaram-se com tempo de armazenamento (Figura 5). Moura et al. (1999) estudando sementes de feijão cultivar ‘Carioca’ submetidas ao armazenamento obtiveram um leve aumento nos seus conteúdos de compostos fenólicos totais, sendo também observado um maior escurecimento do tegumento em relação aos demais, após o período de armazenagem. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Iadéroza et.

al. (1989), que encontraram aos 3 meses de armazenamento, tanto a 7°C como a 25°C, um aumento no teor de taninos condensados em 6 cultivares de feijão estudados.

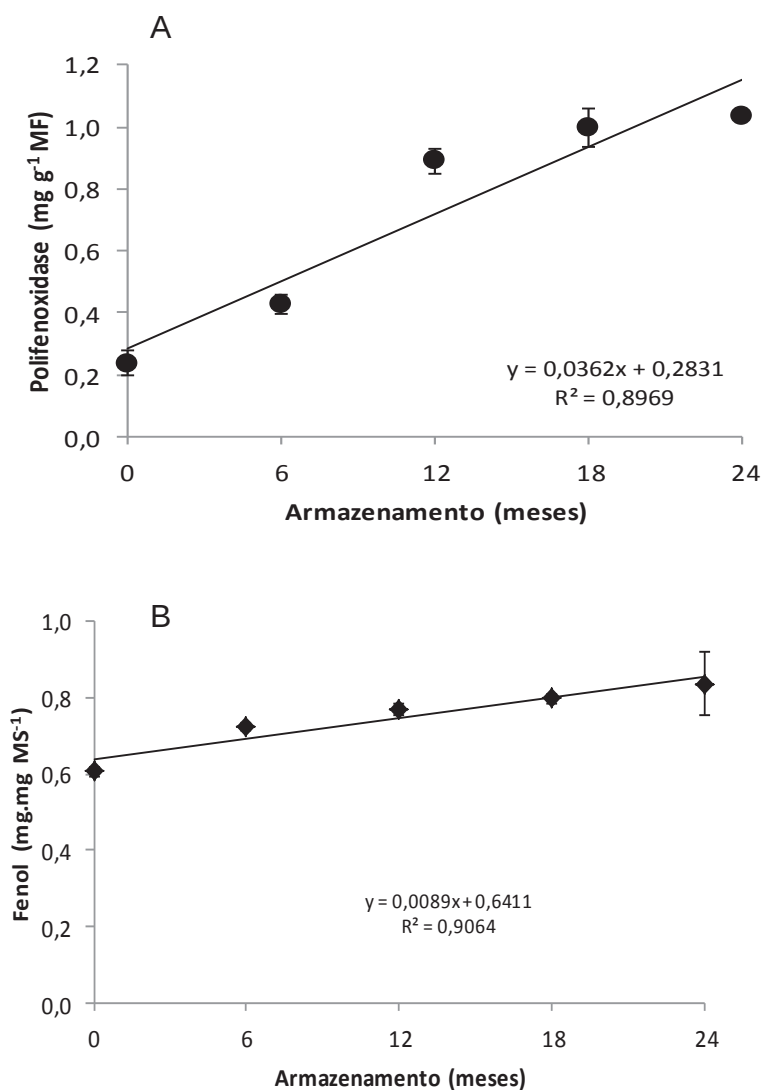
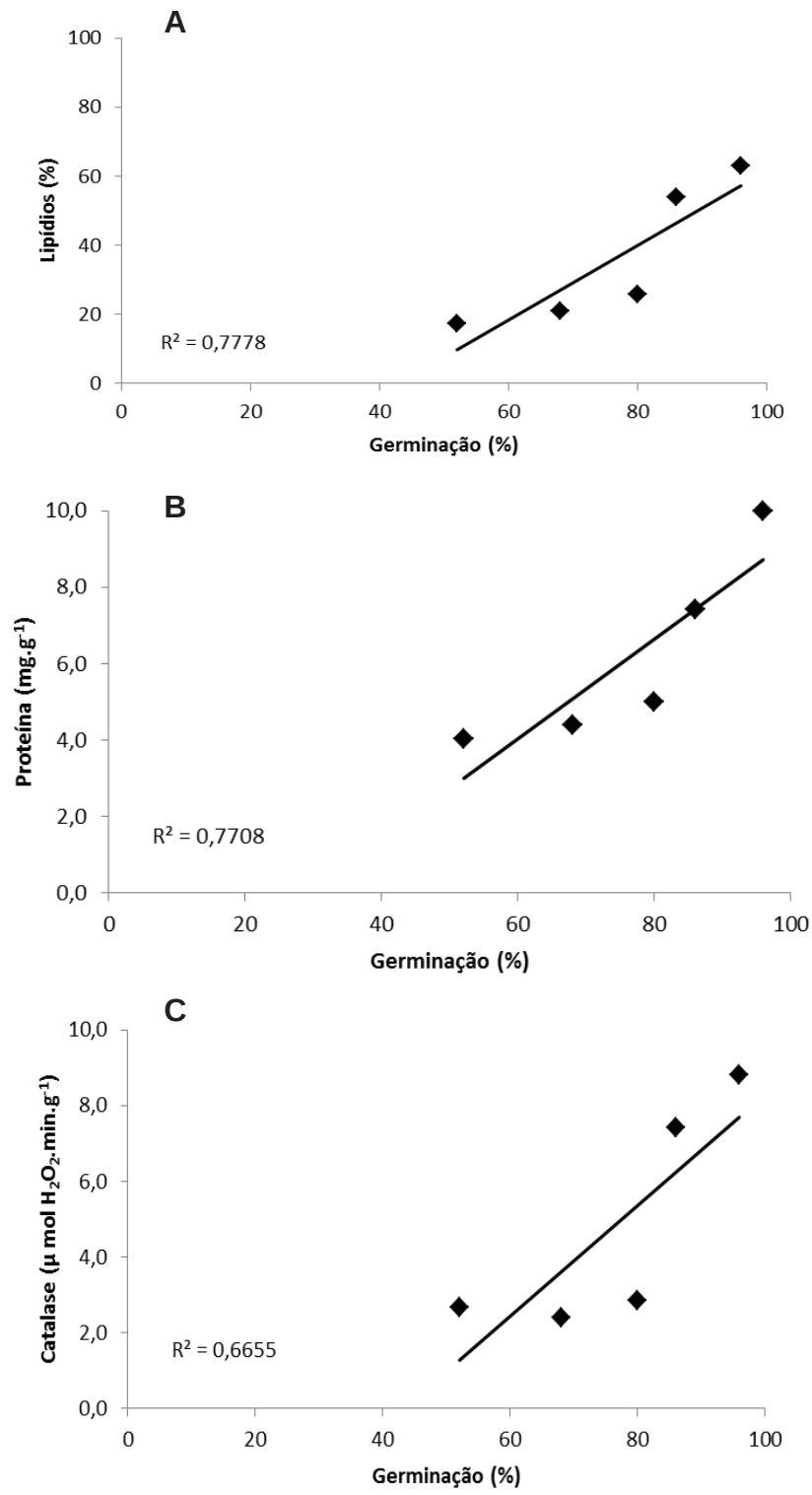


Figura 5. Atividade da polifenoloxidase (A) e o teor de fenóis (B) nos diferentes tempos de armazenamento de sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl). Sandwith).

Constata-se uma forte influência significativa de todas as variáveis analisadas em relação a germinação e ao tempo de armazenamento (Figura 6). Assim, podemos inferir que qualquer uma delas são um importante aspecto a ser considerado para o período de armazenamento da espécie, porém a que mais retrata a perda de viabilidade das sementes é o aumento do teor de compostos fenólicos ($R = 0.83$).



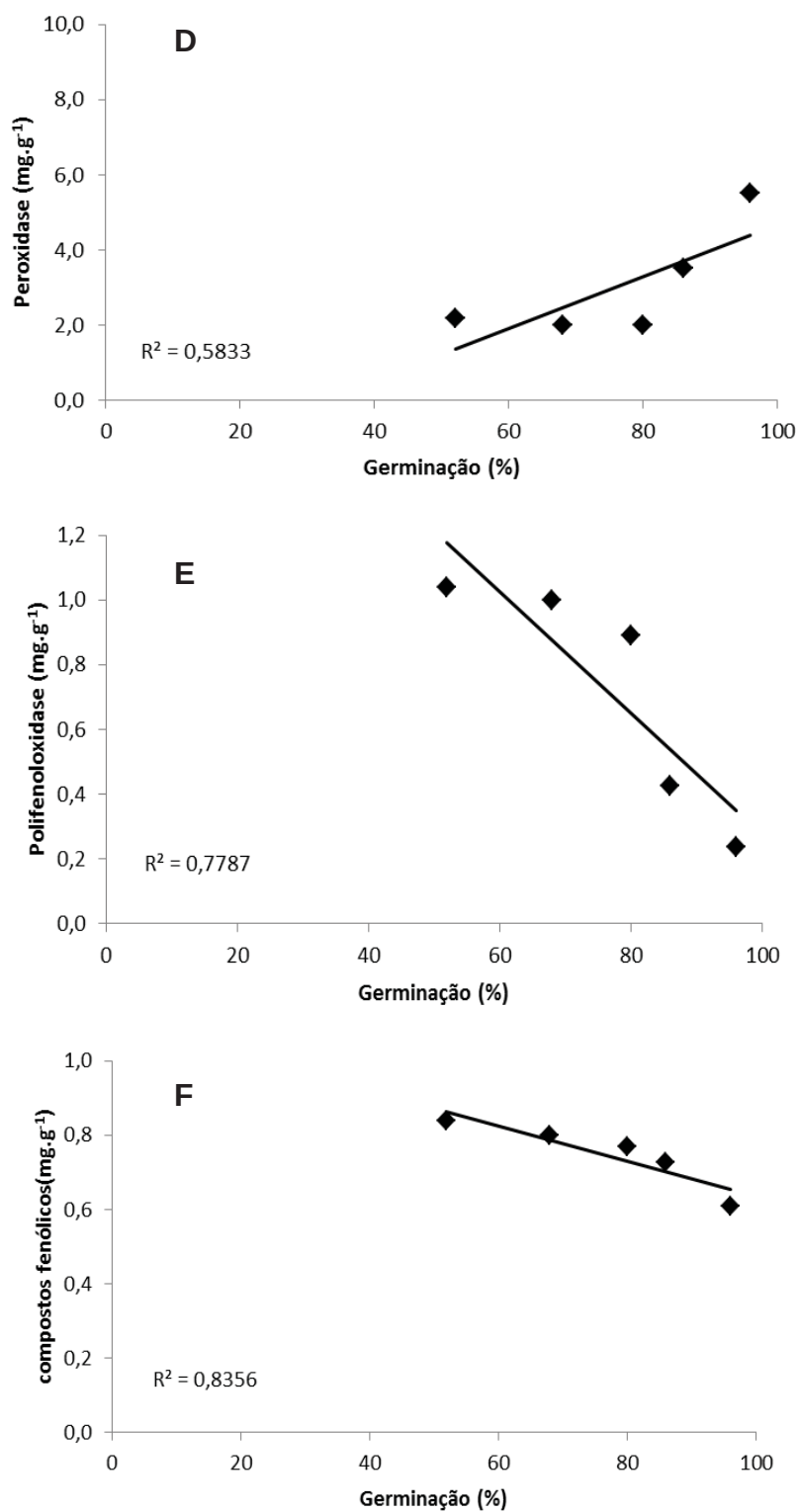


Figura 8. Correlação linear entre as análises bioquímicas e a porcentagem de germinação ao longo do período de armazenamento (A – lipídios; B – proteína; C – peroxidase; D – catalase; E – polifenoloxidase; F – compostos fenólicos).

4. Conclusões

Durante o armazenamento das sementes de *T. roseoalba* ocorre queda no teor de lipídeos, proteínas, atividade da peroxidase e catalase e aumento de compostos fenólicos e da atividade da polifenoloxidase e durante o armazenamento a porcentagem de germinação, comprimento e peso seco das plântulas reduziram e a germinação das sementes em viveiro é bruscamente reduzida com o armazenamento das sementes no período de 24 meses.

O teste de tetrazólio na concentração de 0,1% a 36°C durante 24 horas é indicado para avaliar a viabilidade das sementes de *T. roseoalba*.

As sementes de *T. roseoalba* podem ser classificadas como intermediárias pois toleram a dessecação mas não permanecem viáveis a longos períodos de armazenamento. As sementes devem ser armazenadas e utilizadas até um 1 ano após a coleta.

5. Referências Bibliográficas

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

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

BASU, R.N. seed viability. In: BASRA, A.S. **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: The Haworth Press, 1995. p.1-42.

BERJAK, P., DINI, M.; PAMMENTER, NW. Possible mechanisms underlying responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. **Seed Science and Technology**, vol. 12, no. 3, p. 365-384. 1984.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 455p.

BLIGH, E. G. and DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**. n.37, p.911-917, 1959.

BOONSIRI, K., KETSA, S. e VAN DOORN, W. G. Seed browning of hot peppers during low temperature storage. **Postharvest Biology and Technology**. v. 45, p. 358-365, 2007.

BORBA FILHO, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A. Armazenamento de sementes de ipê-branco e ipê-roxo em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, 2009.

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

BRANDÃO-JUNIOR, D.S.; DINIZ, A.R.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; OLIVEIRA, J.A. Avaliação de danos mecânicos e seus efeitos na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 21, nº 2, p.53-58, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

CABRAL, E.L.; BARBOSA, D.C.A.; SIMABUKURO, E.A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. e Hook. F. Ex. S. Moore. **Acta Botânica Brasília**, v.17, n.4, p. 609-617, 2003.

CAMPOS, A.D., FERREIRA, A. G., HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P., OSÓRIO, V. A. e AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF. v. 39, n. 7, p. 637-643. 2004.

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

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA – CATIE. **Proyecto de Semillas Forestales**. Laboratorio para analizar de 2000 a 5000 muestras de semillas. Turrialba – Costa Rica: CATIE, Danida Forest Seed Centre, 2000. 99 p. (Serie Técnica, Manual Técnico, 37).

CONSTABEL, C.P.; RYAN, C.A. A survey of wound - and methyl jasmonate – induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. **Phytochemistry**, v. 47, p. 507-511, 1998.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; LEITE, H. G.; PEREIRA, B. L. C.; DAVIDE, A.C.; FARIA, J.M.R.; BOTELHO, S.A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE; Lavras: UFLA, 1995. 41p.

DEGAN, P. et al. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de ipê branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 492-496, 2001.

DENNA, D.W.; ALEXANDER, M. B. The isoperoxidases of *Curcubita pepo* L. In: MARKET, C.L. **Isozymes II: physiological function**. New York: Academic Press, 1975. p. 851-864.

DESAI, B.B.; KOTTECHA, P.M.; SALUNKE, D.K. **Seeds handbook: biology, production, processing and storage**. New York: Marcel Dekker, 1997. 627p.

DESWAL, D.P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi e Ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v.25, p.409-417, 1997.

EDWARDS, M.M. Seed dormancy and seed environmental-internal oxygen relationship. In: HEYDECKER, W. (ed.). **Seed ecology**. Miyage-Ken: The Pennsylvania State University Press/ University Park, 1973. p.169-188.

EICHELBERGER, L.; Maia, M. S.; Peske, S.T.; Moraes, D. M. Composição química de sementes de azevém em resposta ao retardamento da secagem e ao armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, May, 2002.

EINHELLIG, F.A.; SCHON, M.K.; RASMUSSEN, J.A. Synergistic effects of four cinnamic acid compounds on grain sorghum. **Journal Plant**. v. 4, p. 251-258, 1982.

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

FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds - a study on three unrelated species. **Planta**, 178:189-198, 1989.

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

FINCH-SAVAGE, W. E.; GRANGE, R. I.; HENDRY, G. A. F.; ATHERTON, N. M. Embryo water status and loss of viability during desiccation in the recalcitrant seed species. *Quercus robur* L. In; CÔME, D.; CORBINEAU, F. (Ed.). **Fourth international workshop on seeds: basic and applied aspects of seed biology**. Paris: ASFIS, 1993. p. 723-730.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. O teste de tetrazólio em sementes de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998. 72p. (EMBRAPA-CNPSo, Documentos, 116).

HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. **Seed Biology**. New York: Academic Press, 1972. v.3, p.145-245.

HENDERSON, J.H.M.; NITSCH, J.P. Effect of certain phenolic acids on the elongation of *Avena* first internodes in the presence of auxin and tryptophan. **Nature**, v. 195, n.4843, p.780-782, 1962.

HENDRY, G. A. F.; FINCH-SAVAGE, W. E.; THORPE, P. C.; ATHERTON, N. M.; BUCKLAND, S. H.; NILSSON, K. A.; SEEL, W. E. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, London, v. 122, n. 2, p. 273-279, Oct. 1992.

HONG, T.D. & ELLIS, R.H. A comparison of maturation drying, germination, and desiccation tolerance between developing seeds of *Acer pseudoplatanus* L. and *Acer platanoides* L. **New Phytologist**, v. 116, p. 589-596, 1990.

IADEROZA, M., SALES, A.M., BALDINI, V.L.S. Atividade de polifenoloxidase e alterações da cor e dos teores de taninos condensados em novas cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) durante o armazenamento. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, p.154-164, 1989.

INOUE, T. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BATISTA, M. A.; OLIVEIRA, J. S. B. Efeito de doses crescentes de Zn na atividade de enzimas do metabolismo oxidativo e produção de fitoalexina em Cotilédones de soja. XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo. **Anais...**Guarapari – ES, 2010.

INTERNATIONALSEEDTESTINGASSOCIATION – ISTA. **International Rules for Seed Testing**. Zurich: ISTA, 2007, 369p.

KITAJIMA, K. Ecophysiology of tropical tree seedlings. In: MULKEY, S.S.; CHAZDON, R.L.; SMITH, A.P. **Tropical forest plant ecophysiology**. New York: Chapman e Hall, 1996. p. 559-596.

KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (eds.). Vigor de sementes: conceitos e testes. **Informativo ABRATES**, 1999. 218p.

LEE, C. R. Influence of aluminum on plant growth and mineral nutrition of potatoes. **Agronomy Journal**, v. 63, p. 604-608, 1971.

LEHNINGER A. L., NELSON D. L. , Cox MM. **Principles of Biochemistry**. 4th ed. São Paulo: Sarvier. 2006.

LEPRINCE, O. **Etude des mécanismes de la résistance à la déshydratation dans les embryos des plantes supérieures**. (PhD Thesis) – University of Liège, Liège 137p. 1992.

LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P. C.; ATHERTON, N. M.; HENDRY, G. A. F. The role of free radicals and radical processing systems in loss desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, London, v. 116, n. 4, p. 573-580, 1990.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, p. 231- 246. 1993.

LEVINE, D.M., STEPHAN, D., KREBHIEL, T.C. and BERENSON, M.L. **Estatística teoria e aplicações**. Tradução de Teresa Cristina Padilha de Souza. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 752 p. Tradução de: Statistics for Managers Using Microsoft Excel.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. (4ªed.). Instituto Plantarum, Nova Odessa, v.1, 2000. 384p.

MACIEL, A.S.; BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G. Determinação da presença de fenóis em sementes de espécies florestais e sua relação com inibidores de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v. 14, n.1, p.1-8, 1992.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S.M. e SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade fisiológica das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MARCOS-FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Eds). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: Funep, 1994. p.133-150.

McDONALD, M. B. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, v.8, p.265-275, 1998.

MOURA, A.C. de C., ABREU, C.M.P., SANTOS, C.D. dos, CORRÊA, A.D. Influência da exposição ao sol, dos tipos de secagem e do armazenamento, na atividade de peroxidase e polifenoloxidase e fenólicos totais em dois cultivares e uma linhagem de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.2, p.339-44, 1999.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 49-86.

NASSIF, S.M.L.; VIEIRA, I.G.; FERNADES, G.D. (LARGEA). **Fatores Externos (ambientais) que Influenciam na Germinação de Sementes**. Piracicaba: IPEF/LCF/ESALQ/USP, Informativo Sementes IPEF, 1998. Disponível em: <<http://www.ipef.br/sementes/>>. Acesso em: 08/maio/2012.

NAUTIYAL, A.R.; PUROHIT, A.N. Seed viability in sal. II. Physiological and biochemical aspects of ageing in seeds of *Shorea robusta*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.13, p.69-76, 1985.

OLIVEIRA, L. M. de; CARVALHO, M. L. M. de; GUIMARÃES, R. M.; MASETTO, T. E. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *Tabebuia impetiginosa* (Martius Ex A. P. de Candolle) Standley - (Bignoniaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 138-143, 2004.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; NERY, M. C. Teste de tetrazólio em sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley – Bignoniaceae. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 2, p. 169 - 174, 2005.

PENCE, V.C. Germination, desiccation and cryopreservation of seeds of *Populus peltoides* Bartr. **Seed Science and Technology**, v.24, p.1511-157, 1996.

PINTO, M.M.; SADER, R.; BARBOSA, J.M. Influência do tempo de secagem e do armazenamento sobre a viabilidade das sementes de ipê-rosa. **Revista Brasileira de Sementes**, v.8, n.1, p.37-47, 1986.

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

SACANDÉ M., GROOT S. P. C., HOEKSTRA F. A. , DE CASTRO R., BINO R. J. Cell cycle events in developing neem (*Azadirachta indica*) seeds: are they related to intermediate storage behaviour? **Seed Science. Reserch.** v. 7, p. 161-168, 1997

STEFFENS, J. C., HAREL, E. e HUNT, M. D. 1994. Polyphenol oxidase. In: **Recent Advances in Phytochemistry** Vol. 28. Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism (B.E. ELLIS, G.W. KUROKI e H.A. STAFFORD, ed.). Ienum Press, New York, p.275-312.

STOCKMAN, A.L.; BRANCALION, P.H.S.; NOVENBRE, A.D.L.C.; CHAMMA, H.M.C.P. Sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand. - Bignoniaceae): temperatura e substrato para o teste de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p.121-125, 2007.

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

SWAIN, T.; HILLIS, W. T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.10, p.135-144, 1959.

TAKAHAMA, U. e ONIKIT. Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: Physiological significance of the redox reaction. **Journal of Plant Research**. v.,n. 113, p. 301-309, 2000.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, v. 220, p. 105-117, 2004.

TODD-BOCKARIE, A. H. et al. Pretreatment to overcome seed coat dormancy in *Cassia sieberiana*. **Seed Science and Technology**, v.21, n.2, p.383-398, 1993.

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

VALENTINES, M.C., VILAPLANA, R., TORRES, R., USALL J. e LARRIGAUDIÈRE, C. Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. **Postharvest Biology and Technology**. v.36 p. 227-234. 2005.

VIEIRA, B. G. T. L. **Alterações histológicas e potencial fisiológico de sementes de soja**. 2009. 67p. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção e Tecnologia de Sementes, universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

VIEIRA, M. G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária a nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 114f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

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

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

ZAR, J.H. 1996. **Biostatistical analysis**. Prentice-Hall, Upper Saddle River.

ZAWISTOWSKI J, BILIADERIS CG, ESKIN NAM Polyphenol oxidase. *In* DS ROBINSON, NAM ESKIN, eds, **Oxidative Enzymes in Foods**. Elsevier Science Publishers, London, p. 217-273, 1991

ZENK, M.H.; MULLER, G. *In vivo* destruction of exogenously applied indolyl-3- acetic acid as influenced by naturally occurring phenolic acids. **Nature**, v. 200 (4908), p. 761-763, 1963.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As sementes de ipê-branco quando são colhidas apresentam em geral, grande umidade próximas a 20%, devendo ser desidratadas para o armazenamento.

Durante a extração de proteínas observou-se uma grande oxidação de fenóis o que foi controlado com a adição de polivinilpirrolodona, responsável pela adsorção destes compostos. Para a extração de proteínas e análises eletroforéticas, o tampão mais eficiente para a extração de proteínas totais foi o Trisma base (50mM, NCl 500mM, EDTA 50mM, MgCl₂ 5mM, (pH 7,5)) e quando realizada a quente resulta em maior rendimento. O tampão Trisma base foi o único que permitiu o aparecimento de bandas no gel de eletroforese.

Durante a germinação, ocorreu um rápido consumo de amido, carboidratos estruturais, lipídeos e no período de armazenamento das sementes de ipê-branco ocorre queda brusca no teor de lipídeos, proteínas, atividade da peroxidase e catalase e aumento de fenóis e atividade da polifenoloxidase, indicando a perda da viabilidade.

O teste de tetrazólio na concentração de 0,1% a 36°C durante 24 horas é indicado para avaliar a viabilidade das sementes de ipê-branco e se correlacionou positivamente com os dados de germinação, IVG, comprimento de raiz e parte área das plântulas.

Avaliando-se o vigor das plântulas, quando são proveniente de sementes novas, apresentam maior tamanho. No armazenamento a porcentagem de germinação, comprimento e peso seco das plântulas é reduzida o que influencia negativamente no desenvolvimento da plântula. A germinação das sementes em viveiro é bruscamente reduzida com o armazenamento das sementes no período de 24 meses.

De acordo com os resultados obtidos as sementes de *T. roseoalba* podem ser classificadas como intermediárias e permanecem viáveis por um período de 1 ano sob armazenamento a temperatura de 5°C.