

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

Josiane Cordeiro dos Santos

Caracterização morfofisiológica de pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda

Josiane Cordeiro dos Santos

Caracterização morfofisiológica de pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Orientador: Delacyr da Silva Brandão Junior

Coorientador: Paulo Sérgio Nascimento Lopes

Montes Claros

Março de 2021

Santos, Josiane Cordeiro dos.

S237c
2021

Caracterização morfofisiológica de pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda / Josiane Cordeiro dos Santos. Montes Claros, 2021.
55 f.: il.

Tese (doutorado) - Área de concentração em Produção Vegetal. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Delacyr da Silva Brandão Júnior.

Banca examinadora: Claudinéia Ferreira Nunes, Danúbia Aparecida Costa Nobre, Geraldo Aclécio Melo, Silvia Nietzsche.

Inclui referências.

1. Umbuzeiro. 2. Secas. 3. Sementes - Armazenamento. 4. Colorimetria. 5. Tetrazolio. I. Brandão Júnior, Delacyr da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 634.1

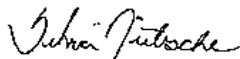
ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 30 dias do mês de março de 2021, às 08:00 horas, sob a Presidência do Professor Delacyr da Silva Brandão Junior, D. Sc. (Orientador - ICA/UFMG) e com a participação dos Professores Sílvia Nietzsche, D. Sc. (ICA/UFMG), Geraldo Aclécio Melo, D. Sc. (Unimontes), Claudinéia Ferreira Nunes, D. Sc. (ICA/UFMG) e Danúbia Aparecida Costa Nobre, D. SC. (UFVJM), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de tese de **Josiane Cordeiro dos Santos**, aluna do Curso de Doutorado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de tese intitulada: “Caracterização morfofisiológica de pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda”, sendo a aluna considerada (aprovada/reprovada) aprovada. E, para constar, eu, Professor Delacyr da Silva Brandão Junior, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do **ARTIGO 68** do regulamento do Curso de Doutorado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

Art. 68 Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, no mínimo 3 (três) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação ou, 4 (quatro) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da tese, no prazo de 60 (sessenta) dias.

Montes Claros, 30 de março de 2021.



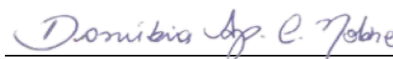
Sílvia Nietzsche
Membro



Geraldo Aclécio Melo
Membro



Claudinéia Ferreira Nunes
Membro



Danúbia Aparecida Costa Nobre
Membro



Delacyr da Silva Brandão Junior
Orientador

*Dedico a Deus, aos meus pais Maria
Ivanilde e José Luiz, a nossa família,
a nossos ancestrais e a todos
aqueles que creem no poder
transformador da ciência e da
educação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela consciência e pelo privilégio de ter ao meu lado pessoas abençoadas, instrumentos de Tua luz e sabedoria.

À caatinga pelo repositório de resiliência e de resistência ao estresse, consagrados no umbuzeiro.

Aos povos que no seio do semiárido brasileiro preservam o umbuzeiro entre seus costumes.

Aos meus ancestrais pelas vivências, histórias e vínculos de amor e de lealdade a vida (Deus).

A meu pai José Luiz e à minha mãe Maria Ivanilde por minha origem e pelas lições de amor, lealdade, integridade e respeito.

À docência que experimentei como aluna e professora que me moldou como ser humano e servidora; à mim mesma por tudo que consegui construir do que recebi e vivi até aqui.

Aos meus irmãos Enio, ... , Luciene e Wenderson pelo companheirismo e apoio.

À minha afilhada Pequena, Luara, pelo amor.

A meus queridos sobrinhos Enzo, Sophia, Helena, Ana Lara (minha menininha) e Ryan pela pureza, simplicidade e alegria.

Aos meus cunhados Cilene, Walmir e Luciana pelo apoio.

Aos meus amigos pelas conversas, risadas, confissões, conhecimento e afeto.

Ao professor Delacyr pela amizade, orientação e pelo exemplo de ser humano.

A todos os alunos, amigos e colegas que passaram pelo Laboratório de Análise de Sementes (LAS/UFMG) e pelo grupo Sementec pela amizade, companheirismo e aprendizado.

Aos professores Paulo Sérgio Nascimento Lopes, Leonardo Ribeiro Monteiro e Alcinei Místico Azevedo pela participação no comitê de coorientação.

À cooperativa agroextrativista Grande Sertão, em especial ao Neucy e a Delane, pela doação dos pirênios de umbuzeiro.

Aos meus queridos colegas de laboratório, principalmente aqueles que dedicaram tempo a realização deste trabalho (Mariuze, Sandro, Cecília, Flávia e Érika).

À Cristina de Paula Santos Martins pelos ensinamentos necessários a extração do ácido abscísico.

À Ane Patrícia Cacique pelo empenho nas análises de quantificação do ácido abscísico.

Aos professores e outros profissionais que em algum momento leram, corrigiram ou tiveram qualquer participação na produção desta tese, deixando aqui registrado seu cuidado e competência.

Aos professores, servidores técnicos administrativos e colaboradores responsáveis pela área de Fruticultura e pelos laboratórios de Biotecnologia do Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias (CPCA/UFMG) e de Química Instrumental e de Absorção Atômica da UFMG pelo apoio infra estrutural.

Aos setores administrativos e à Fazenda do Instituto de Ciências Agrárias (ICA/UFMG) pelo acolhimento que tornou possível a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal (PPGPV/UFMG) pelo apoio infra estrutural e financeiro.

A todos a minha eterna gratidão!!!!

*“Só o imperfeito pode evoluir. O perfeito já se
estagnou, cristalizou-se. Portanto só o
imperfeito tem futuro”.*
(Bert Hellinger)

"Não tenha medo; tão somente creia".
(Marcos 5,36)

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE PIRÊNIOS DE *SPONDIAS TUBEROSA* ARRUDA

RESUMO

A cadeia produtiva de frutos nativos tem crescido no Brasil e exigido a implementação de técnicas que viabilizem a caracterização de plantas bem como o desenvolvimento e a adaptação de metodologias para a análise de sementes com dormência. *Spondias tuberosa* Arruda, o umbuzeiro, é uma anacardiácea nativa da Caatinga, com produção extrativista e grande importância socioambiental. A espécie apresenta adaptações morfofisiológicas que servem de modelo para a elucidação de mecanismos estratégicos para a sobrevivência a seca. O pirênio lignificado apresenta dormência e tem sido um dos principais entraves a produção de mudas por propagação sexuada. Buscou-se com essa pesquisa caracterizar a morfofisiologia de pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda. Para tal, pirênios recém dispersos e armazenados, tratados ou não com agentes abrasivos e giberelina (GA_3), foram submetidos à análise. As respostas morfofisiológicas ao estresse térmico e hídrico foram obtidas após imersão direta dos pirênios em água, sob diferentes temperaturas (10, 20, 30 e 40°C) e em soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) de diferentes concentrações (potenciais de -2 a -8 Mpa, à temperatura de 30°C). A viabilidade e o vigor dos pirênios hidratados e desidratados foram determinados a partir da construção de curvas de embebição sob diferentes condições de temperatura e tempos de embebição e da análise das variáveis germinabilidade, concentração de ácido abscísico (ABA) e nível de atividade respiratória de tecidos, submetidos ao teste de tetrazólio. O teste de tetrazólio foi adequado para a utilização em pirênios de umbuzeiro, com a adoção da espectrofotometria na região do visível para a interpretação dos resultados. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, em esquema fatorial, sendo estimadas estatísticas descritivas, regressões e análises de variáveis canônicas com o auxílio do software R stúdio. Pirênios embebidos em soluções com potenciais hídricos (ψ_w) de -2 a -6 MPa apresentaram elevação no conteúdo de ABA e inibição da germinação. A semente recém dispersa apresentou elevado teor de ABA, não germinando em condições ideais de teor de água, oxigenação e temperatura. A germinação na espécie ocorre após 9 meses de armazenamento dos pirênios e redução significativa do teor de ABA. A temperatura de germinação para a espécie é de 20 e 30°C. Os pirênios de umbuzeiro apresentaram dormência primária e secundária. O teste de tetrazólio para a determinação da viabilidade de pirênios de umbuzeiro pôde ser conduzido, utilizando amostras de tecido embrionário, excisadas de pirênios embebidos em água por 24 horas, à temperatura ambiente, coradas em solução de sal de tetrazólio, por 16 horas na ausência de luz, na concentração de 0,5%. O método de quantificação de trifenílformazan por espectrofotometria para a interpretação do teste de tetrazólio é aplicável como metodologia de análise de qualidade para pirênios de umbuzeiro.

Palavras-chave: Umbuzeiro; secas; sementes - armazenamento; colorimetria; tetrazólio.

MORPHOPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *SPONDIAS TUBEROSA* ARRUDA PYRENES

ABSTRACT

The production chain of native fruits has grown in Brazil and required the implementation of techniques that enable the characterization of plants as well as the development and adaptation of methodologies for the analysis of seeds with dormancy. *Spondias tuberosa* Arruda, the umbuzeiro, is an *anacardiaceae* native to the Caatinga, with extractive production and great socio-environmental importance. The species has morphophysiological adaptations that serve as a model for elucidating strategic mechanisms for drought survival. The lignified pyrene presents dormancy and has been one of the main obstacles to the production of seedlings by sexual propagation. This research sought to characterize the pyrene morphophysiology of *Spondias tuberosa* Arruda. For this purpose, freshly dispersed and stored pyrenes, treated or not with abrasive agents and gibberellin (GA₃) were subjected to analysis. The morphophysiological responses to thermal and water stress were obtained after direct immersion of the pyrenes in water, under different temperatures (10, 20, 30 and 40°C) and in polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) solutions of different concentrations (potentials of -2 at -8 Mpa, at a temperature of 30°C). The viability and vigor of hydrated and dehydrated pyrenes were determined from the construction of imbibition curves under different conditions of temperature and imbibition times and from the analysis of the germinability variables, abscisic acid concentration (ABA) and level of respiratory tissue activity, submitted to the tetrazolium test. The tetrazolium test was suitable for use in umbuzeiro pyrenes, with the adoption of spectrophotometry in the visible region for the interpretation of results. The experiments were conducted in a completely randomized design, with five replications per treatment, in a factorial scheme, with descriptive statistics, regressions and analysis of canonical variables estimated with the aid of the software R studio. Pyrenes soaked in solutions with water potentials (ψ_w) of -2 to -6 MPa showed an increase in ABA content and inhibition of germination. The newly dispersed seed had a high ABA content, not germinating under ideal conditions of water content, oxygenation and temperature. Germination in the species occurs after 9 months of storage of the pyrenes and a significant reduction in the ABA content. The germination temperature for the species is 20 and 30°C. The umbuzeiro pyrenes showed primary and secondary dormancy. The tetrazolium test for determining the viability of umbuzeiro pyrenes could be conducted using embryonic tissue samples, excised from pyrenees soaked in water for 24 hours, at room temperature, stained in tetrazolium salt solution, for 16 hours in the absence of light, in the concentration of 0,5%. The triphenylformazan quantification method by spectrophotometry for the interpretation of the tetrazolium test is applicable as a quality analysis methodology for umbuzeiro pyrenes.

Keywords: Umbuzeiro; dried; seeds - storage; colorimetry; tetrazolium.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo geral.....	12
2.2	Objetivos específicos.....	12
3	REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1	Umbuzeiro	13
3.2	Aspectos morfofisiológicos de sementes associados a dormência	14
3.3	Técnicas alternativas de análise de qualidade de sementes.....	16
3.4	Referências bibliográficas	18
4	ARTIGOS	21
4.1	Artigo 1 – Respostas morfofisiológicas de pirênios de umbuzeiro ao estresse abiótico	21
4.2	Artigo 2 – Método de quantificação de trifênilformazan por espectrofotometria na determinação de viabilidade de pirênios de umbuzeiro	41
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

1 INTRODUÇÃO

O umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) é uma Anacardiácea, um importante elemento arbóreo do bioma Caatinga, cujo extrativismo e a comercialização dos frutos são fontes de renda para a população local durante a safra (SATURNINO; SOUZA, 2019). Em 2019, a coleta dos frutos movimentou 11.446 milhões de reais, sendo colhidos 8.544 toneladas de frutos (IBGE, 2020). Segundo Saturnino e Souza (2019), tem havido redução da produção nos últimos anos, relacionada a diminuição da densidade da espécie.

A cadeia produtiva de frutíferas nativas tem experimentado avanços consideráveis nos últimos anos. Seja pelo valor cultural ou por suas propriedades nutracêuticas, o consumo e a comercialização de frutos nativos bem como de produtos derivados têm crescido em todo território nacional. O “umbu” é uma fruta apreciada com aroma e sabor adocicado e acidulado, fonte de vitaminas (A, B1, B2, C e niacina), minerais (cálcio, fósforo e ferro) e compostos bioativos (ácido ascórbico, carotenóides e compostos fenólicos) (NARAIN *et al.*, 1992; VIDIGAL *et al.*, 2011; TEODÓSIO *et al.*, 2021). Contudo, o aumento do consumo tem interferido na regeneração natural da espécie.

Na Caatinga, o umbuzeiro enfrenta altas temperaturas, longas estações de seca e baixo índice pluviométrico. Exposto a ciclos de hidratação descontínua, são necessários recursos morfofisiológicos para garantir a sobrevivência da espécie. Dentre eles, a tolerância a dessecação aliada a habilidade de postergar a maturação fisiológica que retarda a deterioração dos tecidos, favorecendo a longevidade das sementes. Esse mecanismo de adaptação (dormência) numa espécie de interesse agrícola traz prejuízos financeiros, pois interfere no plano de cultivo, dificulta avaliações de qualidade e onera o plantio e a colheita.

A germinação lenta e desuniforme evidencia a existência de bloqueios a conclusão do desenvolvimento embrionário. Esse sistema de bloqueio instaurado durante a formação da semente e, ou após a dispersão, em resposta a interação de fatores genéticos e ambientais, garante a distribuição temporal da germinação e a sobrevivência do umbuzeiro no clima semiárido brasileiro.

Em pirênios recém dispersos de umbuzeiro, o percentual de germinação varia de 0 a 40% (NEVES; CARVALHO, 2005). Esse valor limita à propagação sexuada de mudas em viveiros e à regeneração natural de espécies nativas de áreas com elevado índice de interferência humana (onde há extrativismo e áreas degradadas).

A propagação sexuada em viveiros é dependente de tratamentos que promovam a aceleração do processo germinativo. Campos (1986), Araújo *et al.* (2001) e Lopes *et al.* (2009) preconizam o corte em bisel na porção distal, a aplicação de giberelinas e, ou o armazenamento dos pirênios por até 24 meses para a superação da dormência, sugerindo uma possível relação com aspectos fisiológicos da espécie. A semente é envolvida por endocarpo rígido e lignificado que impede o crescimento e a expansão do embrião, seja por conter o seu desenvolvimento ou por limitar o acesso a água e a gases como o oxigênio (FONSECA *et al.*, 2019).

A averiguação das alterações morfofisiológicas, inerentes a dormência, germinação e deterioração durante armazenamento das sementes são essenciais a produção e a preservação de espécies nativas, como o umbuzeiro. O desenvolvimento de protocolos de análise que podem ser utilizados para a caracterização morfofisiológica de sementes fornecerá subsídios para a seleção de melhores métodos

de propagação e armazenamento de pirênios de umbuzeiro, garantindo a sobrevivência dessa frutífera nativa, comumente utilizada e comercializada para subsistência de famílias no semiárido brasileiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a morfofisiologia de pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda (umbuzeiro).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o padrão de embebição em água dos pirênios de umbuzeiro;
- Verificar as condições de temperatura e de tempo de embebição que interferem no comportamento morfofisiológico dos pirênios;
- Quantificar o teor ácido abscísico em tecidos embrionários excisados de pirênios de umbuzeiro recém dispersos e armazenados;
- Determinar o tempo mínimo necessário de dispersão (armazenamento), requisitado para a germinação natural da espécie;
- Averiguar a capacidade de tolerância ao estresse hídrico;
- Adequar metodologia alternativa para a condução do teste de tetrazólio para a espécie.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Umbuzeiro

O umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) é uma anacardiácea arbórea de pequeno porte, com 6 a 8 metros de altura, tronco curto e tortuoso com ritidomas, copa arredondada com diâmetro de 10 a 15 metros, folhas pecioladas alternas, compostas e imparipinadas, serrilhadas ou lisas, glabras ou pilosas e frutos de valor comercial, comestíveis, tipo drupa, monocárpicos e monospérmicos (SATURNINO *et al.*, 2019). Xerófila e adaptada à solos com diferentes níveis de fertilidade (DONATO *et al.*, 2020), é comumente reconhecida pela presença de xilopódios nas raízes e pela lignificação do pirênio, unidade de dispersão da espécie.

O pirênio do umbuzeiro é caracterizado pela presença de endocarpo rígido, formado por três camadas, denso-fibrosa nas porções externa e interna e pouco fibrosa na porção intermediária, com orifícios (poros germinativos) que desobstruídos favorecem a absorção de água e a saída do eixo embrionário e cotilédones durante a germinação (CAMPOS, 1986; NEVES; CARVALHO, 2005). O endocarpo do gênero *Spondias* apresenta células esclerenquimatosas de orientação irregular, originária da epiderme locular e de parte do mesofilo ovariano, possuindo alto valor taxonômico e sistemático na família anacardiácea devido ao seu elevado grau de conservação estrutural entre diferentes gêneros (GUERREIRO; PAOLI, 1999). No umbuzeiro, a estrutura morfológica do pirênio destaca se também pelo papel desempenhado na manutenção da dormência.

A espécie apresenta propagação sexuada lenta e desuniforme, com percentuais de germinação inferiores a 40% em pirênios recém dispersos (NEVES; CARVALHO, 2005). Plantas produzidas por semeadura direta dos pirênios levam quase 10 anos para produzir frutos (FONSECA *et al.*, 2019). Essa característica aliada ao aumento da exploração extrativista têm dificultado a regeneração natural da espécie.

A propagação sexuada eleva a diversidade genética de mudas disponíveis em viveiros, gerando informações sobre o potencial de restabelecimento natural de espécies vegetais. No caso do umbuzeiro, os pirênios são importantes para a produção de porta enxertos pela facilidade de formação de xilopódios e na execução de estudos básicos de genética (ARAÚJO *et al.*, 2001) bem como em pesquisas que objetivem a caracterização de unidades de dispersão tolerantes a condições ambientais extremas de estresse hídrico e térmico. Já a propagação assexuada do umbuzeiro pode ser realizada por enxertia, garantindo a redução do período juvenil por pelo menos cinco anos, além da formação de xilopódios nas raízes, estrutura inexistente em plantas produzidas por estacas (FONSECA *et al.*, 2019).

O umbuzeiro apresenta as cultivares BRS 48, BRS 52, BRS 55 e BRS 68, registradas no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Essas cultivares destacam-se pela maior produtividade, pelo tamanho do fruto, pelo sabor mais adocicado (Brix entre 10° e 12°), pela maior proporção de polpa (até 80%) e pela resistência a pragas e doenças (RIBEIRO, 2020).

Umbuzeiros nativos adultos produzem cerca 300 kg de frutos/safra e tem grande importância socioeconômica para o semiárido brasileiro (DONATO *et al.*, 2009). A safra perdura por dois a três meses, de dezembro a fevereiro. A germinação ocorre entre 12 e 90 dias após a semeadura, dependendo da dormência do lote. O fruto é climatério e a dormência é uma das principais barreiras a

propagação sexuada na espécie, superada espontaneamente pelo armazenamento dos pirênios (ARAÚJO *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2018).

A abrasão mecânica do pirênio, com corte na região basal, o tratamento hormonal com giberelina e o armazenamento são os tratamentos mais usuais de superação de dormência indicados para o umbuzeiro (CAMPOS, 1986; ARAÚJO *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2009). No gênero *Spondia*, são referenciados os efeitos positivos da escarificação sobre o cajá (*Spondias lutea* L.) (FIRMINO; ALMEIDA; TORRES, 1997), o uso de ácido giberélico (GA₃) associado com citocinina por 12 horas com dose 350 mgL⁻¹ para o cajá-manga (*Spondias dulcis* Parkinson) (SOUZA *et al.*, 2020) e o armazenamento em condição ambiente por três meses para os diásporos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) (CARVALHO; NASCIMENTO, 2020).

3.2 Aspectos morfofisiológicos de sementes associados a dormência

Fisiologicamente, as sementes são classificadas quanto à tolerância a dessecação em recalcitrantes, intermediárias e ortodoxas. A recalcitrância limita a armazenabilidade em ambientes secos e as sementes são correntemente dispersas com elevado conteúdo de água e curta longevidade (BARBEDO, 2018). As espécies ortodoxas, dispersas com baixo teor de água, quiescentes ou dormentes, são tolerantes a dessecação e, comumente, resistentes ao armazenamento. Sementes com comportamento intermediário possuem resistência relativamente pequena ao frio e certa tolerância a dessecação (MARCOS-FILHO, 2015). Contudo, há vários comportamentos que tangem essa classificação. De um extremo a outro há espécies ortodoxas, com baixa longevidade e intolerantes ao frio, recalcitrantes armazenáveis à baixas temperaturas e condições edafoclimáticas, afetando a relação semente e planta-mãe e interferindo nessa dinâmica, uma vez que podem antecipar o acúmulo de reservas, a germinabilidade e até a própria dispersão das sementes em algumas espécies vegetais (BARBEDO, 2018).

A armazenabilidade impacta na alimentação da humanidade. Para que as primeiras técnicas agrícolas fossem aplicadas, para a transição da coleta à agricultura, era essencial que as plantas utilizadas tivessem sementes capazes de ser armazenadas e, portanto, tolerantes à dessecação (BARBEDO; CENTENO; RIBEIRO, 2013). A inserção de sementes em bancos de germoplasma, depende da sensibilidade à dessecação, da longevidade e de características do processo de deterioração que afetem a armazenabilidade (sistema antioxidante).

A tolerância à dessecação é definida durante a maturação da semente, assim como as condições mínimas necessárias para desencadear e concluir o processo de germinação. Em função de características genéticas (genótipo) e de condições ambientais (fenótipo), o grau de maturação no momento de liberação da semente da planta-mãe (dispersão), influencia a determinação do nível de tolerância à dessecação, a longevidade e a capacidade de germinar pós dispersão da espécie (BARBEDO, 2018).

Comumente, as sementes ortodoxas sofrem uma progressiva redução do teor de água no término do estágio de maturação, sendo dispersas com acúmulo de matéria seca e baixa umidade, quiescentes até a atuação de fatores genéticos e ambientais que propiciem o retorno e a progressão do desenvolvimento (MARCOS-FILHO, 2015). Os mecanismos que determinam tal continuidade ou a

permanência em um estado de repouso fisiológico (dormência) são estabelecidos durante a formação da semente ou após a dispersão, modulados geneticamente em resposta a diferentes fatores ambientais.

O acúmulo de reservas de carbono e nitrogênio responsáveis por sustentar o estabelecimento da muda após a germinação das sementes é gerenciado pela quantidade de água e por níveis críticos de ácido abscísico (ABA) que impedem a germinação enquanto há dependência fisiológica com a planta-mãe ou em condições ambientais desfavoráveis (MARCOS-FILHO, 2015). As condições sazonais do ambiente são percebidas pela planta-mãe que transmite à progênie, gerando variação nos estados de dormência por controle de padrões específicos de expressão gênica (PENFIELD, 2017).

A dormência é um estado de atividade metabólica reduzida, adotado por muitos organismos em condições de estresse ambiental (DORMANCY, 2021). Segundo Baskin e Baskin (2014) trata-se de um fenômeno caracterizado pela incapacidade de germinação, durante determinado período de tempo, sob condições ambientais favoráveis. Sementes dormentes se diferenciam das quiescentes pelo grau de repressão genética e de inibição ou deficiência metabólica (MARCOS-FILHO, 2015). A duração da fase de dormência é variável de acordo com a espécie e com as condições ambientais pós-maturidade.

A classificação da dormência geralmente envolve aspectos como a origem, localização e mecanismos envolvidos na indução e manutenção do processo (CARDOSO, 2009). Considerando a origem, a dormência pode ser definida como primária quando estabelecida durante a formação da semente ou secundária quando instalada durante a maturação e ativada após a dispersão (MARCOS-FILHO, 2015). Baskin e Baskin (2014) propõem subcategorias às classes de dormência endógena, relacionada ao embrião (morfológica, fisiológica e, ou morfofisiológica) e de dormência exógena imposta pelos envoltórios (física e, ou físico-fisiológica).

Nessa classificação, a dormência é dita morfológica quando as sementes são dispersas com embriões diferenciados e subdesenvolvidos quanto ao tamanho; fisiológica quando regulada por fatores metabólicos e gênicos; morfofisiológica quando caracterizada pela presença de embrião subdesenvolvido e dependente de algum fator fisiológico para progressão do desenvolvimento; física quando há impermeabilidade dos tecidos extraembrionários a absorção de água e gases ou quando esses tecidos produzem ou mantêm inibidores em contato com o embrião (dormência química) e, físico-fisiológica definida pela combinação de atributos da dormência física e fisiológica. Há classificações que consideram a resposta a intensidade do mecanismo de repouso, subdividindo os níveis em profundo, intermediário e não profundo e em tipos como 1, 2, 3, 4, 5, simples e complexo (CARDOSO, 2009).

A reversão do estado de dormência baseia-se na influência de fatores como o tempo, luz, água, oxigênio, promotores e, ou inibidores do desenvolvimento vegetal na ativação gênica e fisiológica do metabolismo da semente. Dentre a série de fatores envolvidos na dormência de sementes, os teores de água e de ácido abscísico têm sido preponderantes na reversão do metabolismo da fase de repouso para fase de germinação (MARCOS-FILHO, 2015). A caracterização do processo tem envolvido a determinação do papel biológico da água na semente e a descrição dos mecanismos de ação de promotores (giberelinas (GA_3)) e inibidores (ácido abscísico (ABA)).

A embebição de água pela semente promove a reativação do metabolismo. Com a reidratação há incremento e turgescência dos tecidos e intensificação da atividade respiratória, havendo ativação enzimática que desencadeia uma série de reações que propiciam o fornecimento de energia e nutrientes para o desenvolvimento embrionário (ATAÍDE; BORGES; LEITE FILHO, 2016). Segundo Penfield

(2017), após a embebição, um sinal específico para sementes amadurecidas ativa o catabolismo do ABA e a giberelina, produzida pelo embrião, quebra e mobiliza reservas de carbono endospermico armazenadas, induzindo a germinação.

A escassez de água durante a maturação da semente favorece o espessamento e a rigidez tegumentar e do endosperma (MARCOS-FILHO, 2015). Espécies com dormência imposta pelo tegumento apresentam germinação mais rápida e taxas de germinação mais elevadas em ambientes de baixa concentração de oxigênio e aumento da pressão parcial de oxigênio pois os níveis de disponibilidade desse gás são essenciais a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico (NO) nas sementes, ambos com importantes funções na sinalização do processo germinativo (PENFIELD, 2017).

As giberelinas são promotoras de crescimento que agem estimulando a maturação do embrião, o enfraquecimento de tecidos extraembrionários, a partir da produção de enzimas β -mananases e α e β amilases que atuam na mobilização de reservas (TAIZ; ZEIGER, 2009; MARCOS-FILHO, 2015). Sementes dispersas com dormência fisiológica e, ou morfológica são tratadas com doses de giberelina para superação e consequente germinação.

O ABA está envolvido em diversos processos morfofisiológicos de plantas e de redes de sinalização, com equilíbrio em situações estressantes ou não e participação em ações de proteção ao estresse ou de desenvolvimento (SAGAR; SINGH, 2019). Entre os vários fitohormônios, o ABA é o principal regulador da tolerância ao estresse abiótico em plantas e coordena uma série de funções na regulação da maturação e dormência das sementes (YUAN *et al.*, 2021). O ABA atua promovendo a síntese de proteínas inibidoras da germinação e bloqueia a síntese de enzimas envolvidas na mobilização de reservas (MARCOS-FILHO, 2015).

Existe uma ação integrada entre os fatores que determinam a manutenção da dormência. Há espécies que possuem mais de um fator impondo o repouso fisiológico. No geral, muitos desses fatores são superados com o tempo. A armazenabilidade dá tempo a maturação embrionária, enfraquece barreiras mecânicas por deterioração tecidual e intervém no balanço hormonal entre promotores e inibidores da dormência (MARCOS-FILHO, 2015).

3.3 Técnicas alternativas de análise de qualidade de sementes

A produção e a utilização de sementes de alta qualidade são chaves importantes e básicas para o sucesso da produção agrícola, requisitando da indústria de sementes o desenvolvimento de programas de controle de qualidade versáteis e dinâmicos, para a geração de resultados precisos e rápidos (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2019).

O uso de sementes para a propagação e o estabelecimento de culturas estimulou o desenvolvimento de técnicas específicas para análises em laboratórios, fornecendo informações à cadeia produtiva de sementes e mudas. As análises de qualidade e de identidade envolvem aspectos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários das sementes, visando a determinação de épocas mais favoráveis para a semeadura, a redução de falhas na germinação e a limitação de dificuldades inesperadas, associadas a dormência e a deterioração, durante o armazenamento (MARCOS-FILHO, 1999).

A profissionalização do setor sementeiro requer a adoção de técnicas que superem os benefícios e o número de informações geradas pelas análises preconizadas por livros de referência como a Regra de Análise de Sementes (RAS), BRASIL (2009). A RAS traz protocolos de análise aplicáveis a uma série de espécies agrônomicas, embora ainda não contemple da mesma forma espécies florestais, frutíferas ou ornamentais. Dos principais testes de vigor, o teste de tetrazólio é referenciado na obra, sendo amplamente utilizado na análise de sementes, agregando informações ou mesmo substituindo os testes de germinação.

O teste padrão de germinação é um dos testes mais referenciados para a determinação da qualidade de sementes. No entanto, apesar de possibilitar a determinação do potencial de germinação em condições ótimas, não permite detectar o progresso da deterioração das sementes (MARCOS-FILHO, 1999). Em sementes com dormência, por exemplo, não há aplicabilidade do teste germinação sem tratamentos de superação de dormência. Tais desvantagens tem permitido a inclusão de testes alternativos de viabilidade e vigor em estratégias de análise de qualidade fisiológica de sementes. O teste de frio, a condutividade elétrica, o envelhecimento acelerado e o tetrazólio têm sido realizados em conjunto com testes de germinação, sendo favorecidos com a publicação de protocolos otimizados e com aplicabilidade em diferentes espécies.

O teste de tetrazólio, por exemplo, permite a detecção de diferentes tipos de injúrias ao tegumento ou a integridade das membranas de sementes, mensurando o nível de atividade respiratória celular. Utilizado amplamente no Brasil e não influenciado pela dormência, o teste de tetrazólio fornece informações rápidas e precisas de diversos aspectos da morfofisiologia das sementes (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2019), refletindo a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração (AOSA, 1983). Assim, os tecidos vivos e mortos das sementes são identificados pela presença ou ausência da coloração vermelha (formazan), respectivamente (FRANÇA-NETO, 1999). Esses resultados demonstram a atividade de sistemas enzimáticos intimamente relacionados à germinabilidade das sementes.

Para redução da subjetividade do teste de tetrazólio, a interpretação visual dos resultados tem sido substituída por análise de imagem e, ou colorimetria. Os critérios adotados para a sua realização, como a concentração da solução do sal de tetrazólio e o tempo de exposição necessário a coloração dependem da espécie avaliada, do método de preparo das sementes e da permeabilidade do tegumento (MARCOS-FILHO; CICERO; SILVA, 1987).

A exposição do embrião é uma etapa importante da análise uma vez que a velocidade de difusão da solução de tetrazólio afeta a condução do teste e a precisão e confiabilidade dos resultados. Para redução do tempo de coloração e aumento da extensão dos tecidos corados é preconizada a retirada do tegumento, o puncionamento ou o corte (transversal ou longitudinal) da semente para acesso aos tecidos embrionários (BRASIL, 2009). A extração é pré condicionamento essencial à espécies que possuem tecidos impermeáveis envolvendo o embrião. A aplicação do teste de tetrazólio em algumas palmeiras, por exemplo, exige a excisão do embrião zigótico, devido, principalmente, ao tamanho das sementes e a dificuldade de exposição dos tecidos (LEDO *et al.*, 2013).

3.4 Referências bibliográficas

- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **The Seed Vigor Testing Committee**. Seed Vigor Testing handbook. East Lansing: AOSA, 1983. 93p. (AOSA. Contribution to the Handbook on Seed Testing, 32).
- ARAÚJO, F. P.; SANTOS, C. A. F.; CAVALCANTE, N. B.; REZENDE, G. M. Influência do período de armazenamento das sementes de umbuzeiro na sua germinação e no desenvolvimento de plântula. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 1, n. 26, p. 36-39, 2001.
- ATAÍDE, G. da M.; BORGES, E. de L.; LEITE FILHO, A. T. Alterações fisiológicas e biométricas em sementes de *Melanoxylon brauna* Schott durante a germinação em diferentes temperaturas. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 40, n. 1, p. 61-70, 2016.
- BARBEDO, C. J. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 40, n. 3, p. 221-236, 2018.
- BARBEDO, C. J.; CENTENO, D. C.; RIBEIRO, R. C. L. F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, São Paulo, v. 40, p. 583-593, 2013.
- BARROS, R. T.; MARTINS, C. C.; PEREIRA, F. E. C. B.; SILVA, G. Z. Conditioning in the promotion and uniformization of Umu seed germination. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.40, n.1, 2018.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination**. 2. ed. San Diego, CA: Academic Press, 2014. 1586p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 398p.
- CAMPOS, C. de O. **Estudo da quebra de dormência da semente do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.)** 1986. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 1986.
- CARDOSO, V. J. M. Conceito e classificação da dormência em sementes. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 619-631, 2009.
- CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. Water absorption and physiological responses of hog plum tree diaspores to storage. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 42, n. 3, e-573, 2020.
- DONATO, S. L. R.; ARANTES, A. M.; GONÇALVES, N. P.; MATOS, F. S. ; RODRIGUES, M. G. V.; SATURNINO, H. M. Aspectos ecofisiológicos, morfológicos, fenológicos e de produção do umbuzeiro e da umbucajazeira. In: GONÇALVES, N. P.; SATURNINO, H. M.; DONATO, S. L. R. (eds.). Umbuzeiro a fruteira da Caatinga. **Informe agropecuário Epamig**, Belo Horizonte, v. 40, n. 307, p. 22-38, 2019.
- DORMANCY. 2021. In: **Encyclopaedia Britannica**. Disponível em: <https://academic-eb-britannica.ez27.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/dormancy/110425>. Acesso em: 18 mar. 2021.
- FIRMINO, J. L.; ALMEIDA, M. C.; TORRES, S. B. Efeito da escarificação e da embebição sobre a emergência e desenvolvimento de plântulas de cajá (*Spondias lutea* L). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, PR, v. 19, n. 1, p. 125-128, 1997.
- FONSECA, N.; CARDOSO, M. M.; RITZINGER, R.; LONDE, L. C. N.; GONÇAVES, M. P.; SATURNINO, H. M. Propagação do umbuzeiro. In: GONÇALVES, N. P., SATURNINO, H. M., DONATO, S. L. R. (eds.). Umbuzeiro a fruteira da Caatinga. **Informe agropecuário Epamig**, Belo Horizonte, v. 40, n. 307, 2019. p.39-51.
- FRANÇA-NETO, J. B., KRZYZANOWSKI, F. C. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. **Journal of Seed Science**, Londrina, PR, v. 41, n. 3, p. 359-366, 2019.

FRANÇA NETO, J.B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. *In*: KRZYNOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (eds.). Vigor de sementes: conceitos e testes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 8, p. 81 – 87, 1999.

GUERREIRO, S. C.; PAOLI, A. A. S. Morphology and anatomy of the seed development of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 91-98, 1999. DOI: 10.1590/S0100-84041999000100012.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. SIDRA. **Produção extrativista vegetal. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**: quantidade produzida na extração vegetal de umbu (fruto) em 2019. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2019>. Acesso em: 18 mar. 2020.

LEDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; GONDIM, D. C.; MACHADO, C. A. **Aplicação do teste de tetrazólio para estudos de viabilidade em embriões zigóticos de coqueiros**. Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013. 5p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 130).

LOPES, P. S. N. ; MAGALHÃES, H. M. ; GOMES, J. G. ; BRANDÃO JÚNIOR, D. S.; ARAÚJO, V. D. Superação da dormência de sementes de umbuzeiro (*Spondias tuberosa*, arr.Câm.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 31, n. 3, p. 872-880, 2009.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 660p.

MARCOS-FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. *In*: KRZYNOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (eds.). Vigor de sementes: conceitos e testes. **ABRATES**, Londrina, PR, v. 8, p.8 - 1 - 8 -7, 1999.

MARCOS-FILHO, J.; CICERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba, SP: Fealq, 1987. 230 p.

NARAIN, N.; BORA, P. S. ; HOLSCHUH, H. J. ; VASCONCELOS, M. A. D. Variation in physical and chemical-composition during maturation of umbu (*Spondias tuberosa*) fruits. **Food Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 255-259, 1992.

NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. G. **Tecnologia da produção do Umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.)**. Lavras, MG: UFLA, 2005.

PENFIELD, S. Seed dormancy and germination. **Current Biology**, v. 27, n.17, p. R874-R878, 2017.

RIBEIRO, M. **Cientistas desenvolvem as primeiras cultivares de umbuzeiro**. Embrapa Semiárido, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/47436939/cientistas-desenvolvem-as-primeiras-cultivares-de-umbuzeiro>. Acesso em: 18 Mar. 2021.

SAGAR, S.; SINGH, A. Absciscic acid, a principal regulator of plant abiotic stress responses in plant signaling molecules. *In*: KHAN, M. Iqbal R.; REDDY, Palakolanu Sudhakar; FERRANTE, Antonio; KHAN, Nafees A. (ed.). **Plant signaling molecules: role and regulation under stressful environments**. United Kingdom: Elsevier, 2019.

SATURNINO, H. M.; GONÇALVES, N. P.; CASTRICINA, A.; CARDOSO, M. M.; SOUZA, I. Características botânicas do umbuzeiro e outras *Spondias*. *In*: GONÇALVES, N. P.; SATURNINO, H. M.; DONATO, S. L. R. (eds). Umbuzeiro a fruteira da Caatinga. **Informe agropecuário Epamig**, Belo Horizonte. 40, n. 307, p. 7-21, 2019.

SATURNINO, H. M.; SOUZA, I. Aspectos socioeconômicos do umbuzeiro. *In*: GONÇALVES, N. P.; SATURNINO, H. M.; DONATO, S. L. R. (eds). Umbuzeiro a fruteira da Caatinga. **Informe agropecuário Epamig**, Belo Horizonte, v. 40, n. 307, p.120-131, 2019.

SOUZA, P. H. M.; RAGAGNIN, A. L. S. L.; RIBEIRO, R. C.; SILVA, G. Z.; ROCHA, D. I.; SILVA, D. F. P. Dormancy overcoming in seeds of cajá-manga (*Spondias dulcis*). **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, Piauí, v. 11, p. e3341, 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TEODOSIO, A. E. M. M.; ARAÚJO, R. H. C. R.; SANTOS, B. G. F. L.; LINNÉ, J. A.; MEDEIROS, M. L. S.; ONIAS, E. A.; MORAIS, F. A. de; SILVA, S. de M.; LIMA, J.F. de. Effects of edible coatings of *Chlorella* sp. containing pomegranate seed oil on quality of *Spondias tuberosa* fruit during cold storage. **Food Chemistry**, v. 338, 2021.

VIDIGAL, M. C.; MINIM, V. P.; CARVALHO, N. B.; MILAGRES, M. P.; GONÇALVES, A. C. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices: Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Cajá (*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1988-1996, 2011.

YUAN, C.; HAN, J.; CHANG, H. ; XIAO, W. Arabidopsis CK2 family gene CKB3 involved in abscisic acid signaling. **Brazilian Journal of Biology** [online], São Carlos, SP, v. 81, n. 2, p. 318-325, 2021.

4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1 – Respostas morfofisiológicas de pirênios de umbuzeiro ao estresse abiótico

Versão em português de proposta de artigo redigida sob as normas bibliográficas sugeridas pelo Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da UFMG.

Respostas morfofisiológicas de pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda ao estresse abiótico

Josiane Cordeiro dos Santos^{1,*}; Delacyr da Silva Brandão Júnior¹

¹ Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, 39404-547, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

*Para correspondência (josysannn@yahoo.com.br).

Os autores contribuíram igualmente.

RESUMO

O umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) é uma anacardiácea endêmica da Caatinga. Pirênios com endocarpo lenhoso e embriões complacentes a secagem e a reidratação garantem a espécie a habilidade de pausar o processo germinativo ante a escassez de recursos, favorecendo a formação de banco de sementes e de mecanismos estratégicos para a sobrevivência. Buscou-se com essa pesquisa verificar o comportamento morfofisiológico de pirênios de umbuzeiro submetidos ao estresse hídrico e térmico e a armazenabilidade. Para estimar a interferência de condições estressantes na morfofisiologia de pirênios de umbuzeiro foi empregada a análise de variância multivariada. A resposta dos pirênios aos ciclos de hidratação descontínua, armazenamento e ao estresse térmico e hídrico foi discriminada por curvas de embebição e pela análise de variáveis como o potencial de germinação e de emergência, o teor de ácido abscísico (ABA) e o nível de atividade metabólica de tecidos embrionários por detecção espectrofotométrica do trifenilformazan. Pirênios de umbuzeiro apresentaram padrão desuniforme de embebição. Pirênios embebidos em soluções com potenciais hídricos (ψ_w) de -2 a -6 MPa apresentaram alteração no conteúdo de ABA e inibição da germinação. A semente recém dispersa apresenta elevada concentração de ABA, não germinando em condições ideais de teor de água, oxigenação e temperatura. A germinação na espécie ocorre após 9 meses de armazenamento dos pirênios e redução significativa do ABA. A temperatura de germinação para a espécie é de 20 e 30°C.

PALAVRAS-CHAVE: Umbuzeiro, semiárido brasileiro, bioma Caatinga, tolerância à seca, hidratação descontínua, memória hídrica, viabilidade e armazenamento de sementes.

DECLARAÇÃO DE SIGNIFICÂNCIA

A tolerância ao estresse abiótico garante a propagação de sementes em condições ambientais adversas. *Spondias tuberosa* Arruda (umbuzeiro) apresenta adaptações morfofisiológicas que servem de modelo para a elucidação de mecanismos estratégicos para a sobrevivência a seca. A barreira mecânica imposta pelo pirênio lenhoso, a habilidade de pausar o processo germinativo ante a escassez de recursos e o nível de tolerância à dessecação devem ser caracterizados para a distinção dos requisitos necessários a germinação na espécie.

INTRODUÇÃO

Sementes resistentes e resilientes à alterações climáticas podem ser referência na elucidação de mecanismos de proteção ao estresse térmico e hídrico. A caracterização das alterações morfofisiológicas desencadeadas em circunstâncias ambientais adversas fornecem informações

relevantes sobre a tolerância aos fatores abióticos e sobre os possíveis efeitos deletérios decorrentes de condições extremas.

O umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) é uma anacardiácea tolerante a períodos prolongados de seca (estiagem característica do semiárido brasileiro). A unidade de dispersão do umbuzeiro é o pirênio, que no caso da espécie possui lignificação do endocarpo e distribui a germinação ao longo do tempo (LOPES *et al.*, 2009). Essa característica compõe um sistema estratégico de dispersão e de tolerância a dessecação, comum às espécies endêmicas de regiões áridas e semiáridas.

O comportamento morfofisiológico do pirênio de umbuzeiro sob condições de estresse abiótico bem como os fatores que estimulam a produção e a degradação do ácido abscísico (ABA) na espécie necessitam ser descritos. O ABA inibe a germinação e desencadeia mecanismos de tolerância a dessecação (e de resposta ao estresse hídrico) (BASKIN; BASKIN, 2014). O endocarpo lenhoso do pirênio limita o acesso a água e ao oxigênio a semente e dificulta a protrusão embrionária, postergando a germinação do umbuzeiro (LOPES *et al.*, 2009). Esse atraso é mantido por níveis elevados de ABA na semente, favorecendo a inibição do desenvolvimento embrionário.

Para rompimento da barreira mecânica imposta pelo endocarpo à semente é preconizada a abrasão mecânica (corte em bisel na porção distal), a aplicação de giberelina (fitormônio promotor da germinação) e, ou o armazenamento dos pirênios por até 24 meses para propagação controlada da espécie (CAMPOS, 1986; ARAÚJO *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2009). Além de favorecer o desenvolvimento do embrião, o ganho de massa e o balanço hormonal entre promotores (giberelinas) e inibidores (ABA), a armazenabilidade garante o enfraquecimento dos tecidos que envolvem o embrião (MARCOS-FILHO, 2015). A caracterização das alterações fisiológicas inerentes a eficácia desses métodos deve ser relatada para distinção das condições necessárias a propagação sexuada em campos de cultivo.

Há uma ação integrada na série de eventos que permite a propagação vegetal e a sobrevivência em condições de estresse ambiental. Essa pesquisa buscou averiguar o comportamento morfofisiológico de pirênios de umbuzeiro recém dispersos e armazenados, submetidos a estresse térmico e hídrico.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram conduzidos utilizando pirênios extraídos por despolpagem mecânica de frutos de coloração verde-amarelado de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), receptados na região norte de Minas Gerais, Brasil, no ano de 2019, por cooperativa agroextrativista, situada a 16°44'06" de latitude sul e 43° 51' 43" de longitude oeste.

O material foi armazenado a temperatura ambiente por até 9 meses, sendo a morfofisiologia caracterizada por análise de curvas de embebição e de variáveis como a germinabilidade, emergência de plântulas, conteúdo de ácido abscísico (ABA) e de trifenílformazan (formazan), em pirênios submetidos a armazenabilidade e ao estresse hídrico e térmico.

Construção das curvas de embebição

Para averiguação do papel da água na ativação metabólica foram construídas curvas de embebição sob as temperaturas de 10, 20, 30 e 40°C e tempos de embebição de 8, 16, 24 e 48 horas. Nessa fase, os pirênios de umbuzeiro armazenados por 9 meses foram imersos diretamente em água. O teor de água das sementes foi mensurado utilizando fragmentos de tecido embrionário, submetidos ao método de estufa a 105°C por 24 horas (BRASIL, 2009). As curvas de embebição foram construídas utilizando os teores de água das sementes e relacionando-os com o tempo e a temperatura de embebição. A percentagem de embebição foi estimada por diferença de massa, obtida por pesagem em balança analítica, antes e após a imersão dos pirênios em água.

Estresse térmico

Os pirênios de umbuzeiro foram imersos diretamente em água, acondicionados em câmaras de germinação por 8, 16, 24 e 48 horas, programadas com temperaturas de 10, 20, 30 e 40°C e submetidos a testes de germinabilidade e de quantificação de trifênilformazan. Os testes de germinação foram conduzidos utilizando o sistema de rolos de papel umedecido (BRASIL, 2009) por até 30 dias e a quantificação do trifênilformazan foi realizada por espectrofotometria na região do visível, adaptando a metodologia proposta por Woodenberg *et al.*, 2018.

Teste de germinação

Os testes de germinação foram conduzidos em câmara de germinação programadas com luz constante e nas variadas temperaturas (10, 20, 30 e 40°C). Após a embebição direta em água por até 48 horas, os pirênios foram distribuídos em folhas umedecidas de papel para germinação que foram enroladas em formato de cilindro (sistema de rolo) e acondicionadas em sacos plásticos para incubação (BRASIL, 2009). Durante os ensaios foram contabilizados os pirênios com protrusão radicular e as plântulas com estruturas essenciais desenvolvidas (plântulas normais). Os valores obtidos foram expressos em porcentagem, indicando a germinabilidade do lote de pirênios.

Quantificação do trifênilformazan para determinação do nível de atividade metabólica

A quantificação do trifênilformazan (formazan), composto formado nos tecidos em resposta a atividade respiratória celular, após contato com o sal cloreto de 2,3,5 trifênil tetrazólio (EGIDO *et al.*, 2017), foi realizada utilizando tecido embrionário excisado após secção longitudinal do pirênio.

Os fragmentos de tecido (0,100g) foram imersos em 1 mL de solução de tetrazólio à 2% e incubados, na ausência de luz, em germinador programado com temperatura de 30°C por 16 horas. Posteriormente, o tecido embrionário foi retirado da solução de tetrazólio e transferido para tubos cônicos contendo etanol 95° para extração do formazan. Após 8 horas de incubação, à temperatura ambiente, os tubos com o extrato etanólico foram centrifugados por 60 segundos a 4000 rotações por minuto (RPM). O sobrenadante foi vertido em cubeta de quartzo para determinação da absorbância em

espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível (UV-Vis). As leituras foram realizadas na região do visível, a 500 nanômetros (nm), utilizando o etanol como branco. As metodologias de extração e leitura espectrofotométrica foram adaptadas da proposta de Woodenberg *et al.*, 2018.

Estresse hídrico

Para averiguação da tolerância ao estresse hídrico os pirênios foram submetidos a até três ciclos de hidratação. Os pirênios foram hidratados e reidratados após secagem por imersão direta em água por 8, 16, 24 e 48 horas. Cada tempo de embebição foi testado após 1, 2 e 3 ciclos de hidratação. A secagem, entre as embebições, foi realizada à temperatura ambiente, em estufa artesanal de caixa de isopor, sem iluminação e com entradas de ar, protegidas por tela. Após cada ciclo de hidratação, sub-amostras de pirênios foram submetidos a testes de determinação do potencial de emergência e de germinação (a temperatura de 30°C com luz constante), estimacão do Índice de Velocidade de Emergência (IVE) e da produção de matéria seca bem como a discriminação do nível de atividade metabólica por quantificação espectrofotométrica da absorvância gerada pelo trifenílformazan.

O efeito da disponibilidade hídrica também foi mensurado utilizando soluções osmóticas de diferentes potenciais hídricos (ψ_w) de -2 a -8 Mpa) preparadas com polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). As concentrações de PEG foram calculadas utilizando a equação de Michel e Kaufmann (1973), considerando a temperatura de 30°C como referência. Os pirênios foram imersos nas soluções por um período de até 48 horas, sendo posteriormente submetidos a testes de germinação, conduzidos a temperatura de 30°C com luz constante, conforme metodologia descrita anteriormente e a testes de quantificação do teor de ácido abscísico (ABA), conforme metodologia sugerida por Gonçalves *et al.*, 2020.

Teste de emergência de plântulas

O teste de emergência foi conduzido por até 30 dias em bandejas contendo vermiculita expandida umedecida, acondicionadas em germinador tipo *Mangelsdorf* à temperatura de 30°C. A partir dos dados foram calculadas as variáveis: porcentagem de emergência de plântulas, Índice de Velocidade de Emergência (IVE) e matéria fresca e seca de plântulas em gramas. O IVE foi estimado considerando o número de plântulas emergidas por dia, utilizando fórmula proposta por Maguire (1962). A produção de matéria seca foi estimada por pesagem das plântulas normais desenvolvidas no teste de emergência, submetidas a secagem em estufa de circulação forçada de ar, a temperatura de 65°C por 72 horas. Os valores de massa em gramas das plântulas normais antes da secagem, expressam a produção de matéria fresca.

Armazenabilidade

A viabilidade dos pirênios foi estimada após a dispersão e a cada três meses durante nove meses armazenamento, utilizando testes de emergência de plântulas. Os testes de emergência foram conduzidos a temperatura de 30°C e luz constante, com pirênios de umbuzeiro, tratados ou não com

agentes abrasivos e, ou giberelina. Para abrasão mecânica foi realizado um corte na região basal, com o auxílio de uma micro retífica. Os pirênios com e sem abração foram imersos em solução de giberelina a 750 partes por milhão (ppm) por 24 horas, após embebição em água por 48 horas.

A quantificação do ABA foi utilizada como marcador da dormência, sendo realizada em pirênios recém dispersos e armazenados, nos mesmos intervalos de tempo em foram realizados os testes de emergência e germinação. Para tal, fragmentos de tecido embrionário foram excisados dos pirênios recém dispersos e armazenados a cada três meses e acondicionados em envelopes de papel alumínio em ultra freezer a -80°C até o momento das análises, conduzidas conforme metodologia sugerida por Gonçalves *et al.*, 2020.

Quantificação do ABA

Para a extração, purificação e quantificação do ácido abscísico (ABA) foi realizada metodologia sugerida por Gonçalves *et al.*, 2020. Para análise, 0.100 g de fragmentos de tecido embrionário foram macerados em nitrogênio líquido e adicionados ao líquido extrator, uma solução de metanol, isopropanol e ácido acético na proporção de 20, 79 e 1 ml, respectivamente. O extratos obtidos foram submetidos à dissociação ultrassônica e à centrifugação, em baixa temperatura (-4°C). O sobrenadante gerado foi filtrado e injetado em sistema cromatográfico. A quantificação do ABA foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, com fluxo de 0,8 ml/minuto, temperatura da coluna 30°C e fase móvel metanol. Os valores foram expressos em mg/g.

Análise estatística

A morfofisiologia foi caracterizada por análise de curvas de embebição e de variáveis como a germinabilidade, emergência de plântulas, conteúdo de ácido abscísico (ABA) e de trifenílformazan (formazan), em pirênios submetidos a diferentes tempos de armazenabilidade e a variadas condições de estresse hídrico e térmico. Para tal, os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, em esquema fatorial, sendo estimadas estatísticas descritivas, regressões e análises de variáveis canônicas com o auxílio do software R *stúdio* (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Respostas morfofisiológicas dos pirênios a embebição sob diferentes temperaturas

Os pirênios e as sementes de umbuzeiro apresentaram inicialmente teor médio de água de 10,0% e 7,4%, respectivamente. A semente detem em média 70% da umidade total do pirênio. O percentual de umidade observado nas sementes sinaliza a presença de aspectos do comportamento ortodoxo (tolerância à dessecação). No nível de significância considerado para análise ($p \leq 0,05$), a temperatura e o tempo de embebição determinaram o volume de água absorvido pelas sementes (TABELA 1).

Tabela 1 – Valores médios dos teores de água absorvidos por sementes e pirênios (potencial de embebição) de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, em função da temperatura e do tempo de embebição

Temperatura (°C)	Tempos de embebição (h)								
	0	8	16	24	48	8	16	24	48
	Teores de água das sementes (%)*					Potencial de embebição dos pirênios (%)			
10	7,40	14,20	15,90	22,99	27,02	61,30	66,71	61,95	77,70
20		10,45	18,53	27,99	32,88	63,79	62,99	69,35	73,70
30		19,58	26,71	27,17	38,19	69,82	69,25	61,55	73,74
40		30,44	31,60	41,18	49,29	64,97	61,27	69,80	74,04

* Resultados com diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

A absorção de água pelos pirênios foi progressiva, exibindo fases de aumento e de estabilização, em resposta ao tempo e a temperatura de embebição. Houve alteração do padrão de embebição das sementes de umbuzeiro e, por conseguinte da germinação. O processo é físico, no entanto a temperatura afeta a estrutura e o metabolismo celular. Neste estudo não foi observada relação linear entre as variáveis temperatura e tempo de embebição, não havendo interação entre ambas na análise da resposta dos pirênios de umbuzeiro à absorção de água. O potencial de embebição dos pirênios não apresentou variação significativa tal qual a umidade das sementes.

Possivelmente, sob imersão direta em água, entre 8 e 48 horas, foi estabelecido um equilíbrio entre o endocarpo e o meio externo (solução osmótica), estabilizando o teor de água do pirênio. A embebição ocorre gradativamente, com a hidratação inicial dos tecidos mais próximos da superfície, sendo desuniforme e dependente da função e de características físico-químicas de cada tecido do pirênio (MARCOS-FILHO, 2015). Em pirênios, há dois mecanismos de absorção de água, um relativo ao endocarpo e outro a semente. Esses sistemas absorvem água com intensidade e velocidades distintas. Segundo BORGES *et al.* (2007), a semente do umbuzeiro apresenta alto teor de lipídios e sementes de oleaginosas absorvem água mais lentamente. Após a superação das barreiras impostas pelo endocarpo à absorção de água, é necessário romper àquelas relacionadas à semente que incluem além da composição química, a maturidade fisiológica dos tecidos a serem embebidos.

Durante a embebição dos pirênios, a semente manteve a absorção com o aporte do endocarpo, aumentando o teor de água gradativamente, em resposta ao aumento da temperatura e ao tempo de embebição (FIGURA 1 A e 1B).

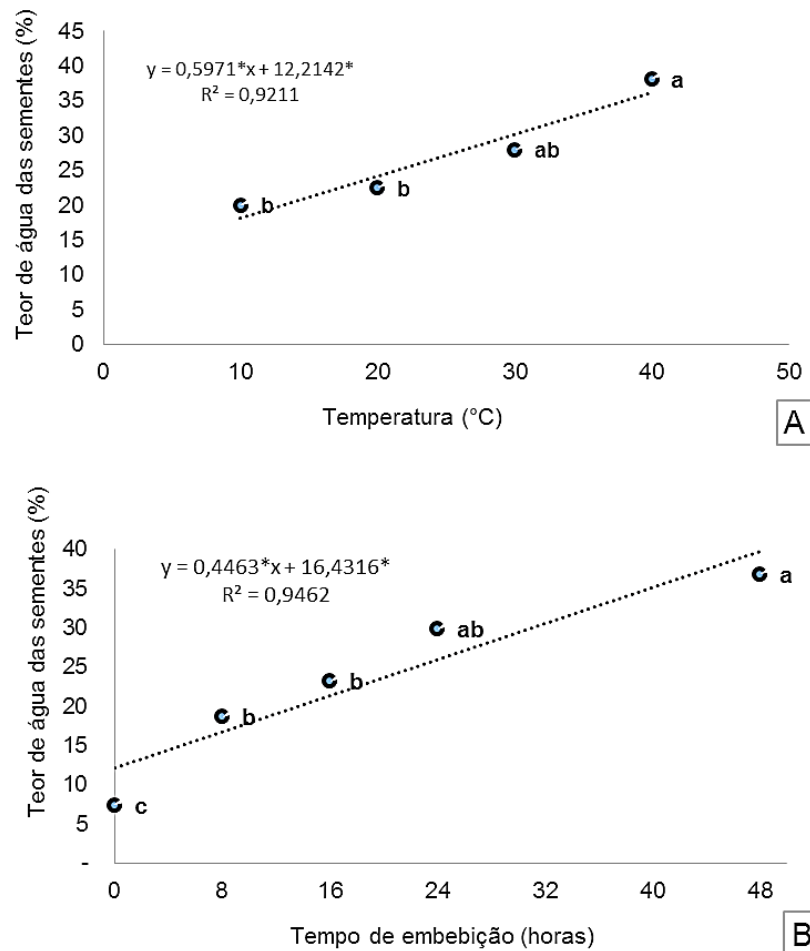


Figura 1-(A) – Representação gráfica da variação do teor de água absorvido por sementes de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, em resposta ao aumento da temperatura. (B) Representação gráfica da variação do teor de água absorvido por sementes de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, em resposta ao aumento dos tempos de embebição. Valores médios sem diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) foram representados por mesma letra minúscula. *Termos da equação significativos pelo teste de Tukey. ^{NS} Termos da equação não significativos pelo teste de Tukey

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

A absorção de água está diretamente relacionada a permeabilidade dos tecidos. O endocarpo do pirênio é lenhoso com perfurações para a entrada de água (FIGURA 2). Trata-se de um tecido morto formado por três camadas, denso-fibrosa nas porções externa e interna e pouco fibrosa na porção intermediária (CAMPOS, 1986 ; NEVES; CARVALHO, 2005). Esse arranjo tecidual forma uma cápsula que atua como barreira mecânica, auxiliando no controle osmótico da semente e favorecendo consequentemente o acesso gradativo a água ou a dessorção.

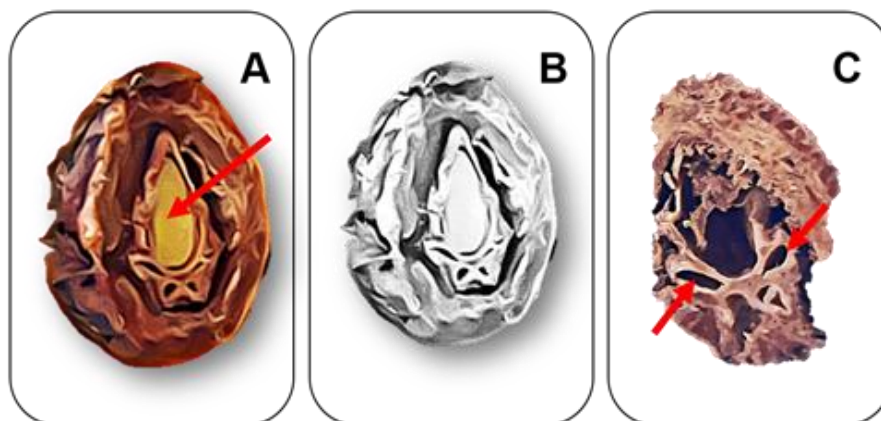


Figura 2 – Ilustração de corte longitudinal de pirênio de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, com manipulação de cores e contraste. A seta em (A) indica a semente; em (B) é possível visualizar em escala de cinza a estrutura morfológica do endocarpo formando câmaras para acomodação da semente; em (C) as setas indicam algumas das perfurações do endocarpo lenhoso que garantem o acesso da água a semente

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

O endocarpo espesso intermedeia o trânsito de água entre a semente e o substrato, sendo a embebição dependente da morfofisiologia da semente, da intensidade de lignificação dos tecidos que envolvem o embrião e da quantidade de água disponível para a hidratação. A estrutura morfológica do endocarpo embebido garante que a semente seja mantida umedecida por mais tempo. Assim, a morfologia do pirênio de umbuzeiro influencia o padrão de germinação desuniforme da espécie, corroborando com informações divulgadas por Campos (1986), Araújo *et al.* (2001), Neves e Carvalho (2005) e Lopes *et al.* (2009).

As sementes de umbuzeiro apresentaram padrão trifásico de embebição com curva sigmoide, como proposto por Bewley *et al.* (2013) (FIGURA 3-A). A absorção de água pelas sementes ocorre em três fases: a fase I é caracterizada pela hidratação, pelo reparo das membranas e da estrutura molecular das células e pelo início da atividade respiratória que desencadeia uma série de reações metabólicas; na fase II, há intensificação dos processos de recuperação da integridade celular com redução da velocidade de hidratação e diminuição da atividade respiratória; a fase III é marcada pelo crescimento e desenvolvimento embrionário (MARCOS-FILHO, 2015).

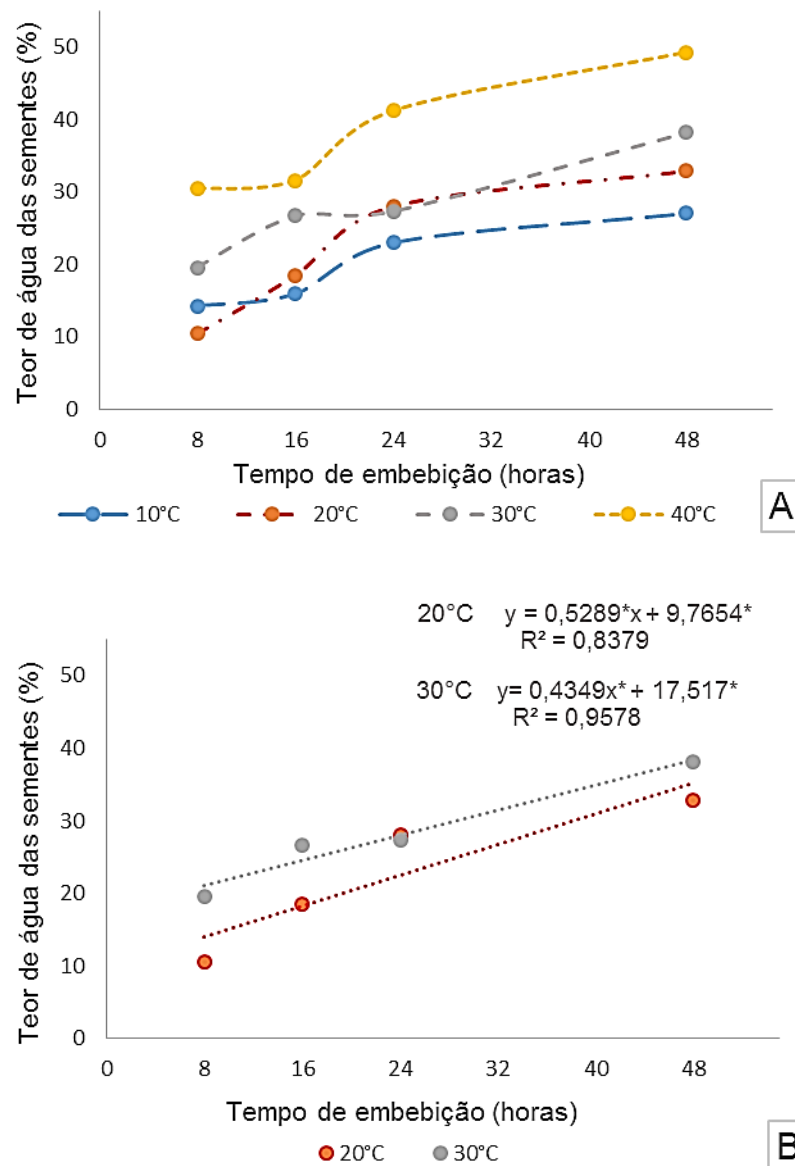


Figura 3- (A) – Representação gráfica da variação do teor de água absorvido por sementes de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, submetidos as temperaturas de 10, 20, 30 e 40°C por até 48 horas de embebição. (B) Representação gráfica das curvas de embebição de sementes de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, submetidos as temperaturas de 20 e 30°C. *Termos da equação significativos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ^{NS} Termos da equação não significativos pelo teste de Tukey

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

O comportamento ilustrado na Figura 3-A evidencia padrões de embebição, caracterizados principalmente por variações na duração das fases. Nas temperaturas mais baixas houve uma prorrogação da fase II de embebição. Nesta fase há síntese e degradação de compostos (BEWLEY *et al.*, 2013), sendo a ocorrência das reações dependentes de temperatura ótima. Em temperaturas reduzidas (como à temperatura de 10°C), o potencial de reativação metabólica é limitado, havendo

desaceleração. A elevação da temperatura promove um aumento gradativo da velocidade das reações, havendo um ponto ótimo para progressão do desenvolvimento embrionário e um ponto crítico para determinação da morte celular, variáveis entre as espécies. A temperatura de 40°C (FIGURA 3-A), por exemplo, ilustra uma condição de estresse térmico para o umbuzeiro, em que houve aceleração de reações, aumento da atividade respiratória e possivelmente desnaturação proteica, culminando com a morte das sementes.

Em consequência do estresse térmico, não houve germinação dos pirênios condicionados sob as temperaturas de 10 e 40°C. A temperatura de 10°C pode ser considerada mínima para os pirênios de umbuzeiro e a temperatura de 40°C, máxima. Temperaturas elevadas a esse ponto promovem desnaturação enzimática e deterioração em diversas espécies.

Houve variação significativa apenas nos modelos de regressão associados as temperaturas de 20 e 30°C (FIGURA 3-B). Quando submetidos a essas temperaturas, os pirênios apresentaram valores médios diferentes de potencial de protrusão radicular, germinação, produção de matéria fresca e seca e teor espectrofotométrico de trifenílformazan (nível de atividade respiratória).

A combinação das respostas morfofisiológicas, relacionadas às temperaturas de 20 e 30°C, gerou três variáveis canônicas para a expressão dos resultados por análise multivariada, representando 72,78% (VC1), 23,11% (VC2) e 4,10% (VC3) da variabilidade total dos dados (TABELA 2). As respostas morfofisiológicas germinação e produção de matéria seca preponderaram na formação da variável canônica 1, sendo os parâmetros mais representativos para determinação da viabilidade e do vigor das sementes de umbuzeiro nas condições consideradas para análise. O segundo novo componente resultou principalmente do potencial de protrusão radicular. As variáveis preponderantes apresentaram forte correlação positiva com as variáveis canônicas formadas (escore $\geq 0,7$) (TABELA 2).

Tabela 2 – Escores canônicos padronizados expondo a importância relativa das respostas morfofisiológicas dos pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, às temperaturas de 20 e 30°C com até 48 horas de embebição, na construção das variáveis canônicas (VC1), (VC2) e (VC3)

Parâmetros Morfofisiológicos	VC1	VC2	VC3
Potencial de protrusão radicular	0,4344	<u>0,7695</u>	0,0441
Germinação	<u>0,7257</u>	0,2314	0,1487
Matéria Fresca	0,4064	0,3656	0,5486
Matéria Seca	<u>0,7019</u>	0,6301	<u>0,7126</u>
Atividade metabólica (Formazan)	0,4123	0,6230	-0,2918

Variáveis canônicas com escores entre o intervalo de valores de 0,70 $\geq$ 1 são fortemente correlacionadas com os parâmetros morfofisiológicos considerados na análise.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Os valores dos escores canônicos VC1 na Tabela 3, indicam que os pirênios de umbuzeiro tiveram melhor desempenho quando submetidos à temperatura de 20°C. Nessa temperatura, foram observados os maiores percentuais de germinação, protrusão radicular e de produção de matéria seca, com escores positivos fortemente correlacionados as variáveis canônicas formadas (escores entre o intervalo de valores de 0,70 $\geq$ 1).

A embebição é um tipo especial de difusão, provocada pela atração entre moléculas de água e a superfície matricial, geridas pelo potencial hídrico dos tecidos da semente e do substrato fornecedor de água (MARCOS-FILHO, 2015). À temperatura de 20°C, com embebição suficiente de água, o equilíbrio osmótico será mantido. Em substrato úmido, a dessorção será nula ou reduzida, em função da velocidade do processo e em resposta a temperatura.

Tabela 3 – Respostas morfofisiológicas reais e previstas por análise multivariada de pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, às temperaturas de 20 e 30°C com até 48 horas de embebição. T(°C)- Temperatura; TE-Tempo de embebição; (VC)-Variável canônica; (PR)-Potencial de protrusão radicular em porcentagem; G-Germinação em porcentagem; MF-Matéria fresca em gramas; MS-Matéria seca em gramas e TZ-Absorbância do formazan em nanômetros (nível de atividade metabólica)

T (°C)	TE (h)	Scores		Parâmetros morfofisiológicos				
		VC1	VC2	PR	G	MF	MS	TZ
20	8	0,0384	-0,4462	72	72	6,588	0,732	0,10236
	16	<u>1,0000</u>	0,1333	74	74	5,662	0,834	0,42978
	24	0,3559	<u>1,0000</u>	90	72	6,678	0,836	0,54332
	48	<u>-1,0000</u>	0,0637	72	38	3,174	0,374	0,24524
30	8	<u>-0,9518</u>	<u>-0,8232</u>	58	56	5,960	0,478	0,09654
	16	-0,3668	<u>-1,0000</u>	48	48	3,190	0,296	0,32694
	24	-0,1432	-0,6297	62	62	5,092	0,518	0,25322
	48	-0,1414	<u>-0,7962</u>	70	66	4,066	0,336	0,23328

Variáveis canônicas com escores entre o intervalo de valores de $0,70 \geq 1$ são fortemente correlacionadas com os parâmetros morfofisiológicos considerados na análise. Valores de correlação negativos indicam relação inversamente proporcional com os parâmetros morfofisiológicos (de escores positivos), preponderantes na formação da variável canônica correspondente.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Conforme exposto na Tabela 3, os escores negativos entre o intervalo de valores de $0,70 \geq 1$ das variáveis canônicas formadas evidenciaram a redução da germinação, da produção de matéria seca e do potencial de protrusão radicular dos pirênios submetidos à temperatura de 30°C. Nessa temperatura, supostamente, os pirênios transitaram mais rapidamente pelas fases de embebição, concluindo a germinação em menor tempo. No entanto, o desenvolvimento de plântulas normais foi menor do que o observado à temperatura de 20°C.

As sementes de umbuzeiro apresentavam baixo teor de água (7,40%), favorecendo a rápida absorção de água pelos tecidos e consequentemente o aumento de injúrias no embrião. Conforme verificado na Figura 3 A e 3B, a diminuição da temperatura reduz a velocidade de embebição das sementes. Essa redução da velocidade de hidratação dos tecidos, proporcionada pela aplicação da temperatura de 20°C nos pirênios, limitou a ocorrência de danos irreparáveis ao embrião durante a embebição. À temperatura de 20°C houve redução da velocidade das reações e prorrogação do processo germinativo. Com disponibilidade hídrica suficiente, sendo atendidos os requisitos necessários a ativação metabólica haverá conclusão do processo germinativo.

Além disso, a condução de testes de germinação em câmaras de germinação (condições artificiais) é mais fácil em temperaturas reduzidas. Pirênios de umbuzeiro levam de 10 a 90 dias para concluir a germinação, em temperaturas mais baixas, como a temperatura de 20°C, a proliferação de

microrganismos é menor e a manutenção das condições iniciais do teste, tais como a integridade e a umidade do substrato são mais facilmente mantidas, contribuindo para a redução do número de sementes mortas ou com desenvolvimento embrionário anormal.

Ao considerar o nível de atividade respiratória, na temperatura de 20°C foram expressos os maiores valores de absorvância, relacionados a detecção do trifenílformazan, indicando que a desaceleração promovida pela temperatura não foi suficiente para reduzir o nível de atividade metabólica a valores inferiores aos observados na temperatura de 30°C. A relação entre o nível de atividade metabólica e a germinação pode ser constatada por análise da Figura 4 e da Tabela 2. Os valores de absorvância mensurados variaram em resposta aos tempos de embebição e temperaturas. A excisão do tecido para análise foi realizada após imersão direta em água. Tal fato justifica a semelhança entre os parâmetros nível de atividade metabólica e potencial de protrusão radicular. A emissão da raiz primária marca a fase III da embebição.

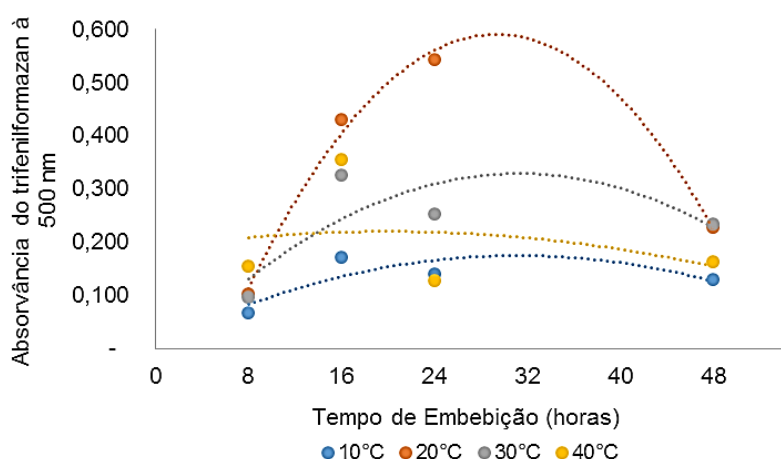


Figura 4 – Nível de atividade metabólica (respiratória) de tecido embrionário excisado de sementes *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, após embebição em água, sob diferentes temperaturas

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

A detecção de atividade respiratória em tecidos utilizando a quantificação espectrofotométrica do trifenílformazan em absorvância mostrou-se eficaz para a análise de viabilidade de sementes de umbuzeiro. A concentração de trifenílformazan nos tecidos expostos a solução de sal de tetrazólio foi influenciada pela temperatura, pela quantidade de água absorvida pela semente e pela duração das fases de embebição.

Respostas morfofisiológicas dos pirênios de umbuzeiro ao estresse hídrico

Os pirênios de umbuzeiro apresentaram alterações morfofisiológicas quando submetidos a ciclos de hidratação e desidratação. As respostas morfofisiológicas mais importantes para a construção da

variável canônica 1 (VC1) foram a germinação, a emergência e a absorvância gerada na detecção do formazan. Na formação da variável canônica 2 (VC2) destacou-se a emergência. Na formação de VC1, a absorvância gerada pelo formazan apresentou a mesma intensidade de resposta (força de correlação) que as variáveis, germinação e potencial de emergência. VC1 e VC2 representaram, respectivamente, 53,76 e 27,73% da variedade total dos dados. As variáveis preponderantes apresentaram correlação negativa com as variáveis canônicas formadas.

A análise simultânea das respostas morfofisiológicas germinação, emergência, IVE e absorvância do formazan (atividade respiratória) indicou a ocorrência de maior viabilidade e vigor dos pirênios durante a aplicação de até dois ciclos de hidratação descontínua de 24 e 48 horas (Tabela 4). Os pirênios submetidos ao segundo ciclo mantiveram o padrão de viabilidade após desidratação. Essa tolerância pode ser atribuída a habilidade de reter características fisiológicas após os ciclos. O primeiro aporte de água garante a semente potencial para reestruturação de estruturas celulares. Os ciclos de hidratação de 8 horas de embebição não afetaram a viabilidade e o vigor dos pirênios e os de 16 horas afetaram o vigor, expresso no potencial de emergência (VC2). Nos ciclos de hidratação de 24 e 48 h houve perda de vigor nos pirênios submetidos ao terceiro ciclo. A embebição dos pirênios por três ciclos de hidratação descontínuos de 48 horas foi a condição mais estressante.

Tabela 4 – Respostas morfofisiológicas reais e preditas por análise multivariada de pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, submetidos a ciclos de hidratação descontínuos a temperatura de 30°C. TE – Tempo de embebição; CH – Ciclo de hidratação; (VC) – Variável canônica; G – Germinação em porcentagem; E – Porcentagem de emergência; IVE – Índice de velocidade de emergência; TZ – Absorbância do formazan em nanômetros (nível de atividade metabólica) e MSE – Matéria seca de plântulas (emergência) em gramas

Tratamentos		Scores		Parâmetros morfofisiológicos				
TE	CH	VC1 (53,76%)	VC2 (27,73%)	G (%)	E (%)	IVE (Índice)	TZ (nm)	MSE (g)
8	1	-0,1159	-0,2649	76	50	0,918	0,24234	1,976
	2	-0,3104	0,3674	78	54	1,928	0,25154	2,374
	3	-0,4418	0,4259	78	48	1,264	0,45742	1,722
16	1	0,3463	<u>0,7754</u>	68	20	0,428	0,27772	2,688
	2	-0,6782	<u>1,0000</u>	68	58	2,600	0,57452	2,086
	3	-0,0040	0,0906	42	60	2,344	0,38770	1,900
24	1	<u>-0,7389</u>	-0,5435	78	66	0,986	0,55914	2,152
	2	-0,5459	<u>-1,0000</u>	66	72	1,088	0,50378	2,096
	3	-0,6475	<u>0,9746</u>	62	38	0,762	0,94428	2,304
48	1	<u>-1,0000</u>	<u>-0,7729</u>	76	76	1,130	0,69092	3,168
	2	-0,0724	<u>-0,8952</u>	46	68	1,516	0,39026	3,558
	3	<u>1,0000</u>	0,1224	26	22	0,434	0,28848	1,522

Variáveis canônicas com escores entre o intervalo de valores de $0,70 \geq 1$ são fortemente correlacionadas com as respostas morfofisiológicas: germinação, emergência e absorvância do formazan, preponderantes na formação das variáveis canônicas. Valores de correlação positivos indicam redução dos valores das respostas morfofisiológicas, com escores negativos, preponderantes na formação das variáveis canônicas.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Os pirênios de umbuzeiro necessitam de pré embebição direta em água para que haja aceleração do processo de ativação metabólica e consequente crescimento e desenvolvimento embrionário. O

arranjo estrutural formado pela semente e pelo endocarpo requer a imersão direta em água para que a absorção seja suficiente. O potencial hídrico do substrato de embebição é determinante para a velocidade e para o conteúdo de água absorvida. Esse teor de água nas sementes determina a fase do processo germinativo e o nível de atividade metabólica. Assim, a absorção máxima de água varia em função da maturação e da morfologia dos pirênios bem como do tempo de exposição a hidratação e a desidratação.

O endocarpo lignificado do pirênio de umbuzeiro pode atrasar tanto a embebição quanto a dessorção de água pela semente, favorecendo a resistência dos pirênios aos ciclos de hidratação descontínua. Os efeitos da desidratação dependem da fase de ocorrência (padrão trifásico de embebição), havendo desde a desaceleração até a interrupção da germinação ou a morte celular. Quanto maior o teor de água absorvido pela semente na fase de hidratação do ciclo, mais severa é a resposta dos pirênios a desidratação. A desidratação durante a fase II (padrão trifásico de embebição), por exemplo, não provoca danos irreparáveis ao embrião, sendo as sementes capazes de germinar quando reidratadas (MARCOS FILHO, 2015). Essa dinâmica permitiu que os pirênios submetidos a embebição por até dois ciclos, resistissem a fase de desidratação e de reidratação (TABELAS 4 e 5).

Tabela 5 – Teor de água em porcentagem de pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, submetidos a ciclos de hidratação descontínuos a temperatura de 30°C

Número de ciclos de Hidratação	Fase de embebição	Teor de água (%)			
		8h	16h	24 h	48h
1	Após o primeiro ciclo de hidratação (Sem sofrer desidratação)	22	26	31	37
2	Após o segundo ciclo de hidratação (Primeira reidratação após secagem de 60h)	34	47	53	52
3	Após o terceiro ciclo de hidratação (Segunda reidratação após segunda secagem de 60h)	49	46	42	38

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Após secagem, a primeira reidratação das sementes de umbuzeiro foi mais intensa que a hidratação, havendo maior absorção de água, considerando o mesmo tempo de embebição (TABELA 5). Em ecossistemas áridos e semi-áridos, as sementes estão sujeitas a ciclos de hidratação e desidratação, podendo desenvolver memória de hidratação, caracterizada pela preservação das modificações fisiológicas resultantes da hidratação prévia (LIMA; MEIADO, 2018). Essa memória permite a aceleração do processo de embebição em caso de reidratação, uma vez que nesses ambientes as sementes possuem acesso por tempo limitado a água.

Com a aplicação do terceiro ciclo de hidratação houve redução de massa das sementes quando submetidas a 16, 24 e 48 horas de embebição. No geral, eixos embrionários necessitam de pelo menos 50% de umidade para que haja desenvolvimento com protrusão radicular característica da fase III da germinação (McDONALD *et al.* 1994). Nessa fase, a redução do conteúdo hídrico gera danos irreversíveis ao embrião. A tolerância a desidratação decresce a medida que há progressão da embebição, sendo geralmente inibida ou perdida completamente a partir da protrusão da raiz primária

(MARCOS-FILHO, 2015). A secagem e a reidratação após a obtenção média de 50% de umidade afetaram a viabilidade e o vigor das sementes de umbuzeiro.

Sob estresse, os pirênios embebidos à temperatura 30°C em soluções com potenciais hídricos (ψ_w) de -2 a -6 MPa apresentaram alteração no conteúdo de ABA e inibição da germinação. Nos pirênios severamente desidratados (ψ_w = -8 MPa) não houve quantificação de ABA por cromatografia líquida de alta eficiência, provavelmente por falência do aparato metabólico (FIGURA 5). Em condições de estresse ambiental, a semente mantém doses elevadas do ABA, mesmo após a dispersão. O ABA é o principal regulador da tolerância ao estresse abiótico em plantas e coordena uma série de funções na regulação da maturação e dormência das sementes (YUAN *et al.*, 2021).

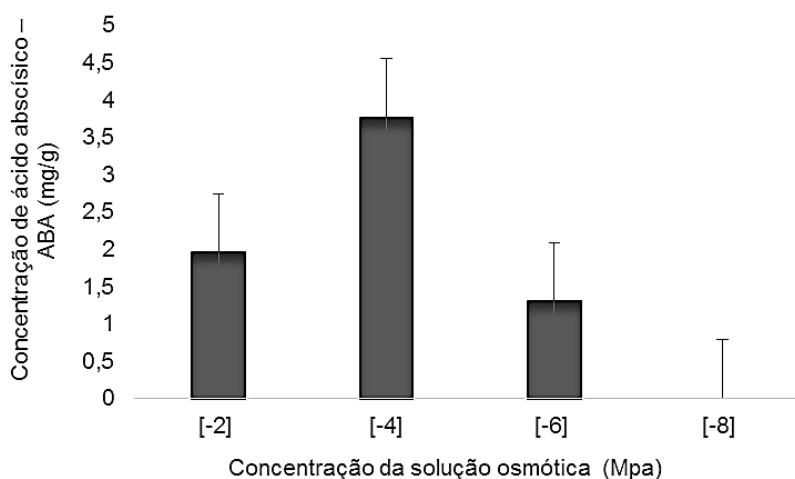


Figura 5 – Representação gráfica da concentração de ácido abscísico – ABA de tecidos embrionários excisados de sementes de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro após embebição em soluções de polietilenoglicol (PEG) 6000 de diferentes potenciais hídricos

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Respostas ao estresse hídrico são desencadeadas pelo ABA, tornando-o um excelente marcador para detecção de níveis de resiliência. A produção de ABA após a maturidade ou dispersão pode indicar que os pirênios de umbuzeiro apresentem dormência secundária. O estresse hídrico pode ter induzido a produção do ABA por ativação do sistema de síntese ou mesmo por inibição do sistema de degradação, o que justifica a detecção desse inibidor em pirênios submetidos a elevadas concentrações de polietilenoglicol 6000.

Na dormência secundária, condições ambientais desfavoráveis induzem sementes com maturidade fisiológica a perderem a capacidade de germinar. Alterações de potencial hídrico no ambiente associados a baixa disponibilidade hídrica podem desencadear a dormência secundária em sementes, sendo o processo de natureza fenotípica, controlado por padrão genético (BASKIN; BASKIN, 2014).

Respostas morfofisiológicas dos pirênios à armazenabilidade

O lote, safra 2019, utilizado nessa pesquisa apresentou germinabilidade após 9 meses de armazenamento. Antes desse período não houve germinação dos pirênios de umbuzeiro maior que 5% em nenhum dos ensaios. Nos pirênios recém-dispersos, foi detectado elevado teor de ácido abscísico (ABA), indicando que há dormência primária na espécie. A abrasão mecânica (corte na porção distal do pirênio) para liberação das perfurações que garantem o aporte de água a semente acelerou o processo de embebição, mas não favoreceu o crescimento embrionário, inibido pelo elevado teor de ABA presente nos tecidos.

A aplicação de giberelina na concentração de 750 partes por milhão (ppm) não contribuiu para a germinação dos pirênios recém-dispersos. Provavelmente, nessa fase ainda há necessidade de ajustes na quantidade de fitoregulador de crescimento a ser aplicada. O nível de maturação dos pirênios de umbuzeiro interfere no potencial de absorção de água, no metabolismo dos tecidos e consequentemente na ação de inibidores e promotores do crescimento e desenvolvimento celular. O teor de ABA dos pirênios variou em função do tempo de dispersão (armazenamento) e muito provavelmente a dose necessária de giberelina a ser aplicada também. Os pirênios de umbuzeiro voltaram a produzir ABA em resposta ao estresse hídrico, indicando que há variações de teor desse inibidor, relacionados ao tempo de maturação das sementes e as condições ambientais. Há um balanço hormonal entre promotores e inibidores da dormência e nessa pesquisa não conseguimos desencadear o processo germinativo com a aplicação de giberelina.

O teor de ácido abscísico (ABA) dos pirênios de umbuzeiro indicou que há uma redução gradativa desse hormônio ao longo do armazenamento (FIGURA 6). Na quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência não houve detecção do ABA, aos 9 meses, quando verificou-se germinabilidade. Existe uma ação integrada entre os fatores que determinam a manutenção da dormência. Há espécies que possuem mais de um fator impondo o repouso fisiológico. No geral, muitos desses fatores são superados com o tempo. A armazenabilidade dá tempo a maturação embrionária, enfraquece barreiras mecânicas, por deterioração tecidual e intervém no balanço hormonal entre promotores e inibidores da dormência (MARCOS-FILHO, 2015).

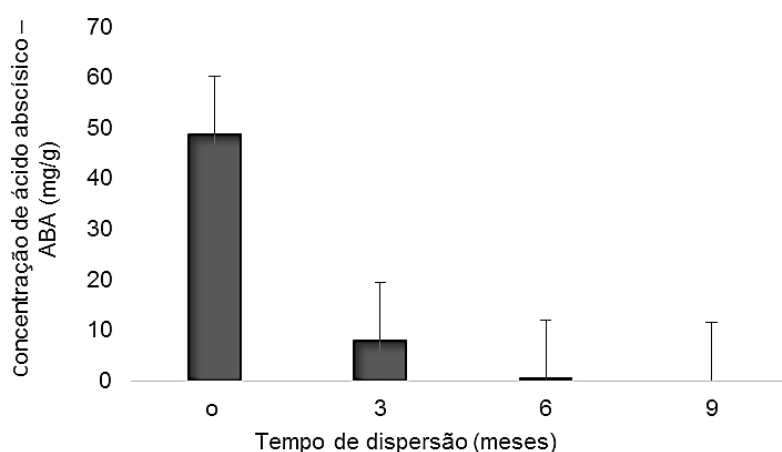


Figura 6 – Representação gráfica da concentração de ácido abscísico-ABA em tecidos embrionários excisados de sementes de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, após a dispersão (tempo de armazenamento)

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

A dormência relaciona-se com o teor de ABA detectados nos tecidos embrionários de pirênios recém dispersos e na maturidade, em resposta ao estresse hídrico. O ABA evita que a germinação ocorra antes do ponto máximo de maturidade fisiológica das sementes ou em condições ambientais desfavoráveis (BASKIN; BASKIN, 2014). Na fase de dormência das sementes, o ABA atua promovendo a síntese de proteínas inibidoras da germinação e bloqueia a síntese de enzimas envolvidas na mobilização de reservas (MARCOS-FILHO, 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Condições estressantes e a armazenabilidade interferem na morfofisiologia de pirênios de umbuzeiro.

A espécie possui certo nível de resiliência associada ao estresse hídrico e térmico.

O padrão de embebição dos pirênios e a germinabilidade respondem ao tempo de embebição e as variações de temperatura.

Os pirênios de umbuzeiro apresentam germinabilidade nas temperaturas de 20 e 30°C.

Os pirênios recém-dispersos não germinaram mesmo quando submetidos a abrasão mecânica ou ao tratamento hormonal.

A maior porcentagem de germinação das sementes de umbuzeiro foi observada após 9 meses de armazenamento dos pirênios e redução significativa do teor de ABA.

O nível de atividade metabólica mensurado pela detecção da presença do trifenílformazan por espectrofotometria fornece informações coerentes com os demais parâmetros morfofisiológicos.

A desidratação excessiva interfere no teor de ABA.

Os pirênios de umbuzeiro apresentam dormência primária e secundária.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal (PPGPV/UFMG); ao Laboratório de Análise de Sementes (LAS/UFMG); ao Laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias (CPCA/UFMG); e ao Laboratório de Química Instrumental e de Absorção Atômica/UFMG pelo apoio infra estrutural e financeiro.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F. P.; SANTOS, C. A. F.; CAVALCANTE, N. B.; REZENDE, G. M. Influência do período de armazenamento das sementes de umbuzeiro na sua germinação e no desenvolvimento de plântula. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 1, n.26, p. 36-39, 2001.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination**. San Diego: Academic Press, 2014.
- BEWLEY, J. D., BRADFORD, K. J., HILHORST, H. W. M., NONOGAK, H. (eds.). **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. New York: Springer, 2013.
- BORGES, S. V.; MAIA, M. C. A.; GOMES, R. C. M.; CAVALCANTI, N. B. Chemical composition of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam) seeds. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.49-52, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 398p.
- CAMPOS, C. de O. **Estudo da quebra de dormência da semente do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.)**. 1986. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1986.
- EGIDO, L. L. D.; NAVARRO-MIRÓ, D.; MARTINEZ-HEREDIA, V.; TOOROP, P. E.; LANNETTA, P. P. M. A Spectrophotometric Assay for Robust Viability Testing of Seed Batches Using 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride: Using *Hordeum vulgare* L. as a Model. **Frente. Plant Sci.**, 16 maio 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00747>.
- GONÇALVES, B. G.; RIBEIRO, L. M.; DIAS, D. S.; MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; MARTINS, C. D. P. S.; LOPES, P. S. N.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O. Embryo responses to extreme water events provide insights into the behavior of *Butia capitata* (Arecaceae) seed banks during hydration cycles. **Environ Exp Bot**, v. 169, p.103904, 2020.
- LIMA, A. T.; MEIADO, M. V. Effect of hydration and dehydration cycles on *Mimosa tenuiflora* seeds during germination and initial development. **South African Journal of Botany**, v. 116, n. 1, p. 164-167, 2018.
- LOPES, P. S. N.; MAGALHÃES, H. M.; GOMES, J. G.; BRANDÃO JÚNIOR, D. S.; ARAÚJO, V. D. Superação da dormência de sementes de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* arr.Câm.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 872-880, 2009.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop. Science**, v. 2, n. .2, p. 176-177, 1962.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 660p.

McDONALD, M. B. Jr.; SULLIVAN, J.; LAUER, M. J. The pathway of water uptake in maize seeds. **Seed Science & Technology**, v. 22, p.79-90, 1994.

MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiol**, v. 51, p. 914–916, 1973.

NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. G. **Tecnologia da produção do Umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.)**. Ano XI - Número 127. Lavras:UFLA, 2005.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <http://www.R-project.org/>, ISBN 3-900051-07-0.

WOODENBERG, W. R.; SERSHEN, VARGHESE, B.; PAMMENTER, N. Zygotic embryo cell wall responses to drying in three gymnosperm species differing in seed desiccation sensitivity. **Protoplasma**, v. 255, n. 5, p. 1461-1475, set. 2018. Doi: 10.1007 / s00709-018-1243-z.

YUAN, C.; HAN, J.; CHANG, H.; XIAO, W. Arabidopsis CK2 family gene CKB3 involved in abscisic acid signaling. **Braz. J. Biol. [online]**, v.81, n. 2, p. 318-325, 2021.

4.2 Artigo 2 – Método de quantificação de trifetilformazan por espectrofotometria na determinação de viabilidade de pirênios de umbuzeiro

Versão em português de proposta de artigo redigida sob as normas bibliográficas sugeridas pelo Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da UFMG.

Método de quantificação de trifenilformazan por espectrofotometria na determinação de viabilidade de pirênios de umbuzeiro

CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Quantificação de trifenilformazan em pirênios de umbuzeiro
Atividade metabólica, colorimetria, sementes, *Spondias tuberosa* Arruda, tetrazólio.

JOSIANE CORDEIRO DOS SANTOS^{1*}

<https://orcid.org/0000-0003-1988-4638>

DELACYR DA SILVA BRANDÃO JUNIOR¹

<https://orcid.org/0000-0001-8967-2847>

¹ Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, 39404-547, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

*Para correspondência (josysannnn@yahoo.com.br).

RESUMO

O estudo teve como objetivo a verificação da aplicabilidade do método de quantificação do trifenílformazan por espectrofotometria na região do visível na determinação de viabilidade de pirênios de umbuzeiro. Para tal, foram utilizados pirênios armazenados das safras 2019 e 2020. A aplicabilidade do método foi averiguada por análise das variações de absorvância do formazan, relacionadas ao tipo de lote (ano de coleta e tempo de armazenamento), ao tempo de embebição em água (24 ou 48h), às concentrações de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (0,1, 0,5, 1,0, 1,5 e 2%), ao tratamento com 750 ppm de giberelina e ao tempo de coloração (2, 4, 8, 12 e 16 horas). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, em esquema fatorial, sendo estimadas estatísticas descritivas, regressões e análises de variáveis canônicas, utilizando o software R *stúdio*. O teste de tetrazólio para a determinação da viabilidade de pirênios de umbuzeiro pôde ser conduzido utilizando amostras de tecido embrionário, excisadas de pirênios embebidos em água por 24 horas à temperatura ambiente, coradas em solução 0,5% de tetrazólio, por 16 horas na ausência de luz. O formazan pôde ser extraído em etanol 95° e quantificado por leitura da absorvância à 500nm em espectrofotômetro UV-Vis.

Palavras-chave: Atividade metabólica, colorimetria, sementes, *Spondias tuberosa* Arruda, tetrazólio.

INTRODUÇÃO

O 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio é um sal incolor utilizado como marcador da atividade respiratória celular. Íons hidrogênio, gerados na presença de enzimas desidrogenases, catalizadoras da respiração mitocondrial, reduzem o tetrazólio (incolor) a trifenílformazan, substância de cor vermelha, estável e não difusível (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2019). Essa reação evidencia a ocorrência de atividade metabólica no tecido, sendo referência para a determinação da viabilidade e do vigor de sementes pelo teste de tetrazólio.

A análise e a interpretação do teste de tetrazólio são direcionadas a observação dos padrões de coloração dos tecidos, obtidos em resposta a função e a diferentes níveis de atividade metabólica e de degeneração tecidual. A coloração avermelhada, carmim claro do tecido embrionário, por exemplo, indica vitalidade, já o vermelho intenso sugere deterioração, enquanto a manutenção da coloração original evidencia inativação, desnaturação enzimática ou morte celular (FRANÇA-NETO, 1999; FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2019). Tais variações de coloração, traduzem o desempenho fisiológico das sementes avaliadas, balizando a seleção de lotes para o armazenamento, comércio ou cultivo.

As sementes de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), anacardiácea nativa do semiárido brasileiro, são dispersas dormentes, protegidas por endocarpo de consistência denso - fibrosa resistente (SATURNINO *et al.*, 2019). O pirênio lignificado, unidade de dispersão da espécie, mesmo apresentando orifícios para a entrada de água e para o crescimento embrionário, necessita ser beneficiado (corte em bisel da porção distal) ou armazenado por até 24 meses para que haja germinação (CAMPOS, 1986; ARAÚJO *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2009).

A determinação da viabilidade utilizando o teste padrão de germinação no umbuzeiro é um processo exaustivo e demorado que superestima as informações geradas por ser realizado em condições ótimas, sendo inclusive dependente do tempo de dispersão dos pirênios e da maturidade fisiológica dos embriões utilizados nos ensaios. O aprimoramento de métodos alternativos de testagem da viabilidade de sementes tem sido extremamente importante para as espécies com germinação lenta e

desuniforme. O teste de tetrazólio, por exemplo, não é influenciado por fatores como a dormência (MARCOS-FILHO, 2015; FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2019), sendo subordinado essencialmente as circunstâncias de embebição e de exposição do tecido a solução de tetrazólio. As condições de hidratação antes da aplicação do teste de tetrazólio são fundamentais para a ativação metabólica do embrião e para a penetração do corante nas sementes (BORELLA *et al.*, 2020). A temperatura e o tempo de embebição na água e no corante interferem na sensibilidade do tecido ao teste de tetrazólio.

No umbuzeiro, a lignificação do endocarpo dificulta a excisão da semente inteira do pirênio, não havendo processamento de alto rendimento, necessário a condução do teste de tetrazólio. O corte longitudinal ou transversal do pirênio não possibilita a total exposição do tecido embrionário ao corante, impossibilitando a interpretação visual da ação do sal de tetrazólio sobre o embrião.

A utilização de técnicas colorimétricas pode limitar a subjetividade associada a interpretação visual do teste. O formazan produzido durante o teste de tetrazólio pode ser extraído em solvente orgânico e quantificado por espectrofotometria (NORTON, 1985; ZHAO *et al.*, 2010; EGIDO *et al.*, 2017; WOODENBERG *et al.*, 2018), servindo de referência para a mensuração dos níveis de atividade metabólica dos tecidos bem como das condições de pré condicionamento que favoreçam o desempenho fisiológico das sementes.

O estabelecimento de condições ótimas de embebição e de coloração é essencial a elaboração de protocolos de adequação do teste de tetrazólio para averiguação da qualidade de lotes de sementes. Assim, a proposta deste estudo foi verificar a aplicabilidade do método de quantificação de trifênilformazan por espectrofotometria na região do visível na determinação de viabilidade de pirênios de umbuzeiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para determinação da viabilidade foram realizados testes de tetrazólio, germinação e teor de água em pirênios de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), armazenados em sacos de rafia à temperatura ambiente, das safras 2019 e 2020, procedentes da região Norte do estado de Minas Gerais - Brasil.

A aplicabilidade do método de quantificação de formazan por espectrofotometria na região do visível foi averiguada por análise das variações de absorbância à 500 nanômetros (nm), relacionadas ao tipo de lote (safra, considerando o ano de coleta e o tempo de armazenamento), ao tempo de embebição, às concentrações do sal 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio e ao tratamento hormonal com solução de 750 partes por milhão (ppm) de giberelina.

O percentual de germinação e o teor de água dos pirênios foram utilizados como controle de qualidade da metodologia proposta para o teste de tetrazólio, sendo ambos comparados aos níveis de atividade metabólica do tecido (respiração celular).

Teste de tetrazólio

O teste de tetrazólio foi realizado utilizando cinco repetições de 0,100 g de tecido embrionário por tratamento. Amostras teciduais foram excisadas de pirênios das safras: 2019 (lote armazenado por 9 meses e lote armazenado por 24 meses) e 2020 (lote armazenado por 12 meses). Foram considerados

para análise pirênios tratados ou não com giberelina e mortos por autoclavagem de 15 minutos à temperatura de 121°C.

Os pirênios tratados ou não foram embebidos em água por 24 e 48 horas para ativação metabólica, sendo posteriormente seccionados para a excisão do tecido embrionário. O material foi embebido à temperatura ambiente. Os pirênios tratados com fitoregulador de crescimento, foram imersos em solução aquosa de 750 ppm de giberelina (*progibb 400*®) por 24 horas, após 48 horas de embebição em água.

Após hidratação, as amostras de tecido foram imersas, à temperatura ambiente, por 16 horas na ausência de luz, em soluções aquosas de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, preparadas nas concentrações, 0, 0,1, 0,5, 1, 1,5 e 2%.

Para a determinação do tempo ótimo de coloração, amostras embebidas nas soluções de 0,1 e 0,5% de tetrazólio foram mantidas na solução corante por 2, 4, 8, 12 e 16 horas. Nesse ensaio, as amostras de tecido foram branqueadas e esterilizadas em solução de peróxido de hidrogênio à 3% por 3 minutos, antes da imersão na solução de tetrazólio, para remoção de pigmentos e exclusão de contaminantes microbianos (PETERS, 2000).

Após a fase de coloração, o material foi lavado em água destilada e embebido em 2 mL de etanol 95° por 8 horas. O sobrenadante foi vertido em cubeta de quartzo, diluído em 2 mL de etanol 95° e lido na absorvância de 500 nm em espectrofotômetro na região do ultravioleta visível (UV-Vis), Cary 60 UV-Vis, *Agilent Technologies*®.

Os valores de absorvância obtidos foram utilizados para expressar a atividade respiratória dos tecidos, representando a quantidade de formazan formado (padrão colorimétrico) em resposta a aplicação dos tratamentos. Os valores negativos de absorvância foram considerados iguais a zero.

Teste de germinação

Para o teste de germinação, os pirênios das safras 2019 e 2020 foram previamente embebidos em água por 24 e 48 horas, sendo posteriormente distribuídos em folhas umedecidas de papel de filtro tipo *germitest*®. As folhas com os pirênios foram enroladas em formato cilíndrico (sistema de rolos) e acondicionadas em sacos plásticos em câmara de germinação programada com luz constante e temperatura de 30°C.

Foram utilizadas cinco repetições de 10 pirênios por tratamento. O número de plântulas normais desenvolvidas foi expresso em porcentagem de germinação (G%), após 21 dias de incubação.

Teor de água

O teor de água de fragmentos da semente, expresso em porcentagem, foi determinado com base no peso úmido pelo método de estufa à temperatura de $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas, conforme metodologia preconizada pela Regra de Análise de Sementes (BRASIL, 2009), utilizando cinco repetições de cinco sementes por tratamento.

Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento. A análise dos dados foi realizada em esquema fatorial, sendo estimadas estatísticas descritivas, regressões e análises de variáveis canônicas com o auxílio do software R stúdio (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019). Os resultados foram considerados significativos para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os lotes 2019 com 9 e 24 meses de armazenamento e o lote 2020, com 12 meses apresentaram inicialmente 7,4, 6,45 e 7,77% de umidade, respectivamente. Não foi observada variação considerável entre os teores de água dos lotes. Segundo Lopes *et al.* (2009), a umidade de pirênios de umbuzeiro é mantida constante após 60 dias de armazenamento. Os pirênios nos ensaios possuíam entre 9 e 24 meses de armazenamento, sendo a umidade inicial da semente estatisticamente semelhante entre os lotes.

Com a embebição em água, por até 48 horas, o maior teor de água das sementes foi registrado para o lote 2019, armazenado por 24 meses, diferindo dos lotes 2019, armazenado por 9 meses e 2020, armazenado por 12 meses (FIGURA 1).

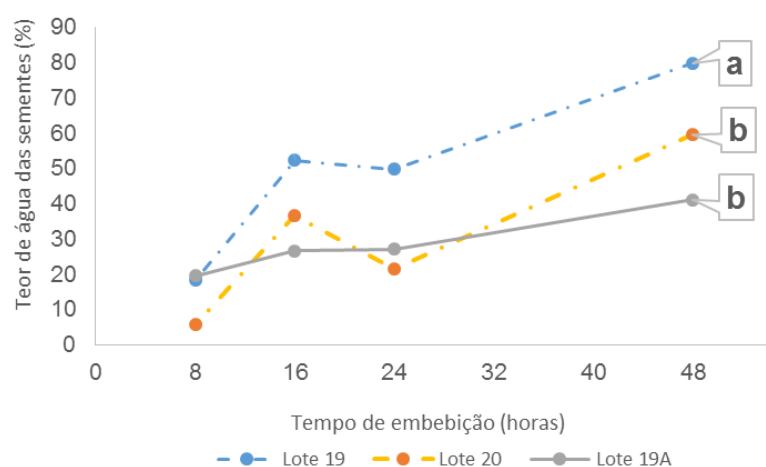


Figura 1 – Representação gráfica da variação do teor de água absorvido pelas sementes armazenadas de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, em resposta aos tempos de embebição de 8, 16, 24 e 48 horas. Valores médios sem diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) foram representados por mesma letra minúscula. Legenda: Lote 19, safra do ano 2019, com 24 meses de armazenamento, Lote 20, safra do ano 2020, com 12 meses de armazenamento e lote 19A, safra do ano 2019, com 9 meses de armazenamento.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Os padrões de absorção de água dos pirênios do lote 2019 divergiram estatisticamente, em resposta ao tempo de armazenamento. Os pirênios armazenados por 24 meses possuíam maior capacidade de absorção de água quando comparados aos pirênios com 9 meses de armazenamento. Os lotes 2019 e 2019 A são da mesma safra, diferindo pelo tempo de armazenamento.

O acesso à água da semente do umbuzeiro é intermediado pelo endocarpo. Na espécie, o endocarpo é formado por três camadas de tecido, com canais que dão acesso ao ambiente externo ao pirênio (CAMPOS, 1986, NEVES; CARVALHO, 2005; SATURNINO *et al.*, 2019). No pirênio recém disperso, a lignificação é mais intensa, sendo os canais obstruídos por tecido não lignificado. Com o armazenamento, há enfraquecimento gradativo das paredes celulares que formam os tecidos dos pirênios, havendo modificações estruturais e químicas que permitem a superação do bloqueio à entrada de água (MARCOS- FILHO, 2015). O lote 2019, armazenado por 24 meses ofereceu menor resistência à absorção de água pelo pirênio do que o lote o 2019, armazenado por 9 meses. O lote 2020, armazenado por 12 meses, apresentou padrão de absorção de água semelhante ao lote 2019, com 9 meses de armazenamento.

A absorvância do formazan à 500 nm, geradas em análise espectrofotométrica, diferiu estatisticamente entre as amostras. O lote 2019, armazenado por 9 meses, apresentou maior atividade respiratória que os demais (FIGURA 2).

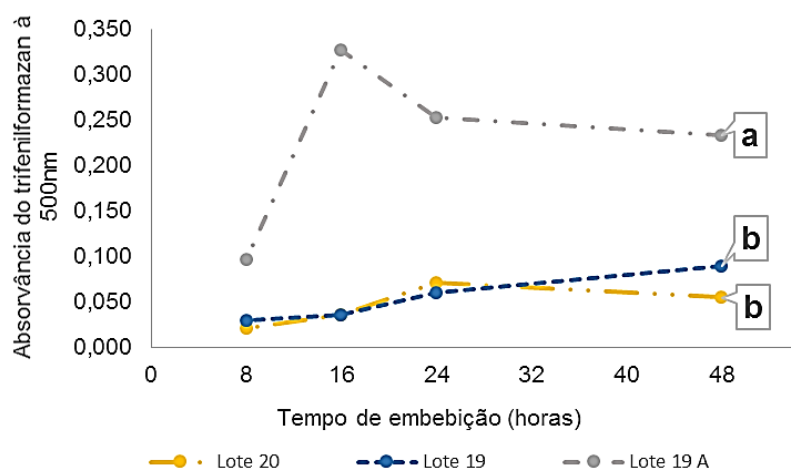


Figura 2 – Variação dos teores de trifênilformazan detectado por absorvância à 500 nm em espectrofotômetro UV-Vis em amostras de tecido embrionário excisadas de pirênios armazenados de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, após embebição em água por até 48 horas, coradas por 16 horas na ausência de luz, em solução de tetrazólio à 2%. Valores médios sem diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), foram representados por mesma letra minúscula para distinção ou não das curvas. Legenda: Lote 19, safra do ano 2019, com 24 meses de armazenamento, Lote 20, safra do ano 2020, com 12 meses de armazenamento e lote 19A, safra do ano 2019, com 9 meses de armazenamento

Com a reidratação há incremento e turgescência dos tecidos e intensificação da atividade respiratória, havendo ativação enzimática que desencadeia uma série de reações que propiciam o fornecimento de energia e nutrientes para o desenvolvimento embrionário (ATAÍDE; BORGES; LEITE FILHO, 2016). No entanto, após reidratação e consequente reativação metabólica, a continuidade e a intensidade do processo dependerão do nível de maturidade fisiológica do embrião ou de sua deterioração.

Com 9 meses de armazenamento, o lote 2019 apresentava em média 90% de germinação. Com 24 meses de armazenamento esse valor reduziu para pouco mais de 50%, aumentando a proporção de plântulas anormais. A elevação do índice de plântulas anormais é uma manifestação da deterioração do lote de sementes. O lote 2020, armazenado por 12 meses apresentou germinabilidade média de 22%, indicando tratar-se de um lote de baixa qualidade fisiológica, como pode ser evidenciado na Figura 3, analisando o nível de atividade respiratória dos pirênios, em resposta à embebição e ao tratamento hormonal. Os pirênios do lote 2020 tratados com giberelina não formaram plântulas normais. O ácido giberélico é capaz de beneficiar a germinação e o vigor das sementes, quando há estrutura biológica funcional para metabolizá-lo.

As amostras de tecido embrionário, excisadas de pirênios submetidos a autoclavagem de 15 minutos à temperatura de 121°C e de pirênios não embebidos previamente em água ou àqueles embebidos não imersos nas soluções de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio mantiveram a coloração original do tecido. A leitura espectrofotométrica à 500 nm das soluções alcoólicas dessas amostras apresentaram valores de absorvância negativos, indicando ausência do formazan ou concentração insensível ao método espectrofotométrico. Os pirênios mortos por autoclavagem e os pirênios não embebidos não apresentaram atividade respiratória. Os pirênios viáveis, ativados metabolicamente pela água, não submetidos ao teste do tetrazólio não formaram o formazan, mantendo a coloração original do tecido.

Não há diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias de absorvância geradas pela presença do formazan nos lotes 2019, com 24 meses de armazenamento e 2020, com 12 meses de armazenamento (FIGURA 2). Entretanto, há diferenças relacionadas as respostas do tecido embrionário desses lotes aos tempos de embebição, concentração de sal de tetrazólio e tratamento hormonal com giberelina (FIGURA 3).

Os valores de absorvância gerados em resposta às diferentes concentrações de tetrazólio ajustaram-se ao modelo de regressão cúbico, com exceção dos tecidos de pirênios armazenados do lote 2020, tratados com o regulador de crescimento giberelina. Conforme observado na Figura 3, a atividade respiratória dos tecidos do lote 2019 armazenado por 24 meses, variou apenas em resposta as concentrações das soluções de tetrazólio. Nos tecidos de pirênios do lote 2020, as variações foram em resposta ao tempo de embebição, tratamento hormonal e concentração de tetrazólio. O lote 2020 apresentou baixa viabilidade, tornando-se mais sensível a oscilações.

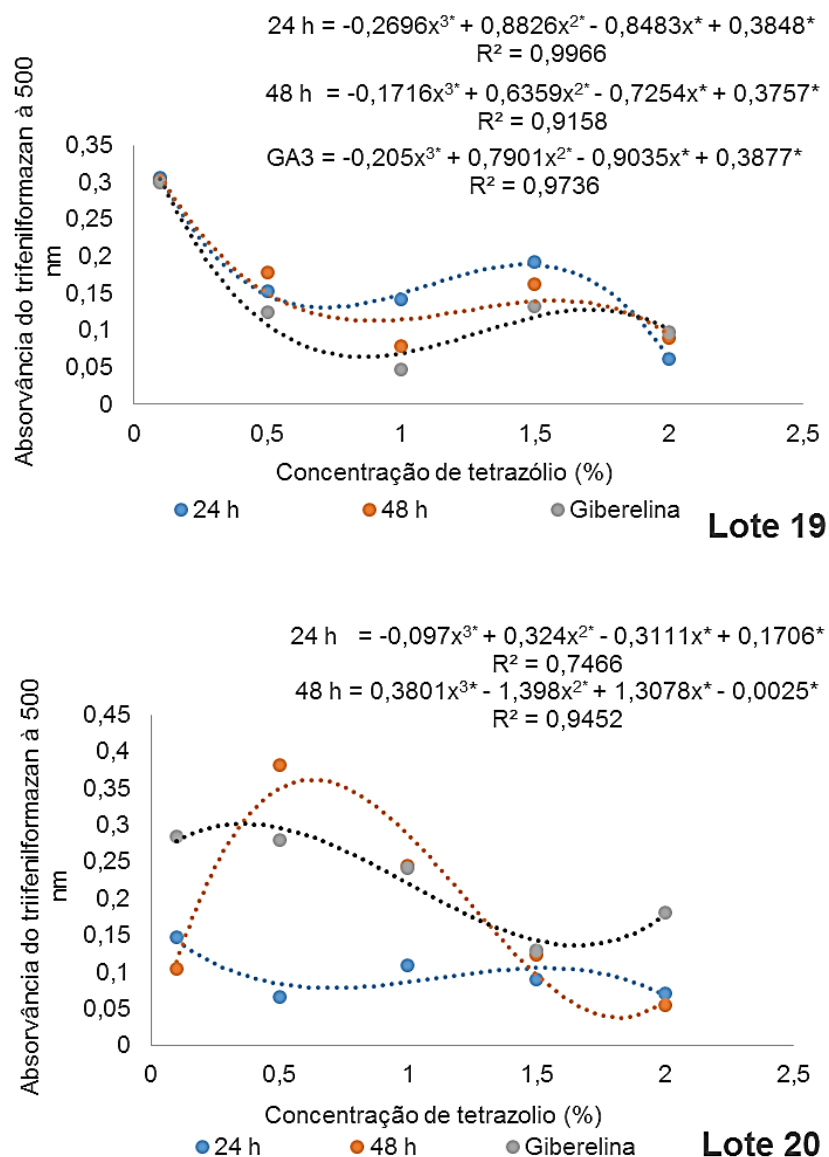


Figura 3 – Representação gráfica da variação dos teores de trifenilformazan detectado por absorvância à 500 nm em espectrofotômetro na região do ultravioleta visível (UV-Vis) em amostras de tecido embrionário excisadas de pirênios armazenados de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, em resposta à embebição por 24 e 48 horas e ao tratamento hormonal com giberelina (GA3), submetidas a diferentes concentrações de sal de tetrazólio (0,1, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%). Legenda: Lote 19, safra do ano 2019, com 24 meses de armazenamento; Lote 20, safra do ano 2020, com 12 meses de armazenamento

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Embriões de sementes com menor potencial fisiológico absorvem líquidos mais intensamente (VILLELA *et al.*, 2007). Essa relação justifica o nível de atividade respiratória observado nos tecidos de pirênios do lote 2020, embebidos por 48 horas e tratados com o GA3. Membranas deterioradas permitem a rápida difusão da solução de tetrazólio, intensificando a coloração do tecido da semente. Quando a embebição é mais lenta ou em menor proporção há atraso no processo de ativação enzimática (EGIDO

et al., 2017). Essa redução indica perda de viabilidade, corroborando com a diminuição da germinabilidade e da atividade respiratória dos pirênios do lote 2019, embebidos por 48 horas ou tratados com giberelina, com a progressão do armazenamento (NORTON, 1985).

Considerando o período de 16 horas de coloração, as concentrações mais altas prejudicaram a condução do teste do tetrazólio. Tais concentrações não permitiram a separação dos lotes por nível de atividade respiratória, por saturação do sistema. Considerando o valor comercial do sal de tetrazólio e as curvas dos gráficos da Figura 3, em pirênios de umbuzeiro embebidos por 24 e 48 horas em água, corados por 16 horas na ausência de luz, é indicado o preparo da solução de tetrazólio na concentração 0,5% para a separação de lotes de sementes de qualidades diferentes.

O lote 2019, com 24 meses de armazenamento possui maior vigor e viabilidade, quando comparado ao lote 2020. A redução do potencial fisiológico do lote 2019, armazenado por 24 meses com a aplicação do tratamento hormonal, indica declínio da viabilidade. O comportamento desse lote tratado com GA3 é semelhante ao do lote 2020, embebido por 24 horas.

Houve variação e interação significativa entre os lotes (safras e tempo de armazenamento) e os tratamentos de pré condicionamentos propostos para averiguação da adequação do teste de tetrazólio para pirênios lignificados. A combinação das respostas fisiológicas gerou duas variáveis canônicas para expressão dos resultados por análise multivariada, representando 66,22% (VC1) e 33,77% (VC2) da variabilidade total dos dados.

Tabela 1 – Respostas fisiológicas preditas por análise multivariada de pirênios de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, armazenados e submetidos à tratamentos de pré – condicionamento. L2019 - lote safra 2019, armazenado por 24 meses; L2020 - lote 2020, armazenado por 24 meses; 24h e 48 h – tempos de embebição em horas; GA3-tratamento hormonal com giberelina e VC – Variável canônica

Escore			Correlações (Importância relativa)		
			Resposta fisiológica	VC 1	VC 2
Fontes de variação	VC 1 (63,22%)	VC 2 (33,77%)	Protrusão radicular (%)	0,7482	0,7060
L2019:24h	10000	10000	Plântulas normais (%)	0,2544	0,7022
L2019:48h	0,5860	0,7846			
L2019:GA3	-0,0459	0,3233	Plântulas anormais (%)	0,7107	0,0221
L2020:24h	-10000	0,2342			
L2020:48h	0,0578	-10000	Absorvância do formazan (nm)	0,4950	-0,7392
L2020: GA3	0,7313	-0.4010			

Variáveis canônicas com escores acima de 0,70 e próximos de 1 são correlacionadas fortemente. Valores de correlação negativos indicam relação inversamente proporcional.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

As respostas fisiológicas porcentagem de protrusão radicular e porcentagem de plântulas anormais preponderaram na formação da variável canônica 1. O segundo novo componente resultou principalmente do potencial de protrusão radicular, dos percentuais de plântulas normais e anormais bem como da absorvância do formazan.

Conforme exposto na Tabela 1, o lote 2019, armazenado por 24 meses, embebido em água por 24 e 48 horas, apresentou maior viabilidade que o lote 2020, submetido à embebição e ao tratamento hormonal. O lote 2020, apresentou pirênios com protrusão radicular, no entanto foram geradas plântulas anormais, principalmente quando tratado com GA₃. Nesse estudo, os valores mais altos de absorvância do formazan foram correlacionados aos lotes com menor viabilidade e maior nível de deterioração. A absorvância do formazan do lote de maior viabilidade apresentou valores intermediários.

Na análise dos dados de determinação do tempo mínimo necessário de imersão do tecido embrionário na solução corante de tetrazólio, as variáveis concentração de sal de tetrazólio e tempo de coloração, bem como a interação entre o lote e o tempo de coloração apresentaram valores médios de absorvância de formazan significativamente diferentes, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Nos intervalos de tempo de coloração considerados nessa pesquisa, a solução de concentração 0,5% de sal de tetrazólio propiciou maior extração de formazan quando comparada a solução de concentração 0,1%. A solução à 0,5% de sal de tetrazólio gerou absorvância de formazan média de 0,0430 nm. A solução à 0,1% apresentou valor médio de 0,0341 nm.

Apenas nos tempos de coloração de 2 e de 16 horas foram observadas diferenças na atividade respiratória dos tecidos embrionários excisados de pirênios dos lotes 2019, armazenado por 24 meses e 2020 (FIGURA 4).

O tempo de coloração ótimo para a separação de lotes de pirênios de umbuzeiro de diferentes níveis de viabilidade foi de 16 horas. No intervalo de duas horas foi observada diferença entre os níveis de atividade respiratória do tecidos dos lotes avaliados, no entanto, lotes de baixa viabilidade, como o lote 2020 embebem, inicialmente mais rapidamente a solução corante. Há uma rápida difusão da solução de tetrazólio através das membranas celulares danificadas do tecido da semente (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2019).

O tempo de coloração em relação a vitalidade do tecido e os tipos de lotes, apresentou variação significativa, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A absorvância de formazan gerada em resposta aos diferentes tempos de imersão na solução de tetrazólio ajustou - se ao modelo de regressão quadrática para os lotes 2019, armazenado por 24 meses e para o 2020 (FIGURA 4).

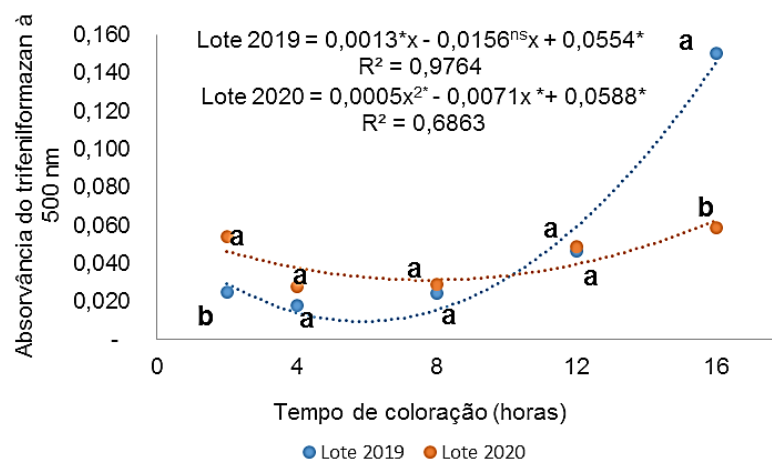


Figura 4 – Valores de absorvância do trifênilformazan em solução etanoica obtidos por leitura em espectrofotômetro UV-Vis à 500 nm de tecidos embrionários excisados de pirênios armazenados de *Spondias tuberosa* Arruda, umbuzeiro, embebidos em água por 24 horas e imersos em soluções de sal de tetrazólio sob diferentes tempos de coloração

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

A eficiência do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade das sementes depende do desenvolvimento de um método adequado para cada espécie, que envolve a definição das condições adequadas para o pré-condicionamento, preparo das sementes, coloração e avaliação (ARAÚJO *et al.*, 2019).

No caso dos pirênios de umbuzeiro é possível indicar o seguinte protocolo para análise de tecidos embrionários excisados pelo teste de tetrazólio com interpretação do resultado com técnica colorimétrica: O pré condicionamento com embebição dos pirênios em água por 24 horas, à temperatura ambiente; a coloração com imersão dos tecidos por 16 horas, na ausência de luz, em solução de sal de tetrazólio na concentração 0,5% e a extração alcóolica do formazan, utilizando etanol 95° com interpretação do nível de atividade respiratória do tecido por leitura espectrofotométrica à 500 nm.

CONCLUSÃO

O método de quantificação de trifênilformazan por espectrofotometria para interpretação do teste de tetrazólio é aplicável a determinação de viabilidade de pirênios de umbuzeiro.

O teste de tetrazólio para pirênios de umbuzeiro pode ser conduzido utilizando amostras de tecido embrionário, excisadas de pirênios embebidos em água à temperatura ambiente por 24 horas, coradas em solução de sal de tetrazólio, por 16 horas na concentração de 0,5%, com interpretação dos resultados realizada por espectroscopia com leitura à 500 nm do extrato etanólico produzido na extração do formazan.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); ao Programa de pós-graduação em Produção Vegetal (PPGPV/UFMG); ao Laboratório de Análise de Sementes (LAS/UFMG); e ao Laboratório de Química Instrumental e de Absorção Atômica da UFMG pelo apoio infraestrutural e financeiro.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Josiane Cordeiro dos Santos: Idealização, execução, avaliação, análise estatística e redação. Delacyr da Silva Brandão Junior: Idealização, orientação e redação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, F. P.; SANTOS, C. A. F.; CAVALCANTE, N. B.; REZENDE, G. M. Influência do período de armazenamento das sementes de umbuzeiro na sua germinação e no desenvolvimento de plântula. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, v. 1, n.26, p. 36-39, 2001.
- ARAÚJO, J. O., PINHEIRO, D. T., DIAS, D. C. F. S., HILST, P. C.; MEDEIROS, A. D. Adequacy of the tetrazolium test to evaluate the viability of *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, PR, v. 41, n.4, p.470-477, 2019.
- ATAÍDE, G. da M.; BORGES, E. de L.; LEITE FILHO, A. T. Alterações fisiológicas e biométricas em sementes de *Melanoxylon brauna* Schott durante a germinação em diferentes temperaturas. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 40, n. 1, p. 61-70, 2016.
- BORELLA, D. R., SILVA, A. C., SOUZA, J. H. G., MARTIN, C. C., PIZZATTO, M., SILVA, K. N. C. Viabilidade de sementes de castanha-do-Brasil pelo teste de tetrazólio. **Nativa**, Sinop, v. 8, n.3, p. 336-343, 2020.
- CAMPOS, C. DE O. **Estudo da quebra de dormência da semente do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.)** 1986. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1986.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 398p.
- EGIDO, L. L. D.; NAVARRO-MIRÓ, D.; MARTINEZ-HEREDIA, V.; TOOROP, P. E.; LANNETTA, P. P. M. A Spectrophotometric Assay for Robust Viability Testing of Seed Batches Using 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride: Using *Hordeum vulgare* L. as a Model. **Frontiers in Plant Science**, v. 16, 2017.
- FRANÇA NETO, J. B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: KRZYANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, v. 8, 1999. p. 8 -1 – 8 - 7.
- FRANÇA-NETO, J. B., KRZYANOWSKI, F. C. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. **Journal of Seed Science**, Londrina, PR, v. 41, n. 3, p. 359-366, 2019.

LOPES, P. S. N.; MAGALHÃES, H. M.; GOMES, J. G.; BRANDÃO JÚNIOR, D. S.; ARAÚJO, V. D. Superação da dormência de sementes de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* arr.Câm.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 31, n. 3, p. 872-880, 2009.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 660p.

NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. G. **Tecnologia da produção do Umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.)**. Lavras: UFLA, 2005. (ano 11, n. 127).

NORTON, C. R. Extraction of formazan from tetrazolium-treated *Pisum sativum* L. seeds after soaking treatments, **Scientia horticulturae**, v. 26, n. 2, p. 99-103, 1985.

PETERS, J. **Tetrazolium Testing Handbook**. Lincoln, NE: Association of Official Seed Analysts Inc., 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019.

SATURNINO, H. M., GONÇALVES, N. P., CASTRICINA, A., CARDOSO, M. M., SOUZA, I. Características botânicas do umbuzeiro e outras *Spondias*. In: GONÇALVES, N. P., SATURNINO, H. M., DONATO, S. L. R. (eds). Umbuzeiro a fruteira da Caatinga. Belo Horizonte. **Informe Agropecuário Epamig**, v. 40, n. 307, p. 7-21, 2019.

VILLELA, F. A.; MARCOS-FILHO, J.; NOVENBRE, A. D. L. C. Estado energético da água na germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, PR, v. 29, n. 1, p. 27-34, 2007.

ZHAO, P.; ZHU, Y.; WANG, W. Evaluation and improvement of spectrophotometric assays of TTC reduction: maize (*Zea mays*) embryo as an example. **Acta Physiol. Plant.**, v. 32, p. 815-881, 2010.

WOODENBERG, W. R.; SERSHEN, H.; VARGHESE, B.; PAMMENTER, N. Zygotic embryo cell wall responses to drying in three gymnosperm species differing in seed desiccation sensitivity. **Protoplasma**, v. 255, n. 5, p.1461-1475, 2018.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A semente recém dispersa de umbuzeiro apresenta elevada concentração de ABA, não germinando em condições ideais de teor de água, oxigenação e temperatura.

A germinação na espécie ocorre após 9 meses de armazenamento dos pirênios e redução significativa do ABA.

A temperatura de germinação para a espécie é de 20 e 30°C.

A desidratação excessiva interfere no teor de ABA.

Sementes com potencial de germinação, após estresse osmótico voltaram a apresentar ABA em seus tecidos, deixando de germinar.

O pirênio de umbuzeiro apresenta dormência primária e secundária.

O teste de tetrazólio para a determinação de viabilidade de pirênios de umbuzeiro pode ser conduzido utilizando amostras de tecido embrionário, excisadas de pirênios embebidos em água à temperatura ambiente por 24 horas, coradas em solução de sal de tetrazólio, por 16 horas, na ausência de luz, na concentração de 0,5%, com interpretação dos resultados realizada por espectroscopia com leitura a 500 nm do extrato etanólico produzido na extração do formazan.

O método de quantificação de formazan por espectrofotometria para interpretação do teste de tetrazólio é aplicável como metodologia de análise de qualidade para pirênios de umbuzeiro.