

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

Thais Silva Sales

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SEMENTES DE
COUVE**

Diamantina
2019

Thais Silva Sales

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SEMENTES DE
COUVE**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Produção Vegetal da Universidade
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como
requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcela Carlota Nery
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Regina da Costa

**Diamantina
2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S163q

Sales, Thaís Silva.

Qualidade fisiológica e atividade enzimática em sementes de couve / Thaís Silva Sales, 2020.

78 p. : il.

Orientadora: Marcela Carlota Nery

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. *Brassica oleracea* var. *acephala*. 2. Envelhecimento acelerado. 3. Enzimas. 4. Tetrazólio. 5. Vigor. I. Nery, Marcela Carlota. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 631.521

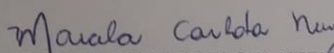
THAÍS SILVA SALES

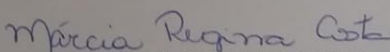
**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SEMENTES
DE COUVE**

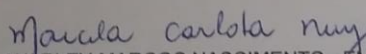
Tese apresentada ao DOUTORADO
EM PRODUÇÃO VEGETAL, nível de
DOUTORADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTORA EM PRODUÇÃO
VEGETAL

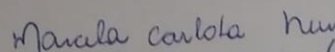
Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Marcela
Carlota Nery

Data da aprovação : 14/11/2019


Prof.Dr.^a MARCELA CARLOTA NERY - UFVJM


Prof.Dr.^a MÁRCIA REGINA DA COSTA - UFVJM


Dr. WARLEY MARCOS NASCIMENTO - EMBRAPA


Prof.Dr.^a RAQUEL MARIA DE OLIVEIRA PIRES - UFPA

DIAMANTINA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
DIAMANTINA – MINAS GERAIS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



ATESTADO DE DEFESA POR VIDEOCONFERÊNCIA

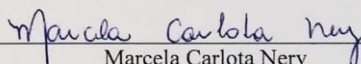
Atesto para os devidos fins que no dia 14 de novembro de 2019, às 08h, nas dependências da UFVJM – em Diamantina, foi realizada a defesa de tese da discente Thais Silva Sales com o trabalho intitulado **“Qualidade fisiológica e atividade enzimática de sementes de couve”**, no Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal.

Na qualidade de presidente da banca, atesto que o Dr. Warley Marcos Nascimento (EMBRAPA) e a Prof.^a Dr.^a Raquel Maria de Oliveira Pires (Universidade Federal de Lavras – UFLA), participaram através de videoconferência.

Em virtude da participação remota dos membros da banca acima indicados, eu, Marcela Carlota Nery enquanto servidor público, no gozo de fé pública, assino no lugar desses na Ata de Defesa de Tese.

Por ser verdade, dou fé e assino o presente atestado.

Diamantina, 14 de novembro de 2019.



Marcela Carlota Nery
Presidente da Banca

*Aos meus pais Teté e Silvana, ao meu irmão Thales e ao Thiago por torcerem sempre pela
minha vitória.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar meus passos e permitir conquistar um título tão batalhado e sonhado.

Aos meus pais, Sebastião César e Silvana, e ao meu irmão Thales, pelo amor, apoio e incentivo, nunca medindo esforços para meus estudos.

Ao Thiago, por todo incentivo, pelo amor, companheirismo e compreensão.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Professora Dra. Marcela Carlota Nery, pela orientação, pelos ensinamentos, apoio durante a realização do trabalho e imensas contribuições para minha formação profissional.

À Instituição (UFVJM) pela concessão da bolsa de estudos. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao programa ERASMUS pela concessão de bolsa para a realização do Doutorado Sanduíche.

À Universidad de Córdoba e aos professores Dr. Manuel Pineda Priego, Dr. Gregorio Galvez Valdivieso e Dr. Pedro Piedras Montilla por me receber para o Doutorado Sanduíche, pelo auxílio na condução dos experimentos, pela disponibilidade e, sobretudo, pelo convívio.

Aos membros do Núcleo de Estudos em Sementes (NES) pela recepção, aprendizado e experiência de trabalho em equipe. Sou grata por toda a amizade durante o curso. E aos alunos de iniciação científica e estagiários, pelo auxílio na execução dos trabalhos.

Ao técnico do laboratório, Fabiano Ramos, por todo o suporte nas atividades laboratoriais.

Às amigas que fiz em Diamantina, pelos momentos de alegria, companheirismo e descontração.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

SALES, T. S. **QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SEMENTES DE COUVE**. 2019. 78 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

A couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*, apresenta grande importância para pequenos agricultores devido a sua facilidade de propagação e valor econômico, conseqüentemente tem elevado consumo, aceitabilidade e volume de produção aumentado. Contudo, informações referentes à avaliação do potencial fisiológico das sementes de couve ainda são escassas. Dois experimentos foram realizados: o Experimento I teve como objetivo estudar a qualidade fisiológica e atividade enzimática de sementes de famílias de couve após o teste de envelhecimento acelerado tradicional e com solução saturada de NaCl. De acordo com os resultados foi possível avaliar o vigor de sementes de famílias de couve pelo teste de envelhecimento acelerado, pelo método tradicional por 72 horas a 41°C. As análises isoenzimáticas permitiram uma avaliação dos eventos bioquímicos ocorridos durante o envelhecimento acelerado das sementes de famílias de couve. O Experimento II teve como objetivo desenvolver procedimentos para a condução do teste de tetrazólio para verificar a viabilidade das sementes. O pré-condicionamento das sementes entre papel por 10 horas a 20°C, seguido pela remoção total do tegumento e a utilização de solução de tetrazólio na concentração de 0,2% por 4 horas a 30°C é eficiente na avaliação da viabilidade das sementes de couve.

Palavras chave: *Brassica oleracea* var. *acephala*; envelhecimento acelerado; enzimas; tetrazólio; vigor.

ABSTRACT

SALES, T. S. **PHYSIOLOGICAL QUALITY AND ENZYMATIC ACTIVITY IN KALE SEEDS**. 2019. 78 p. Thesis (Doctoral degree in Vegetable Production) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

The kale, *Brassica oleracea* var. *acephala*, is of great importance to small farmers due to its ease of propagation and economic value, consequently has high consumption, acceptability and increased production volume. However, information regarding the evaluation of the physiological potential of kale seeds is still scarce. Two experiments were carried out: the Experiment I aimed to study the physiological quality and enzymatic activity of kale seeds families after the traditional accelerated aging test and with saturated NaCl solution. According to the results it was possible to evaluate the seed vigor of kale families by the accelerated aging test, by the traditional method for 72 hours at 41°C. The isoenzymatic analyzes allowed an evaluation of the biochemical events that occurred during the accelerated aging of the seeds of kale families. The Experiment II aimed to develop procedures for conducting the tetrazolium test to verify seed viability. Preconditioning the seeds between paper for 10 hours at 20°C, followed by total removal of the integument and the use of tetrazolium solution at 0.2% concentration for 4 hours at 30°C is efficient in evaluating the viability of the kale seeds.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *acephala*; accelerated aging; enzymes; tetrazolium; vigour.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1** Dados climáticos correspondentes ao período de colheita. Diamantina – MG, 2016/2017 40
- Figura 2** Expressão da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em sementes de couve das famílias 1, 2, 3, 4, 5 e 6 submetidas ao teste de envelhecimento acelerado tradicional (EA) e com solução saturada de cloreto de sódio (EASS) por diferentes períodos (0, 48 e 96 horas) 49
- Figura 3** Expressão da enzima catalase (CAT) em sementes de couve das famílias 1, 2, 3, 4, 5 e 6, submetidas ao teste de envelhecimento acelerado tradicional (EA) e com solução saturada de cloreto de sódio (EASS) por diferentes períodos (0, 48 e 96 horas) 50
- Figura 4.** Expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes de couve das famílias 1, 2, 3, 4, 5 e 6, submetidas ao teste de envelhecimento acelerado tradicional (EA) e com solução saturada de cloreto de sódio (EASS) por diferentes períodos (0, 48 e 96 horas) 52

CAPÍTULO II

- Figura 1** Dados climáticos correspondentes ao período de colheita. Diamantina – MG, 2016/2017..... 64
- Figura 2** Visualização dos preparos das sementes de couve: (a) semente intacta; (b) remoção total do tegumento; (c) corte distal ao eixo embrionário; (d) corte longitudinal no maior sentido; (e) morfologia da semente 66
- Figura 3** Teste de tetrazólio em sementes de couve: Categoria A (viáveis) e Categoria B (inviáveis) 67
- Figura 4** Incremento de massa (g) de sementes de couve e sementes comerciais de couve manteiga da empresa Feltrin®, ao longo de 38 horas 69
- Figura 5** Coloração de sementes de couve após exposição à solução de tetrazólio em diferentes métodos de preparação: (a) semente intacta; (b) remoção total do tegumento; (c) corte na região distal ao eixo embrionário; (d) corte longitudinal no maior sentido 70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1** Grau de umidade - U (%); peso de mil sementes - PMS (g); plântulas normais na primeira contagem - PC (%); germinação - G (%); índice de velocidade de germinação - IVG; plântulas normais no estande inicial - EI (%); emergência - E (%); índice de velocidade de emergência - IVE e peso de massa seca - MS (mg/50 de plântulas) obtidos de sementes de couve 43
- Tabela 2** Grau de umidade (%) das sementes de couve submetidas aos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de envelhecimento acelerado pelo método tradicional (EA) e pelo método com solução saturada de NaCl (EASS) 44
- Tabela 3** Porcentagem de plântulas normais (%) obtidas no teste de germinação de sementes de couve submetidas aos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de envelhecimento acelerado tradicional (EA) e com solução saturada de NaCl (EASS) 47

CAPÍTULO II

- Tabela 1** Preparo das sementes de couve, submetidas ao pré-condicionamento (horas) e à procedimentos específicos antes da coloração a 20°C e concentração da solução de tetrazólio (%) e tempo (horas) de coloração a 30°C 66
- Tabela 2** Grau de umidade - U (%); peso de mil sementes - PMS (g); plântulas normais na primeira contagem - PC (%); germinação - G (%); índice de velocidade de germinação - IVG; plântulas normais no estande inicial - EI (%); emergência - E (%) e índice de velocidade de emergência - IVE obtidos de sementes de couve ... 68
- Tabela 3** Porcentagem de sementes viáveis de couve obtida pelo teste de tetrazólio em função das concentrações da solução de TZ (%) e do tempo de imersão em solução de TZ (horas) 72
- Tabela 4** Viabilidade de sementes de couve obtida pelo teste de tetrazólio em função das concentrações da solução de TZ (%) e do tempo de imersão em solução de TZ (horas).....73

SUMÁRIO

	Pág.
1	INTRODUÇÃO GERAL 17
2	REFERENCIAL TEÓRICO 18
2.1	A cultura da couve 18
2.2	Melhoramento genético da couve..... 20
2.3	Qualidade fisiológica das sementes 20
2.3.1	Teste de tetrazólio 21
2.3.2	Envelhecimento acelerado 23
2.3.3	Envelhecimento acelerado com solução saturada de sal..... 24
2.4	Atividade enzimática 25
	REFERÊNCIAS 27
	CAPÍTULO I 35
	RESUMO 36
	ABSTRACT 37
1	INTRODUÇÃO 38
2	MATERIAIS E MÉTODOS 39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
4	CONCLUSÃO 53
	REFERÊNCIAS 54
	CAPÍTULO II 59
	RESUMO 60
	ABSTRACT 61
1	INTRODUÇÃO 62
2	MATERIAIS E MÉTODOS 63
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO 68
4	CONCLUSÃO 74
	REFERÊNCIAS 75
	CONSIDERAÇÕES FINAIS 78

1 INTRODUÇÃO GERAL

Na agricultura brasileira, o cultivo de hortaliças destaca-se por garantir alimento para a população e ainda geração de empregos e renda (CARVALHO; KIST, 2016). Porém ainda há um grande desafio para quantificar a cadeia produtiva de hortaliças, uma vez que grande parte da produção no Brasil é realizada por pequenos e médios produtores. A agricultura familiar tem papel fundamental nessa cadeia e dados secundários desse segmento são restritos (CNA, 2017).

A cadeia produtiva das hortaliças tem conquistado avanços consideráveis. Em 2016, a área cultivada foi de aproximadamente 837 mil hectares e volume de produção em torno de 63 milhões de toneladas de hortaliças (CNA, 2016). As principais regiões produtoras concentram-se no Sul e Sudeste, onde 60% das plantações ficam próximas aos grandes centros consumidores, os chamados cinturões verdes. As propriedades são de exploração familiar com menos de 10 hectares, os quais são utilizados intensivamente (SILVA *et al.*, 2015).

O consumo de hortaliças no país tem aumentado devido a procura por uma alimentação mais saudável e nutritiva, estimulando o setor produtivo e aumentando a exigência quanto à qualidade dos produtos e processos empregados na condução dos campos de produção (COSTA *et al.*, 2008). Em especial, o grupo das brássicas, constituído pelo repolho, brócolis e couve, estão frequentemente na lista dos “alimentos mais saudáveis”, que incluídos na dieta humana podem afetar positivamente a saúde e o bem-estar (ŠAMEC *et al.*, 2018).

A couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*, quando comparada com outras hortaliças folhosas, destaca-se pelo seu maior conteúdo de proteínas, carboidratos, fibras, cálcio, ferro, iodo, vitamina A, niacina e vitamina C (TRANI *et al.*, 2015). É ainda uma cultura rica em carotenoides, que despertam grande interesse devido a estudos que comprovem sua relação à prevenção de determinados tipos de câncer e de doenças oftalmológicas crônicas como cataratas (LUCIA *et al.*, 2008; ŠAMEC *et al.*, 2018).

No Brasil, a cultura da couve apresenta importância em especial para os pequenos agricultores, sendo cultivada em todas as regiões do país. De acordo com o Censo Agropecuário 2017, a produção estimada foi de 343.127 toneladas, destacando-se a região sudeste com a maior produção. Só o estado do Rio de Janeiro representa 59% da produção nacional e Minas Gerais corresponde a quase 5% (IBGE, 2017).

Apesar disso, a produção de sementes desta cultura em território brasileiro é considerada inexpressiva. Tradicionalmente seu plantio é feito através da propagação vegetativa, com a formação de mudas a partir de brotos que surgem nas axilas das folhas

(PINTO *et al.*, 1983; TRANI *et al.*, 2015), o que reduz a dependência de sementes pelos agricultores (AZEVEDO *et al.*, 2017) e também devido a exigência de temperaturas baixas após a fase vegetativa, para a indução do florescimento (BOOIJ; STRUIK, 1990).

O aumento da demanda pelos produtores de sementes e pela indústria por cultivares mais eficientes e adaptadas a diferentes fatores limitantes da produtividade é cada vez maior (PESKE; CARRARO; SCHUSTER; 2012). Neste contexto, a seleção de cultivares de couve com potencial genético e sementes de elevada qualidade fisiológica em programa de melhoramento é importante para garantir a produtividade no campo. Para se obter sucesso em um programa de melhoramento, a avaliação do desempenho agrônômico de possíveis genitores é de fundamental importância, assim como estudos em diferentes locais que favoreçam a produção e desenvolvimento de sementes de diferentes genótipos.

Além disso, a avaliação da qualidade fisiológica de sementes é de fundamental importância e tem sido realizada preferencialmente por meio de testes de germinação e de vigor. Como ferramenta adicional aos testes mencionados, o controle de qualidade interno tem adotado cada vez mais técnicas moleculares, como por exemplo, proteômica para verificação e estudos da qualidade de sementes quando em condições de estresse.

Dessa forma, pesquisas relacionadas à qualidade fisiológica das sementes de couve ainda são limitadas, sendo necessário adequação e aperfeiçoamento dos testes de vigor e verificação das atividades enzimáticas quando submetidas às condições de estresse. Objetivou-se estudar a qualidade fisiológica de sementes de progênies de meios-irmãos de couve oriundas dos bancos de germoplasma da UFVJM.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da couve

A espécie *Brassica oleracea* surgiu ao longo da Costa do Mediterrâneo, de onde se espalhou por toda a Europa. Esta espécie é subdividida em várias variedades botânicas, dentre esta, destaca-se a *Brassica oleracea* var. *capitata* L. (repolho), *B. oleracea* var. *botrytis* L. (couve-flor), *B. oleracea* var. *italica* Plenck. (brócolos), *B. oleracea* var. *acephala* DC (couve-comum), *B. oleracea* var. *gemminifera* Zenker (couve-de-bruxelas) e *B. oleracea* var. *gongilodis* L. (couve-rábano), cuja importância é caracterizada pelas diferentes partes utilizadas na alimentação humana (GIORDANO, 1983; SOUZA, 1983).

A couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*, é uma hortaliça arbustiva anual ou bienal (CENTENO *et al.*, 2015), cujo consumo no Brasil tem aumentado devido, provavelmente, às novas maneiras de utilização na culinária e às recentes descobertas da ciência quanto às suas propriedades nutricêuticas (NOVO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011).

Se assemelha à sua ancestral, couve silvestre, com caule ereto, que suporta a planta e emite novas folhas. Como não forma “cabeça”, distribui as folhas em forma de roseta, ao redor do caule. A propagação é feita utilizando os brotos que são emitidos em grande número nas axilas foliares, gerando clones. As folhas apresentam limbo bem desenvolvido, arredondado, com pecíolo longo e nervuras bem destacadas, variando de verde-claras a folhas verde-escuras com nervuras roxas (FILGUEIRA, 2013).

Caracteriza-se por ser uma cultura típica de outono-inverno, se desenvolvendo melhor em temperaturas mais amenas (16°C a 22°C), mas apresenta certa tolerância ao calor, podendo ser plantada ao longo de todo ano e em grande parte do território nacional (FILGUEIRA, 2013). Apesar de permanecer produtiva por vários meses, é altamente exigente em água (HUSSAR *et al.*, 2004). Em temperaturas entre a 10°C à 5°C, a couve tende a florescer, paralisando a produção de folhas comerciais (NOVO *et al.*, 2010).

Nas Brassicáceas, as inflorescências (rácermos) originam frutos denominados síliquas, que amadurecem na mesma sequência de abertura das flores, de maneira que algumas síliquas sofrem deiscência antes que outras estejam completamente maduras, caracterizando uma maturação desuniforme. Assim, torna-se difícil a decisão quanto ao momento ideal para a colheita (GRAY *et al.*, 1985; MALUF; CORTE, 1990). O atraso da colheita deve ser evitado, pois pode ocorrer perda das sementes. Uma alternativa é a realização de colheitas parceladas, à medida que as síliquas vão atingindo o estágio ideal, determinado pela coloração da síliqua que passa de verde claro para marrom, estando as sementes no seu interior com a coloração marrom (FREITAS, 2007).

A couve é uma espécie alógama, incapaz de se autofecundar naturalmente por apresentar mecanismo de autoincompatibilidade esporofítica, favorecendo a fecundação cruzada (SCHIFINO-WITTMANN; DALL' AGNOL, 2002). A alogamia resulta em grande diversidade genética (ZHU *et al.*, 2016), favorecendo ao melhoramento genético, pois o mesmo é dependente da existência de variabilidade genética (NEGREIROS *et al.*, 2013).

2.2 Melhoramento genético da couve

O melhoramento de couve ainda é incipiente, pois a propagação vegetativa é fácil, proporciona maior uniformidade, alta porcentagem de sobrevivência e baixo custo econômico. Tudo isso justifica a maior adoção da propagação vegetativa pelos produtores de couve, que frequentemente utilizam baixo nível tecnológico, o que reduz a dependência de sementes (AZEVEDO *et al.*, 2017).

Os esforços do programa de melhoramento de couve estão voltados à seleção de genótipos com menor altura, menor número de brotações e maior número de folhas, para facilitar os tratos culturais e aumentar o rendimento por área (AZEVEDO *et al.*, 2012), além de resistência ao *Brevicoryne brassicae* e *Plutella xylostella* (AZEVEDO *et al.*, 2014), que são as principais pragas das brássicas (LOVATTO *et al.*, 2004; BOIÇA JÚNIOR *et al.*, 2010).

Em couve, a seleção recorrente, por meio da avaliação de progênies de meios-irmãos onde se conhece a planta “mãe”, mas não se conhece a planta doadora de pólen, é uma estratégia viável para condução da população segregante, em especial devido à maior facilidade de manejo e avaliação (BRITO, 2018). Essa técnica consiste em repetir os mesmos procedimentos ciclo após cada ciclo de seleção, tornando o processo de acumulação dos alelos favoráveis um processo contínuo, mantendo a variabilidade genética da população (BESPALHOK FILHO *et al.*, 2007). Para a geração seguinte (ciclos) há necessidade de sementes de boa qualidade para garantir as próximas gerações.

Vale ressaltar que as cultivares híbridas de *Brassica oleracea* var. *acephala*, multiplicadas por sementes, são pouco cultivadas no Brasil (NOVO *et al.*, 2015). Os híbridos de couve têm porte compacto com internódios curtos, não produzem brotações para formação de mudas, são precoces e mostram boa produtividade, devido, principalmente, à maior área foliar e peso em relação a diversas variedades propagadas por mudas. De maneira geral, os híbridos disponíveis no comércio para consumo *in natura*, têm aspecto que não agrada ao consumidor (TRANI *et al.*, 2015).

2.3 Qualidade fisiológica das sementes

Uma das maneiras de se avaliar a qualidade fisiológica das sementes é pelo teste de germinação, que conduzido sob condições ótimas de ambiente fornece o potencial de germinação do lote após a sua sementeira. O estudo da germinação na pesquisa agrônômica visa a conservação do poder germinativo das sementes e o esclarecimento de dúvidas sobre

as ações de diferentes fatores que interferem na germinação, que permita o uso correto das sementes e a solução de possíveis problemas (MARCOS-FILHO, 2015).

Entretanto, devido as discrepâncias entre a germinação obtida em laboratório e o comportamento das sementes após a semeadura ou durante o armazenamento, o teste de germinação apresenta baixa sensibilidade para detectar a evolução do processo de deterioração, acarretando, também, deficiências na identificação do potencial de armazenamento de lotes de sementes (AMARO *et al.*, 2015). A deterioração é um processo determinado por uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas, com início a partir da maturidade, em ritmo progressivo, determinando a queda do potencial de desempenho (germinação e vigor) e culminando com a morte da semente (MARCOS-FILHO, 2015). Dessa forma, os testes de vigor, diferentemente do teste de germinação, são capazes de detectar essas variações do processo de deterioração, possibilitando a obtenção de informações consistentes.

Segundo Marcos-Filho (1999a), as informações sobre o vigor são mais importantes para sementes de maior valor comercial, como as hortaliças. Estas, por apresentarem menor quantidade de reservas armazenadas, possuem maior propensão à deterioração após a maturidade fisiológica.

Os testes de vigor são desenvolvidos com o objetivo de identificar diferenças no potencial fisiológico dos lotes de sementes, principalmente daqueles que apresentam resultados semelhantes no teste de germinação e contribuem com as tomadas de decisão das empresas quando utilizados como parte do controle interno de qualidade. Sendo assim, espera-se que os testes de vigor permitam distinguir, com segurança, lotes de alto e de baixo vigor (MARCOS-FILHO, 2015). O nível de vigor das sementes pode afetar o potencial de armazenamento do lote e persistir no campo, influenciando o desenvolvimento da planta, a uniformidade da lavoura e o seu rendimento (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Dentre os testes de vigor disponíveis, destaca-se o teste de envelhecimento acelerado e o de tetrazólio, pela possibilidade de padronização, agilidade, reprodução facilidade e possibilidade de recomendação para identificar o potencial fisiológico de várias espécies cultivadas.

2.3.1 Teste de tetrazólio

Como opção para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes, o teste de tetrazólio é um dos testes que se destaca principalmente devido ao grande número de informações fornecidas pelo teste. Além de sua relativa rapidez, o teste também fornece

informações por meio dos índices de viabilidade e de vigor, além de propiciar o diagnóstico dos possíveis problemas de qualidade das sementes, como os danos mecânicos, danos causados por insetos e os de intempéries em pré-colheita e de deterioração durante a armazenagem (FRANÇA-NETO; KRYZANOWSKI, 2019).

É um teste bioquímico, que se baseia na atividade das enzimas desidrogenases, as quais catalisam as reações respiratórias no interior das mitocôndrias durante o ciclo de Krebs (FOGAÇA *et al.*, 2011). Durante a respiração, ocorre a liberação de íons hidrogênio, com os quais o sal 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio reage formando uma substância de cor vermelha e insolúvel, denominada de formazan, nos tecidos vivos da semente (BRASIL, 2009). Consequentemente, a intensidade e localização das partes coloridas e descoloridas são utilizadas para a interpretação do teste. As sementes viáveis tendem a absorver a solução de tetrazólio lentamente, desenvolvendo coloração mais suave do que sementes deterioradas, que adquirem coloração rosa forte. Nos tecidos mortos não há atividade dessas enzimas, logo, são caracterizados pela coloração branca ou amarelados e textura flácida (FRANÇA NETO, 1999).

Para a utilização do teste de tetrazólio na avaliação da viabilidade de sementes, é necessário o desenvolvimento de um método adequado para cada espécie, de modo a definir as condições apropriadas para a hidratação, o preparo, a coloração e a avaliação das mesmas (REZENDE *et al.*, 2015).

Em muitas espécies, o pré-condicionamento das sementes se faz necessário visando a ativação do sistema respiratório e a penetração da solução (DE AZEREDO, 2011). O processo de absorção de água pelas sementes evolui de acordo com um padrão trifásico na maioria das espécies e a duração de cada fase depende das relações hídricas semente/substrato. Na fase I, ocorre rápida hidratação dos tecidos, controlada essencialmente pelo potencial matricial da semente até que a matriz e o conteúdo celular estejam completamente hidratados. Em seguida, há um período de pouca embebição, que é o que caracteriza a fase II, quando membranas e organelas celulares tornam-se funcionais, iniciando a mobilização de reservas e a reativação do metabolismo. Na fase III, a semente recomeça a absorção de água e é possível visualizar o crescimento do embrião, ocorrendo a protrusão da radícula (BEWLEY; BLACK, 1994). Portanto, o estudo da curva de absorção de água pelas sementes caracteriza o pré-condicionamento e auxilia na padronização de testes para avaliação da qualidade fisiológica das sementes.

Além do pré-condicionamento, fatores como a concentração da solução ou mesmo o tempo de coloração na solução podem afetar a eficiência do teste na avaliação da qualidade das sementes. A coloração se desenvolve com velocidade variável entre as sementes de

diferentes espécies ou mesmo entre sementes da mesma amostra, mas o período de coloração se situa entre 60 e 240 minutos (MARCOS-FILHO, 2015).

Segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), é estabelecido que, para a execução do teste de tetrazólio em espécies da família Brassicaceae, deve-se embeber as sementes em água ou entre papel por 16-18 horas a 20°C, em seguida remover o tegumento da semente ou realizar uma incisão longitudinal através do tegumento e dos cotilédones. As sementes devem ser embebidas em solução de tetrazólio a 0,5% e 1% por 3 a 6 horas (remoção do tegumento) e por 6 a 18 horas (incisão longitudinal) a 30°C. Após a coloração, o embrião deve ser exposto.

Rezende *et al.* (2015) recomendam para sementes de crambe um período de embebição entre papel por 3 horas a 30°C. No entanto, para algumas espécies, os resultados de pesquisas tem demonstrado a utilização da embebição das sementes por maior tempo. Nery *et al.* (2015) defendem a utilização da embebição das sementes de nabo forrageiro entre papel por 6 horas e Flores *et al.* (2015), a embebição de sementes de canola entre papel por 16 horas a 20°C. Após a pré embebição, ambos os autores, sugerem o corte longitudinal para preparação das sementes para a coloração. A coloração em solução de tetrazólio a 0,5% durante 6 horas a 40°C é eficiente para avaliação da viabilidade das sementes de canola (FLORES *et al.*, 2015), 0,3% durante 12 horas a 30°C para sementes de nabo forrageiro (NERY *et al.*, 2015) e 0,075% durante 18 ou 24 horas a 30°C para sementes de crambe (REZENDE *et al.*, 2015).

2.3.2 Envelhecimento acelerado

Dentre os vários testes de vigor, o teste de envelhecimento acelerado é um dos mais sensíveis e eficientes para a avaliação do potencial fisiológico de diversas espécies (HAMPTON; TEKRONY, 1995). O procedimento mais recomendado atualmente para a condução deste teste, conforme a metodologia tradicional, foi desenvolvido por McDonald e Phannendranath (1978) e vem sendo aprimorado por diversos pesquisadores (MARCOS-FILHO, 2015).

Este teste tem como princípio, o aumento considerável na taxa de deterioração das sementes, pela sua exposição a níveis elevados de temperatura e umidade relativa do ar por curtos períodos, considerados os fatores ambientais preponderantes na intensidade e velocidade de deterioração; em seguida, são colocadas nas condições adequadas para germinar (AOSA, 1983; DELOUCHE, 2002). Assim, sementes de baixa qualidade deterioram-se mais

rapidamente do que as mais vigorosas, apresentando redução acentuada de sua viabilidade (ALVES; SÁ, 2012).

A manifestação inicial mais evidente do processo de envelhecimento é o declínio da velocidade de germinação, reflexo dos primeiros sinais de desestruturação das membranas, enquanto a ocorrência de anormalidades nas plântulas, verificada nos estádios finais de deterioração, é determinada pela morte de tecidos importantes, em diferentes regiões da semente (MATTEWS, 1985).

Durante a realização do teste de envelhecimento acelerado, as sementes absorvem água em ambiente relativamente quente e úmido, de modo que os resultados sofram influência de vários fatores, como genótipo, teor de água inicial e tamanho das sementes, temperatura e período de permanência das sementes no interior da câmara de envelhecimento (MARCOS-FILHO, 2015). Assim, para algumas espécies de sementes de brássicas, há diferentes indicações da temperatura/período de condicionamento adequados para a realização do teste: 42°C/24 horas para canola (ÁVILA *et al.*, 2005), 41°C/48 horas para rabanete (ÁVILA *et al.*, 2006), 41°C/72 horas para couve (KOMBA *et al.*, 2006), 41°C/48 horas para couve-flor (KIKUTI, MARCOS-FILHO, 2008), 42°C/48, 72 ou 96 horas para repolho e brócolis (COSTA *et al.*, 2008), 41°C/96 horas para nabo forrageiro (NERY; CARVALHO; GUIMARÃES, 2009), 41 °C/72 horas para crambe (AMARO *et al.*, 2014).

Porém, em espécies com sementes pequenas como as de diversas hortaliças, têm se verificado resultados pouco consistentes devido à variação acentuada do grau de umidade nas amostras avaliadas, após o período de envelhecimento (RAMOS *et al.*, 2004). Assim, para melhor resultado no teste devem-se utilizar técnicas que limitem a absorção de água pelas sementes. A utilização de solução saturada de NaCl permite a obtenção de umidades relativas inferiores às verificadas no envelhecimento acelerado convencional, sendo mais adequada para esse tipo de semente (JIANHUA; MCDONALD, 1996).

2.3.3 Envelhecimento acelerado com solução saturada de sal

A exposição das sementes às condições de temperatura e umidade relativa do ar durante o teste de envelhecimento acelerado pode promover diferenças acentuadas no comportamento das amostras avaliadas simultaneamente (MARCOS-FILHO, 2015).

Por esse motivo, têm sido estudadas alternativas para a condução do teste de envelhecimento acelerado, como por exemplo, a substituição da água destilada por soluções saturadas de sais KCl e NaCl que proporcionam 87% e 76% de umidade relativa,

respectivamente (JIANHUA; MCDONALD, 1996). O uso de soluções salinas proporciona menor velocidade de hidratação das sementes durante o envelhecimento acelerado e menor grau de umidade ao final do teste, com maior eficiência na avaliação do vigor (PANOBIANCO; MARCOS-FILHO, 2001; TORRES, 2005).

Uma vantagem adicional do uso da solução saturada de sal é a restrição hídrica da umidade relativa do ambiente, que não favorece a proliferação de microrganismos (NERY *et al.*, 2018). Cruz *et al.* (2013) e Nery *et al.* (2018), citam a incidência de fungos como um problema encontrado no envelhecimento acelerado em sementes de crambe e gergelim. Em brássicas o uso de solução salina no envelhecimento acelerado inibiu sensivelmente o crescimento e desenvolvimento de fungos (COSTA *et al.*, 2008).

O teste de envelhecimento acelerado com solução saturada de cloreto de sódio, a 45°C/72 horas foi sensível para detectar diferenças no potencial fisiológico de sementes de couve-flor (KIKUT; MARCOS-FILHO, 2008), 41°C/48 horas para sementes de rúcula (RAMOS *et al.* 2004) e 41°C/48 ou 72 horas para sementes de brócolos (MARTINS *et al.*, 2002).

2.4 Atividade enzimática

A possibilidade de utilização de marcadores isoenzimáticos como ferramenta na determinação de alterações bioquímicas decorrentes do processo deteriorativo das sementes já foi ressaltada por vários autores (SHATTERS JR. *et al.*, 1994; BRANDÃO JR. *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2004; 2005), pois permite identificar os pontos iniciais em que ocorrem os danos, bem como fornecer informações seguras sobre as reais causas de eventos deteriorativos e suas consequências (CAMARGO, 2003).

Um das consequências do processo deteriorativo é a formação de radicais livres, que são um grupo de átomos com elétrons não pareados, sendo portanto, bastante reativos e capazes de destruir grandes polímeros como os lipídios de membrana. Os principais agentes oxidantes gerados são hidroxilas (OH^\cdot), superóxidos (O_2^\cdot) e os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2). Uma vez presente na célula, estes podem iniciar reações oxidativas em cadeias, altamente prejudiciais, especialmente com ácidos graxos poliinsaturados, originando hidroperóxidos de lipídios (COOLBEAR, 1995; DESAI *et al.*, 1997).

Enzimas removedoras de radicais livres também desempenham papel importante na qualidade de sementes. A enzima superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima do grupo que atua na linha de defesa contra formas reativas de oxigênio, uma vez que esta enzima

anula a ação dos superóxidos O_2^- , catalisando reações de transferência de dois elétrons para a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (MCDONALD, 1999).

Outra enzima relacionada à remoção de radicais livres é a catalase (CAT), uma enzima intracelular, encontrada nos peroxissomas, com capacidade de transformar formas reativas de oxigênio em formas inofensivas, bem como a decomposição do peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água (H_2O) e molécula de oxigênio livre (O_2) (LEHNINGER, 2006). De acordo com Jeng; Sung, (1994), quando a semente é envelhecida ocorre maior peroxidação dos lipídios e redução na atividade das enzimas removedoras de peróxidos.

A enzima álcool desidrogenase (ADH) está relacionada à respiração anaeróbica, promovendo redução do acetaldeído a etanol (BUCHANAN et.al., 2005). O acetaldeído acelera a deterioração das sementes, portanto, com o aumento da atividade da enzima ADH as sementes ficam mais protegidas contra a ação deletéria deste composto, constituindo uma ferramenta de grande valor no diagnóstico da qualidade de sementes (ZHANG *et al.*, 1994).

O uso desses marcadores izoenzimáticos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes são como ferramentas complementares, jamais substituindo os tradicionais testes de germinação e vigor.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. Z.; SÁ, M. E. Avaliação do vigor de sementes de rúcula pelo teste de lixiviação de potássio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 108-116, 2010.

AMARO, H. T. R.; DAVID, A. M. S. D. S.; NETA, I. C. S.; ASSIS, M. D. O.; ARAÚJO, E. F.; ARAÚJO, R. F. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst), cultivar FMS Brilhante. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 202-208, 2014.

AMARO, H. T.; DAVID, A. M. S. D. S.; ASSIS, M. O.; RODRIGUE, B. R. A.; CANGUSSÚ, L. V. S.; OLIVEIRA, M. B. Testes de vigor para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 383-389, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. Seed vigour testing handbook. **East Lansing**, 1983. 93p. (To the Handbook on Seed Testing. Contribution, 32).

ÁVILA, M. R.; BRACINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; MARTORELLI, D. T.; ALBRECHT, L. P. Testes de laboratório em sementes de canola e a correlação com a emergência das plântulas em campo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 62-76, 2005.

ÁVILA, P. F. V. D. U. F.; VILLELA, F. A. U. F.; ÁVILA, M. S. V. D. U. F. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do potencial fisiológico de sementes de rabanete. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n.1, p.52-58,2006.

AZEVEDO, A. M.; ANDRADE JÚNIOR, V. C.; PEDROSA, C.E.; FERNANDES, J. S. C.; VALADARES, N. R.; FERREIRA, M. A. M.; MARTINS, R. A. V. Desempenho agrônomo e variabilidade genética em genótipos de couve. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1751-1758, 2012.

AZEVEDO, A. M.; ANDRADE JÚNIOR, V. C.; PEDROSA, C. E.; VALADARES, N. R.; FERNANDES, J. S. C.; FERREIRA, M. R. A.; MARTINS, R. A.V. Divergência genética e importância de caracteres em genótipos de couve. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p.51-57, 2014.

AZEVEDO, A. M.; ANDRADE JÚNIOR, V. C.; SANTOS, A. A.; SOUZA JÚNIOR, A. S.; OLIVEIRA, A. J. M.; FERREIRA, M. A. M. Population parameters and selection of kale genotypes using Bayesian inference in a multi-trait linear model. **Acta Scientiarum**, v. 39, n. 1, p. 25-31, 2017.

BESPALHOK FILHO, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Melhoria de plantas. Curitiba: UFPR, p.11-15, 2007.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2. ed. New York: Ed. Plenum Press, 1994.

BOIÇA JUNIOR, A. L.; CHAGAS FILHO, N. R.; SOUZA, J. R. Não-preferência para oviposição de traça-das-crucíferas em genótipos de couve-flor. **Revista Caatinga**, v. 23, p. 28- 33, 2010.

BOOIJ, R.; STRUIK, P.C. Effects of temperature on leaf and curd initiation in relation to juvenility of cauliflower. **Scientia Horticulturae**, v. 44, p. 201-214, 1990.

BRANDÃO J. R.; D. S.; CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 114-121, 1999.

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

BRITO, O. G. **Estudo genético e seleção de progênies de meios-irmãos de couve de folhas**. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 79 p., 2018.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Bioquímica e biologia molecular de plantas. **Sociedade Americana de Plantas fisiologistas: Rockville**, Maryland, 2005. 451p.

CAMARGO, R. **Armazenamento de sementes de milho doce**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2003. 81 p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5. ed. Jaboticabal, SP: FUNEP, 2012. 590 p.

CARVALHO, C.; KIST, B. B. Anuário brasileiro de hortaliças. **Editores Gazeta**, Santa Cruz do Sul, p. 56, 2016.

CENTENO, L. N.; CECCONELLO, S. T.; DE SÁ, J. S. Avaliação do Crescimento Vegetativo de mudas de couve manteiga em substratos orgânicos alternativos. **Revista Científica Rural**, v. 17, n. 1, p. 1-16, 2015.

CNA. Balanço 2016 Perspectivas 2017. **Brasília: CNA**, p.101-103, 2016. Disponível em: <<https://data.gessulli.com.br/file/2016/12/08/H104033-F00000-M637.pdf>>. Acesso em: 19 mai. 2019.

CNA. Mapeamento e qualificação da cadeia produtiva das hortaliças no Brasil. **Brasília: CNA**, p.79, 2017. Disponível em: < <http://www.favaneves.org/wp-content/uploads/2018/03/Livro-Cadeia-Produtiva-Hortalicas-Marcos-Fava-Neves-CNA-2017.pdf>>. Acesso em: 19 mai. 2019.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In AS Basra, ed, Seed Quality: Basic Mechanisms and Agricultural Implications. **Food Product Press**, New York, p.223-277, 1995.

COSTA, C. J.; TRZECIAK, M. B.; VILLELA, F. A. Potencial fisiológico de sementes de brássicas com ênfase no teste de envelhecimento acelerado. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 144-148, 2008.

COSTA, M. S.; LEITE, D. T.; QUEIROGA, V. P.; LOPES, K. P.; COSTA, C. C. Desenvolvimento de mudas de couve em diferentes substratos e idade. **Intesa**, v. 4, p. 01-06, 2011.

DE AZEREDO, G. A.; DE PAULA, R. C.; VALERI, S. V. Viabilidade de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. pelo teste de tetrazólio. **Journal of Seed Science**, v. 33, n. 1, 2012.

DELOUCHE, J. C. Germinação, deterioração e vigor da semente. **Revista Seed News**, v. 6, n. 6, p. 24-31, 2002.

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

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. rev. ampl. Viçosa: UFV, 2013. 421 p. il.

FLORES, M. F.; GRZYBOWSKI, C. R. S.; PAZOLINI, K.; POSSENTI, J. C.; PANOBIANCO, M. Criteria for implementation of a tetrazolium test in canola seeds. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 4, p. 222-227, 2015.

FOGAÇA, C. A. et al. Teste de tetrazólio em sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Schizolobium parahyba*. **Revista Floresta**, v. 41, n. 4, p. 895-904, jun. 2011.

FRANÇA NETO, J. B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 8, p.1-7.

FRANÇA-NETO, J. D. B.; KRZYŻANOWSKI, F. C. Tetrazólio: um teste de importância para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 3, p. 359-366, 2019.

FREITAS, R. A.; NASCIMENTO, W. M.; COIMBRA, K. G. Maturação e qualidade de sementes de repolho de verão sob condições tropicais. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 586-589, 2007.

GIORDANO, L. B. Melhoramento de Brássicas. **Informe Agropecuário**, v. 9, p.16-20, 1983.

GRAY, D.; HULBERT, S.; SENIOR, K. J. The effects of seed position, harvest date and drying conditions on seed yield and subsequent performance of cabbage. **Journal of Horticultural Science**, v. 60, p. 65-75, 1985.

HAMPTON J. G.; TEKRONY, D. M. **Handbook of vigour test methods**. Zurich: ISTA.117p. 1995.

HUSSAR, G. J.; PARADELA, A. L.; SERRA, W.; JONAS, T. C.; GOMES, J. P. R. Efeito do uso do efluente de reator anaeróbio compartimentado na fertirrigação da couve. **Revista Ecosystema**, v. 29, p. 65-72, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Produção Agrícola Municipal (PAM), Rio de Janeiro: 2017. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>

JENG, T. L.; SUNG, J. M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age penault seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, p. 531-539, 1994.

JIANHUA, Z.; MCDONALD, M. B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, v. 25, n. 1, p. 123-131, 1996.

KIKUTI, A. L. P.; MARCOS-FILHO, J. Physiological potential of cauliflower seeds. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 4, p. 374-380, 2008.

KOMBA, C. G.; BRUNTON, B. J.; HAMPTON, J. G. Accelerated ageing vigour testing of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC) seed. **Seed Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 205-208, 2006.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4th ed. São Paulo: [s. n.], 2006.

LOVATTO, P. B.; GOETZE, M.; THOMÉ, G. C. H. Efeito de extratos de plantas silvestres da progênie Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 971-978, 2004.

LUCIA, C. M. D.; MILAGRES, F. C.; CAMPOS, G. M. S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Controle de perdas de carotenóides em hortaliças preparadas em unidade de alimentação e nutrição hospitalar. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p.1627-1636, 2008.

MALUF, W. R.; CORTE, R. D. Produção de sementes de couve-flor. In: CASTELLANE, P. D.; NICOLOSI, W. M.; HASEGAWA, M. **Produção de sementes de hortaliças**. Jaboticabal: FCAV/FUNEP, p. 77-93, 1990.

MARCOS-FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, cap.1, p.1-21, 1999a.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina, 2.ed., 660p., 2015.

MARTINS, C. C.; SENEME, A. M.; CASTRO, M. M.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Comparação entre métodos para avaliação do vigor de lotes de sementes de couvo-brócolos (*Brassica oleracea* L. var. *italica* PLENK). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 2, p. 96-101, 2002.

MATTHEWS, S. Physiology of seed ageing. **Outlook on Agriculture**, v. 14, n. 2, p. 89-94, 1985.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci Technol. Seed Science and Technology*, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177– 237, 1999.

MCDONALD JR, M. B.; PHANNENDRANATH, B. R. A modified accelerated aging seed vigor test for soybeans. *Journal of Seed Technology*, v. 3, n.1, p.27-37, 1978.

NEGREIROS, J. R. S.; BERGO, C. L.; MIQUELONI, D. P.; LUNZ, A. M. P. Divergência genética entre progênes de pupunheira quanto a caracteres de palmito. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 48, p. 496-503, 2013.

NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M. Testes de vigor para avaliação da qualidade de sementes de nabo forrageiro. *Informativo Abrates*, Londrina, v. 19, n. 1, p. 9-20, 2009.

NERY, M. C.; NERY, F. C.; PIRES, R. M. O. Tetrazolium test to evaluated the viability of oil radish seeds. *Bioscience Journal*, v. 31, n. 3, p.663- 671, 2015.

NERY, M. C.; ROCHA, A. D. S.; PINHO, É. V. D. R. V.; SANTOS, H. O. D.; FIALHO, C. M. T.; NERY, F. C. Accelerated ageing test and behaviour investigation of isoenzymes in sesame seeds. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 40, p.1-9, 2018.

NOVO, M. D. C. S. S.; PRELA-PANTANO, A.; TRANI, P. E.; BLAT, S. Desenvolvimento e produção de genótipos de couve manteiga. *Revista Horticultura Brasileira*, v. 28, n. 3, p.321-325, 2010.

PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Envelhecimento acelerado e deterioração controlada em sementes de tomate. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 525- 531, 2001.

PESKE, S. T.; CARRARO, I. M.; SCHUSTER, I. O valor de uma cultivar superior. *Revista Internacional de Sementes – SEEDnews*, ed. XVI, v. 3, 2012.

PINTO, C. M. F.; DE PADUA, J. G.; CASALI, V. W. D.; CAMPOS, J. P. Produção de mudas, plantio e espaçamento de brássicas. *Informe Science Agropecuário*, v. 9, p. 26-29, 1983.

RAMOS, N. P.; FLOR, E. P. O.; MENDONÇA, E. A. F.; MINAMI, K. Envelhecimento acelerado em sementes de rúcula (*Eruca sativa* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 26, n. 1, p. 98-103, 2004.

REZENDE, R. G.; JESUS, L. L.; NERY, M. C.; ROCHA, A. S.; CRUZ, S. M.; ANDRADE, P. C. R. Teste de tetrazólio em sementes de crambe. **Semina**, v. 36, n. 4, p. 2539-2544, 2015.

ŠAMEC, D.; URLIĆ, B.; SALOPEK-SONDI, B. Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: review of the scientific evidence behind the statement. **Critical reviews in food science and nutrition**, p. 1-12, 2018.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.

SHATTERS, R. G.; ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S. H. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 33-41, 1994.

SILVA, W. F.; MARQUES, D. J.; SILVA, E. C.; BIANCHINI, H. C.; ISHIMOTO, F. A.; PEREIRA JÚNIOR, M. J. F. Diagnóstico da produção de hortaliças na região metropolitana de Belo Horizonte. **Horticultura Brasileira**, n.33, p.368-372. 2015.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, 2002.

SOUZA, R. J. Origem e Botânica de algumas brássicas. **Informe agropecuário**, v. 9, n. 98, p. 10-12, 1983.

TORRES, S. B. Envelhecimento acelerado em sementes de pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens* L.). **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 36, n. 1, p. 98-104, 2005.

TRANI, P. E. et al. Couve de folha: do plantio à pós-colheita. **Campinas: Instituto Agrônômico**, n. 214, p. 36, 2015.

ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FURIHATA, Y.; NAKAMURU, Y.; ESASHI, Y. Mechanism of seed deterioration in relation to the compounds involved by dry seeds themselves. **Seed Sci. Res.**, v. 4, n. 1, p. 49-56, 1994.

ZHU, P.; CHENG, M.; FENG, X.; XIONG, Y.; LIU, C.; KANG, Y. Mapping of Pi, a gene conferring pink leaf in ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC). **Euphytica**, v. 207, n. 2, p. 377-385, 2016.

CAPÍTULO I:**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SEMENTES DE
COUVE APÓS O ENVELHECIMENTO ACELERADO**

RESUMO

SALES, T. S. **QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SEMENTES DE COUVE APÓS O ENVELHECIMENTO ACELERADO**. 2019. 78 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

As hortaliças têm uma importância nacional crescente, dentre elas se destaca a couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*. Contudo, informações referentes à avaliação do potencial fisiológico dessas sementes ainda são escassas. Dessa forma, objetivou-se estudar a qualidade fisiológica de sementes de famílias de couve submetidas ao teste de envelhecimento acelerado tradicional e com solução saturada de NaCl e investigar a atividade enzimática nas sementes após o teste de vigor. Foram utilizadas seis famílias de sementes de couve identificadas pelos números: 1, 2, 3, 4, 5, 6. Para caracterização do perfil das famílias realizou-se a determinação do grau de umidade, peso de mil sementes, testes de primeira contagem de germinação, germinação, índice de velocidade de germinação, emergência, estande inicial, índice de velocidade de emergência e massa seca de parte aérea de plântulas. Para o teste de envelhecimento acelerado, as sementes foram submetidas ao método tradicional e com solução saturada de NaCl, pelos períodos de envelhecimento de 0; 24; 48; 72 e 96 horas. Foi também realizada a análise eletroforética das isoenzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e álcool desidrogenase (ADH). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado para todos os testes. Os dados do teste de envelhecimento acelerado foram analisados em esquema fatorial 6x5x2 (6 famílias, 5 períodos de envelhecimento e 2 métodos de envelhecimento). Concluiu-se que o teste de envelhecimento acelerado, utilizando método tradicional na combinação de 72 horas a 41°C é adequado para detectar o potencial fisiológico de sementes de famílias de couve. As análises isoenzimáticas permitem uma avaliação dos eventos bioquímicos ocorridos durante o envelhecimento acelerado das sementes de famílias de couve.

Palavras chave: *Brassica oleracea* var. *acephala*; enzimas; solução saturada de NaCl; teste de vigor.

ABSTRACT

SALES, T. S. **PHYSIOLOGICAL QUALITY AND ENZYMATIC ACTIVITY OF KALE SEEDS AFTER ACCELERATED AGING**. 2019. 78 p. Thesis (Doctoral degree in Vegetable Production) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

Vegetables have a growing national importance, among them the kale, *Brassica oleracea* var. *acephala*. However, information regarding the evaluation of the physiological potential of these seeds is still scarce. Thus, the objective was to study the physiological quality of seeds kale families submitted to the traditional accelerated aging test and saturated NaCl solution and to investigate the enzymatic activity in the seeds after the vigor test. Six families of kale seeds identified by the numbers 1, 2, 3, 4, 5, 6 were used. The moisture content, weight of one thousand seeds, first germination count, germination, germination speed index, emergence, initial stand, emergence velocity index and dry matter weight were determined to characterize the families. For the accelerated aging test, the seeds were submitted to the traditional method and saturated NaCl solution, for the aging periods of 0; 24; 48; 72 and 96 hours. Electrophoretic analysis of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes was also performed. A completely randomized design was used for all tests. The accelerated aging test data were analyzed in a 6x5x2 factorial design (6 families, 5 aging periods and 2 aging methods). It was concluded that the accelerated aging test, using a traditional method in the combination of 72 hours at 41°C, is adequate to detect the physiological potential of seeds of kale families. The isoenzymatic analyzes allow an evaluation of the biochemical events that occurred during the accelerated aging of the seeds of kale families.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *acephala*; enzymes; saturated NaCl solution; vigour test.

1 INTRODUÇÃO

A couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*, quando comparada com outras hortaliças folhosas, destaca-se pelo seu maior conteúdo de proteínas, carboidratos, fibras, cálcio, ferro, iodo, vitamina A e C e niacina (TRANI *et al.*, 2015).

No Brasil, a cultura da couve apresenta importância, em especial para pequenos agricultores, sendo cultivada em todas as regiões do país. De acordo com o Censo Agropecuário 2017, a produção estimada foi de 343.127 toneladas, destacando-se a região sudeste com a maior produção. Somente o estado do Rio de Janeiro representa 59% da produção nacional e Minas Gerais corresponde a quase 5% (IBGE,2017).

Apesar disso, a produção de sementes desta cultura em território brasileiro é considerada inexpressiva. Tradicionalmente seu plantio é feito através da propagação vegetativa, com a formação de mudas a partir de brotos que surgem nas axilas das folhas (PINTO *et al.*, 1983; TRANI *et al.*, 2015), o que reduz a dependência de sementes pelos agricultores (AZEVEDO *et al.*, 2017) e também devido a exigência de temperaturas baixas após a fase vegetativa, para a indução do florescimento (BOOIJ; STRUIK, 1990).

Um dos principais interesses e desafios para os produtores de sementes é a produção de sementes com qualidade, uma vez que, a uniformidade das plântulas e o seu rápido estabelecimento no campo são umas das condições essenciais para se obter um bom estande com alta produtividade e qualidade do produto colhido, o que ressalta a importância do vigor de sementes e a necessidade de avaliá-lo (LOPES, *et al.*, 2014; MARCOS-FILHO, 2015).

A avaliação da qualidade fisiológica de sementes tem sido realizada preferencialmente por meio de testes de germinação e de vigor. Segundo Abdo *et al.* (2005), as informações sobre o vigor são mais importantes para sementes de maior valor comercial, como as hortaliças; estas, por apresentarem menores quantidades de reservas armazenadas, possuem maior suscetibilidade à deterioração (RAMOS *et al.*, 2004), ocasionando a queda do potencial de desempenho e culminando com a morte da semente (MARCOS-FILHO, 2015).

Os testes de vigor, diferentemente da germinação, são capazes de detectar essas variações do processo de deterioração. Um dos testes mais utilizados é o envelhecimento acelerado (HAMPTON e TEKRONY, 1995; PANOBIANCO e MARCOS-FILHO 2001), que se baseia no aumento da deterioração das sementes, quando expostas a condições adversas de alta temperatura e umidade relativa. Sob essas condições, sementes de baixa qualidade deterioram-se mais rapidamente do que sementes mais vigorosas, estabelecendo diferenças no

potencial fisiológico das amostras avaliadas (TORRES; NEGREIROS, 2008; BARBOSA *et al.*, 2011).

Métodos alternativos para o teste de envelhecimento acelerado tem sido estudado. A substituição da água destilada por solução saturada de NaCl proporciona 76% de umidade relativa (JIANHUA & MCDONALD, 1996), o que leva a uma absorção mais lenta pelas sementes, mantendo a sensibilidade do teste. O teste apresenta o mesmo princípio do método tradicional.

Vários estudos envolvendo técnicas de análise eletroforética de isoenzimas têm sido realizados visando compreender melhor o que ocorre durante o processo de deterioração das sementes (CRUZ *et al.* 2013). Estas análises têm se destacado por auxiliar no processo de identificação do nível de qualidade fisiológica das sementes e também auxiliar na compreensão dos fatores que resultam na redução de vigor e viabilidade (ANDRADE *et al.*, 2018; VEIGA *et al.*, 2010). Como exemplo, pode-se citar as enzimas com função antioxidante como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) e as que atuam na respiração como a álcool desidrogenase (ADH) (MARCOS-FILHO, 2015).

Sendo assim, compreender as enzimas que estão envolvidas nas reações metabólicas responsáveis pela síntese e degradação de moléculas, pode fornecer subsídios para elucidar os efeitos do envelhecimento acelerado na deterioração das sementes, como atividades relacionadas aos processos bioquímicos.

Diante disso, objetivou-se estudar a qualidade fisiológica de sementes de famílias couve submetidas ao teste de envelhecimento acelerado tradicional e com solução saturada de NaCl e investigar a atividade enzimática nas sementes após o teste de vigor.

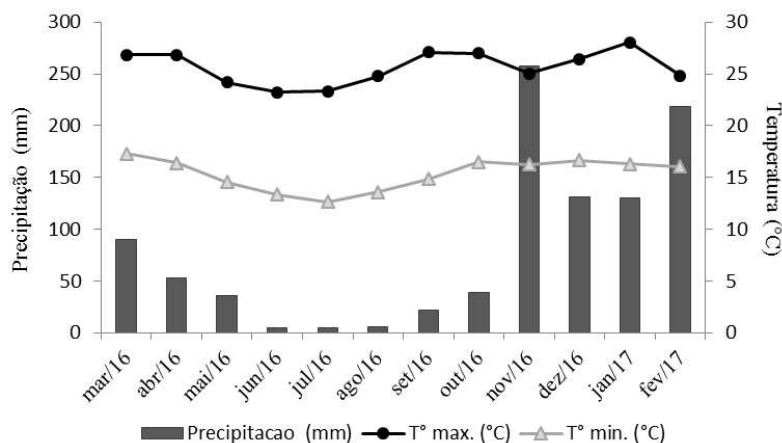
2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sementes do Departamento de Agronomia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) em Diamantina, MG e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

As sementes foram obtidas de plantas de progênies de meios-irmãos de couve em experimento montado no Setor de Olericultura da UFVJM (BRITO, 2018), que se situa a 1400 m de altitude, com coordenadas 18° 9' S de latitude e 43° 21' O. As plantas genitoras originais deste trabalho são as do banco de germoplasma de couve da UFVJM.

O período de colheita das siliquas variou de abril de 2016 a fevereiro de 2017. Os dados de temperatura média e precipitação pluviométrica, referentes ao período de colheita foram coletados da Estação Meteorológica de Diamantina e se encontram na Figura 1.

Figura 1. Dados climáticos correspondentes ao período de colheita. Diamantina – MG, 2016/2017.



Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia – INMET. Estação Climatológica Principal de Diamantina/MG
 Lat: 14°24'00" S Long: 056°27'00" O Alt :1286,3 m

A colheita das sementes foi feita parceladamente, à medida que as siliquas passavam de uma cor verde claro para marrom, estando as sementes no seu interior com a coloração marrom. Em seguida, as sementes foram extraídas das siliquas manualmente. As sementes obtidas de cada planta e em cada época de colheita foram unidas de acordo com as famílias que pertenciam e armazenadas em sacos de papel, sob condições controladas em câmara fria a 10°C e 50% de umidade relativa, até a realização dos experimentos.

Seis famílias, numeradas de 1 a 6 foram selecionadas com base no maior número de sementes produzidas.

A caracterização das sementes das famílias de couve quanto a qualidade fisiológica foi definida pelas seguintes determinações e testes:

O **grau de umidade** foi determinado pelo método da estufa a 105°C por 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 0,3 g de sementes para cada família.

O **peso de mil sementes** foi determinado pela contagem ao acaso de oito repetições de 100 sementes, sendo então pesadas, calculado o desvio padrão e o coeficiente de variação, e os valores expressos em gramas (g) (BRASIL, 2009).

Para o **teste de germinação** a semeadura foi realizada em substrato papel *germitest*, umedecido com uma quantidade de água equivalente 2,5 vezes o peso seco do papel,

em caixas tipo gerbox, acondicionadas em câmara de germinação tipo BOD, regulada a temperatura de 20°C, com luz constante (BRASIL, 2009). Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais ao 5º dia (**primeira contagem**), sendo o teste encerrado ao 10º dia (**contagem final**) (BRASIL, 2009). As contagens foram efetuadas diariamente para a determinação do **índice de velocidade de germinação (IVG)**, calculado segundo a fórmula proposta por Maguire (1962), computando-se o número de sementes com protrusão, a partir da emissão de 1 mm de radícula.

O **teste de emergência** foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes por família em bandejas com substrato areia e terra na proporção de 2:1. A umidade do substrato foi ajustada para 60% da capacidade de retenção. Após a semeadura, as bandejas foram mantidas à temperatura de 20°C. A emergência das plântulas foi computada ao 5º dia (**estande inicial**) e ao 10º dia (**estande final**), após a semeadura, avaliando-se o número de plântulas emergidas. Os resultados foram expressos em porcentagens. Para o **índice de velocidade de emergência (IVE)** foram computados, diariamente, o número de plântulas emersas a partir do início da emergência e o cálculo realizado conforme Maguire (1962).

A **massa seca (MS)** da parte aérea de plântulas foi determinada utilizando as plântulas normais provenientes do teste de emergência em condição controlada. As plântulas foram cortadas rente ao solo, acondicionadas em sacos de papel Kraft e levadas a estufa com circulação forçada de ar a 65°C até peso constante, seguido de pesagem em balança analítica (0,001g). Os resultados foram expressos em mg/50 plântulas (GUIMARÃES *et al.*, 2016).

Para o **teste de envelhecimento acelerado**, foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por família. As sementes foram dispostas de maneira a formar uma camada uniforme sobre um recipiente de tela fina colocado na superfície da tela de alumínio acoplada a uma caixa plástica tipo gerbox, contendo 40 mL de água destilada ou solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), na proporção de 40 g de NaCl para 100 mL de água, o qual proporciona umidade relativa de 76% (JIANHUA, MCDONALD, 1996). Os gerboxes foram levados para câmaras de germinação do tipo BOD, à temperatura de 41°C (KOMBA *et al.*, 2006), pelos períodos de 0 (testemunha), 24, 48, 72 e 96 horas. Após cada período foi determinado o grau de umidade e realizado o teste de germinação conforme descrito anteriormente, avaliando o número de plântulas normais após o quinto dia de semeadura (BRASIL, 2009; MARCOS-FILHO, 2015).

A **análise enzimática** foi feita por meio da técnica de eletroforese. Para esta análise, 4 g de sementes de cada família de couve foi submetida ao envelhecimento acelerado tradicional e com solução saturada de NaCl nos tempos de 0, 48 e 96 horas. As mesmas foram

maceradas na presença de nitrogênio líquido e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) em cadinho e armazenadas a -86°C de temperatura.

O tampão utilizado para extrair as enzimas superóxido dismutase, catalase e álcool desidrogenase foi o Tris HCL 0,2 M, pH 8 adicionando-se 0,1% de β -mercaptoetanol na proporção de 250 μL por 100mg de amostra de sementes. O material foi homogeneizado em vortex, e mantido overnight em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 60 minutos a 4°C .

Foi feito o gel de poliacrilamida a 7,5% (gel separador), e 4,5% (gel concentrador), para a corrida eletroforética. O sistema gel/eletrodo utilizado foi o tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 40 μL de sobrenadante das amostras no gel, e a corrida eletroforética efetuada a 150 V por 5 horas.

Os géis foram revelados para as enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e álcool desidrogenase (ADH, EC 1.1.1.1), segundo protocolos de Alfenas *et al.* (2006). Para a análise qualitativa dos sistemas izoenzimáticos, foi realizada a interpretação visual dos géis de eletroforese, levando-se em consideração a presença/ausência, bem como a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas. Para a análise quantitativa das bandas foi utilizado o Software de análise de imagens ImageJ (RASBAND, 1997) mensurado em pixel.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado para todos os testes. Os dados do teste de envelhecimento acelerado foram analisados em esquema fatorial $6 \times 5 \times 2$ (6 famílias, 5 períodos de envelhecimento e 2 métodos de envelhecimento). Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade para dados qualitativos. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software estatístico “R” (R CORE TEAM, 2018).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela Tabela 1 observam-se os dados obtidos na caracterização do perfil das sementes de famílias de couve. Os resultados do grau de umidade (U) das sementes apresentaram diferenças significativas. Porém os valores do grau de umidade variaram de 7,33% a 8,79%, e estão dentro do limite máximo tolerável, que deve ser de 2,0%, para que os resultados expressem o efeito dos tratamentos (MARCOS-FILHO, 2015). Pequenas variações no grau de umidade inicial entre lotes de sementes de couve também foram observadas por

Komba *et al.*, (2006), variações entre 6,9% a 7,6%, não afetaram significativamente os resultados do teste de envelhecimento acelerado.

Tabela 1. Grau de umidade - U (%); peso de mil sementes - PMS (g); plântulas normais na primeira contagem - PC (%); germinação - G (%); índice de velocidade de germinação - IVG; plântulas normais no estande inicial - EI (%); emergência - E (%); índice de velocidade de emergência - IVE e peso de massa seca - MS (mg/50 plântulas) obtidos de sementes de couve.

Famílias	Testes								MS(mg/50 plântulas)
	U (%)	PMS (g)	PC (%)	G (%)	IVG	EI (%)	E (%)	IVE	
1	8,76 a	3,4 bc	93 a	93 a	25,23 a	91 a	94 a	11,96 a	0,0012 a
2	7,99 ab	4,0 a	86 a	88 a	23,76 a	87 a	91 a	11,95 a	0,0016 a
3	7,68 b	3,3 c	94 a	95 a	25,75 a	84 a	89 a	11,50 a	0,0033 a
4	7,33 b	3,2 c	90 a	91 a	26,02 a	89 a	92 a	12,76 a	0,0036 a
5	8,79 a	3,3 c	89 a	95 a	24,92 a	86 a	92a	12,76 a	0,0037 a
6	8,12 ab	3,8 ab	93 a	93 a	24,04 a	90 a	94 a	13,01 a	0,0043 a
CV%	2,9	6,0	5,7	4,6	4,1	5,4	6,6	7,3	48,7

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

O peso de mil sementes (PMS) variou de 7,33g a 8,79g entre as famílias (Tabela 1), sendo classificadas como sementes pequenas por possuírem menos de 200g (Brasil, 2009). As sementes das diferentes famílias diferiram quanto ao peso de mil sementes, sendo que as sementes da família 2 apresentaram peso superior em relação as famílias 1, 3, 4 e 5. Essa diferença pode ser devido ao tamanho das sementes e não ao conteúdo de água que elas apresentaram. O conhecimento sobre a interferência dessa variável na qualidade das sementes é importante para se conhecer a variabilidade nas respostas obtidas quando se avaliam famílias distintas bem como para determinação do rendimento de cultivos.

Para a porcentagem de plântulas normais obtidas no teste de primeira contagem (PC), germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) (Tabela 1), observou-se que não houve diferença significativa entre as famílias. As porcentagens de germinação das sementes de famílias de couve apresentaram valores superiores ao padrão para a comercialização de sementes estabelecido pela Instrução Normativa n° 42, que estabelece germinação mínima de 80% (BRASIL, 2019).

Quanto aos resultados dos testes de vigor relacionados à emergência (Tabela 1), não houve diferença significativa entre as famílias para plântulas normais no estande inicial, emergência, índice de velocidade de emergência e peso de massa seca.

Diante dos resultados encontrados na Tabela 1, o teste de vigor pelo método de envelhecimento acelerado é importante para a verificação de possíveis diferenças entre as sementes de famílias de couve, já que todas as seis famílias apresentaram germinação semelhante e atenderam aos padrões estabelecidos para a comercialização, além de fornecer informações adicionais às proporcionadas pelo teste de germinação.

Na Tabela 2 pode-se observar o grau de umidade inicial e após os testes de envelhecimento acelerado pelo método tradicional e com uso de solução saturada de cloreto de sódio.

Tabela 2. Grau de umidade (%) das sementes de famílias de couve submetidas aos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de envelhecimento acelerado pelo método tradicional (EA) e pelo método com solução saturada de NaCl (EASS).

Famílias	Tempo de Envelhecimento				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
EA					
1	4,83	30,49	34,57	34,37	30,64
2	5,50	33,56	33,29	31,92	28,13
3	6,67	31,04	32,38	30,35	29,72
4	4,84	29,68	35,94	36,15	22,23
5	6,67	32,45	34,98	31,36	29,10
6	5,50	30,33	33,96	36,70	28,30
EASS					
1	5,17	9,62	8,70	9,21	9,74
2	5,23	10,61	10,03	10,70	10,23
3	6,33	10,70	10,02	9,96	10,18
4	4,94	8,42	8,97	9,66	8,32
5	6,73	10,07	9,19	9,31	10,15
6	5,34	8,84	9,62	9,94	8,35

O grau de umidade, antes do início dos testes (Tabela 2), tanto no método de envelhecimento acelerado tradicional quanto com solução saturada de NaCl apresentou

variação de 1,84% e 1,79%, respectivamente. Essa variação foi inferior a 2%, e está dentro do limite sugerido por Marcos-Filho (2015) para não comprometer os resultados, devido às diferenças na velocidade de umedecimento e na deterioração das sementes durante o envelhecimento.

Porém, após os períodos de envelhecimento acelerado tradicional, as variações entre o grau de umidade foram superiores a 2% considerados toleráveis entre lotes e indicadores da uniformidade das condições do teste. Uma maior amplitude de variação foi observada no tempo de 96 horas, com variação de 8,41%. Esses efeitos têm sido detectados, de maneira mais drástica, em sementes tipicamente de menor tamanho, como as hortaliças (MARCOS-FILHO 2015). Costa *et al.* (2008), trabalhando com sementes de repolho e couve-brócolis, também constataram elevação acentuada do grau de umidade após o teste de envelhecimento acelerado tradicional, com variações acima de 5,0%. Por outro lado, no método de envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl foram verificados graus de umidade menores e mais uniformes ao longo do envelhecimento,

Deve-se ressaltar que, nesta pesquisa, as comparações foram entre sementes de famílias, com características genéticas diferentes e não entre lotes (geneticamente iguais). Algumas características diferem entre genótipos e podem influenciar o processo de absorção de água, como tamanho da semente, permeabilidade do tegumento e composição química (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). As diferenças elevadas no grau de umidade entre sementes de diferentes progênies após o envelhecimento acelerado também foram relatadas em nabo forrageiro (OLIVEIRA *et al.*, 2017) e cenoura (MARTINS; SILVA; MACHADO, 2014), uma vez que o genótipo afeta a tolerância das sementes ao estresse imposto durante o teste (COSTA *et al.*, 2008).

As sementes submetidas ao método tradicional atingiram valores superiores de graus de umidade em relação às submetidas ao método com solução saturada de NaCl. A mesma tendência foi observada em sementes de coentro (RADKE *et al.*, 2016), gergelim (NERY *et al.*, 2018) e amaranto (MARTINS *et al.*, 2018), que pode ser explicada pela umidade relativa do ar de 100% em contato com as sementes submetidas ao teste de envelhecimento acelerado tradicional. Estudos realizados com sementes de brássicas revelam que as sementes tendem a alcançar o equilíbrio higroscópico em teores de água mais elevados, conforme aumenta a umidade relativa do ar (COSTA *et al.*, 2008).

Esse é um dos motivos que se tem estudado a utilização de solução salina no envelhecimento acelerado. A substituição de água por solução saturada de sal, permite a obtenção de umidade relativa de, aproximadamente, 76% quando é usado o NaCl; a água é

absorvida mais lentamente pelas sementes e a redução da intensidade de deterioração provoca efeitos menos drásticos sobre as sementes e resultados menos variáveis (JIANHUA; MCDONALD, 1996).

Uma vantagem adicional do uso da solução saturada de sal foi a redução no grau de umidade das sementes que restringiu o ataque de fungos, verificado com maior incidência nas sementes de famílias de couve submetidas ao método de envelhecimento acelerado tradicional. Isso é ocasionado pela restrição hídrica da umidade relativa do ambiente, que não favorece a proliferação de microrganismos (NERY *et al.*, 2018). Cruz *et al.* (2013) e Nery *et al.* (2018), citam a incidência de fungos como um problema encontrado no envelhecimento acelerado em sementes de crambe e gergelim. Em brássicas, o uso de solução salina no envelhecimento acelerado inibiu sensivelmente o crescimento e desenvolvimento de fungos (COSTA *et al.*, 2008).

No teste de envelhecimento acelerado houve interação significativa entre as famílias, os períodos e os métodos de envelhecimento (Tabela 3).

No método de envelhecimento acelerado tradicional, a partir de 48 horas foi observado decréscimo na porcentagem de plântulas normais para as sementes das famílias 2, 3 e 5; a partir de 72 horas houve um decréscimo na porcentagem de plântulas normais para as sementes das famílias 1 e 4; e em 96 horas houve um decréscimo na porcentagem de plântulas normais para as sementes da família 6 (Tabela 3). A medida que se aumentou o tempo de envelhecimento, houve decréscimo na germinação das sementes para todas as famílias, como foi verificado em sementes de alface (BARBOSA *et al.*, 2011) e salsa (TUNES *et al.*, 2013).

No tempo de 72 horas foi possível a separação das famílias em quatro níveis de qualidade, distinguindo-se a família 6 de qualidade superior, as famílias 1, 2, 3 e 5 de qualidade intermediária e a família 4 de qualidade inferior.

Tabela 3. Porcentagem de plântulas normais (%) obtidas no teste de germinação de sementes de famílias de couve submetidas aos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de envelhecimento acelerado tradicional (EA) e com solução saturada de NaCl (EASS).

Família	Tempo de Envelhecimento				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
EA					
1	97aA α	96aA α	89aA α	43cB β	20bC β
2	92aA α	86abAB α	74bBC α	64bC β	17bD β
3	96aA α	96aAB α	84abB β	61bC β	36aD β
4	92aA α	80bA β	83abA β	9dB β	21bB β
5	97aA α	95aAB α	83abB β	70bC β	34aD β
6	94aA α	94aA α	91aA α	87aA β	44aB β
EASS					
1	97aA α	95aA α	94aA α	96aA α	93aA α
2	90aA α	89aA α	81bA α	86aA α	91aA α
3	94aA α	94aA α	96aA α	96aA α	96aA α
4	92aA α	90aA α	92abA α	93aA α	94aA α
5	94aA α	95aA α	94abA α	98aA α	94aA α
6	95aA α	99aA α	97aA α	98aA α	97aA α
CV (%)	7,5				

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha, minúscula na coluna e grega entre quadros, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os diferentes tempos de exposição das sementes ao método de envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl não interferiram na germinação das sementes das famílias, exceto para 48 horas (Tabela 3). Pelo contrário, os tempos de até 96 horas influenciaram positivamente na germinação. Somente no tempo de 48 horas foi possível distinguir as sementes das famílias em dois níveis de vigor, sendo as famílias 1, 3 e 6 como as mais vigorosas e a 2, menos vigorosa que as demais. Porém, esse tempo foi menos eficiente na distinção quanto a germinação, igualando as famílias 4 e 5 tanto às famílias mais vigorosas quanto as menos vigorosas.

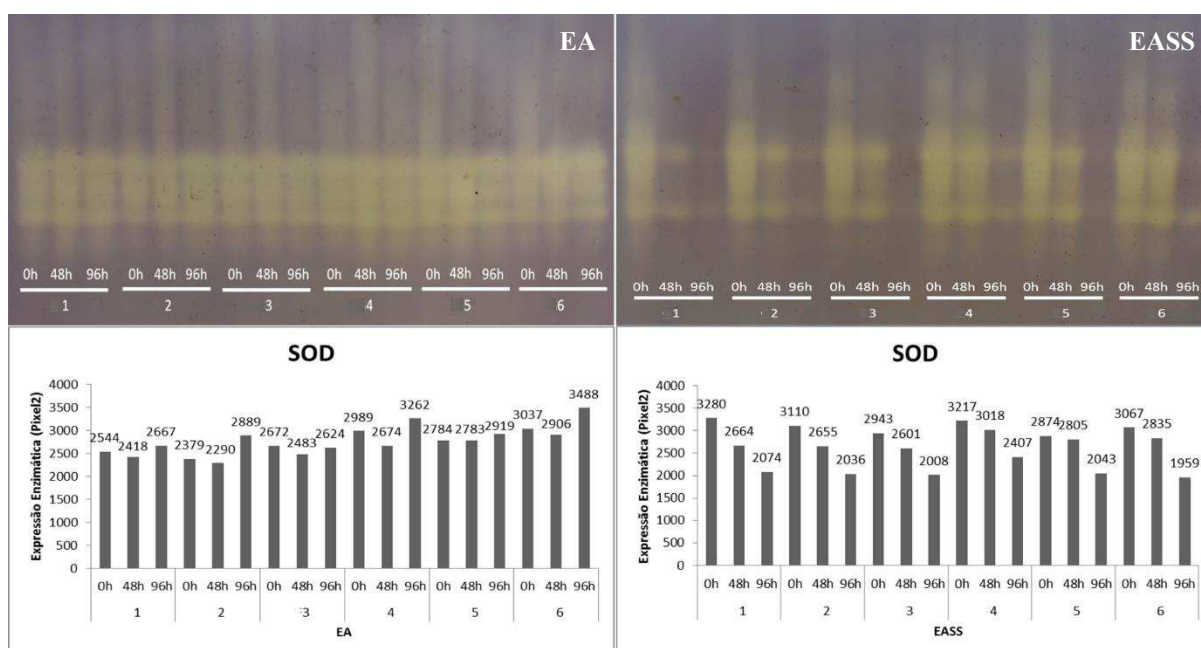
Com relação aos métodos de envelhecimento, foi observado que as sementes submetidas ao método com solução saturada de NaCl atingiram maior porcentagem de plântulas normais do que aquelas submetidas ao método tradicional (Tabela 3). No tempo de 24 horas apenas a família 4 se diferenciou, apresentando menor porcentagem de plântulas normais no envelhecimento acelerado tradicional quando comparado ao método com solução saturada de NaCl. No tempo de 48 horas, a mesma diferença foi observada, só que para as famílias 3, 4 e 5. Já os tempos de 72 e 96 horas foram os que distinguiram em todas as famílias os métodos de envelhecimento, ou seja, a medida que aumentou o tempo de exposição ao envelhecimento, o método do envelhecimento acelerado tradicional reduziu a porcentagem de plântulas normais.

Esses resultados contrariam aqueles obtidos por Costa *et al.* (2008), que consideram o teste de envelhecimento acelerado seguindo a metodologia tradicional por 96 horas e empregando solução diluída de NaCl por 72 horas eficiente no ranqueamento dos lotes de sementes de couve. KOMBA *et al.* (2006) observaram o ranqueamento de seis lotes de sementes de couve em distintos níveis de vigor a 41°C durante 48 e 72 horas, pelo método de envelhecimento acelerado tradicional.

Quanto à análise da atividade enzimática, os tempos foram escolhidos para a avaliação do comportamento das isoenzimas de modo a abranger sementes em diferentes estádios de deterioração, sendo considerada como sementes de couve não deterioradas, o tempo zero. Por meio da análise dos padrões enzimáticos de sementes de couve, observou-se variações das expressões das enzimas avaliadas.

Em relação à superóxido dismutase (SOD), em ambos os métodos de envelhecimento, verifica-se a atividade da enzima em todos os intervalos e nas diferentes famílias (Figura 2). No método de envelhecimento acelerado tradicional, a maior expressão da SOD foi observada para os tempos 0 e 96 horas em todas as famílias. Já no método de envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl a maior expressão foi no tempo 0 horas, seguido do tempo de 48 horas e 96 horas, demonstrando menor atuação da SOD na presença do sal e necessidade que a enzima seja atuante, pois o estresse é menor. Em condições normais, espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser formadas sem causar danos às sementes. Comparando-se os métodos, no envelhecimento acelerado tradicional, a maior expressão da SOD foi no tempo de 96 horas, exceto a família 3, já que as sementes estavam mais deterioradas neste tempo de envelhecimento.

Figura 2. Expressão da enzima Superóxido Dismutase (SOD) extraída das sementes de couve das famílias 1, 2, 3, 4, 5 e 6 submetidas ao teste de envelhecimento acelerado tradicional (EA) e com solução saturada de cloreto de sódio (EASS) por diferentes períodos (0, 48 e 96 horas).



Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) são consideradas eficientes na eliminação das EROs, sendo a primeira enzima a atuar na linha de defesa contra os radicais livres, pois converte o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (TESSUTTI *et al.*, 2013; GILL *et al.*, 2015; MARCOS-FILHO, 2015).

As maiores expressões da SOD observadas em ambos os métodos de envelhecimento acelerado podem ser pelo fato destas estarem envolvidas na preservação das sementes e também na proteção contra as EROs nas células e tecidos. Os primeiros tipos de sistemas de defesa antioxidante desenvolvidos contra danos oxidativos, são aqueles que impedem as EROs e também aqueles que bloqueiam e capturam radicais que são formados (PISOSCHI; POP, 2015).

Nery *et al.* (2018) ao estudarem a atividade da enzima superóxido dismutase em sementes de gergelim, submetidas ao teste de envelhecimento acelerado tradicional e com solução saturada de NaCl por diferentes períodos (0, 48 e 96 horas), observaram expressão da enzima em todos os intervalos nas diferentes cultivares.

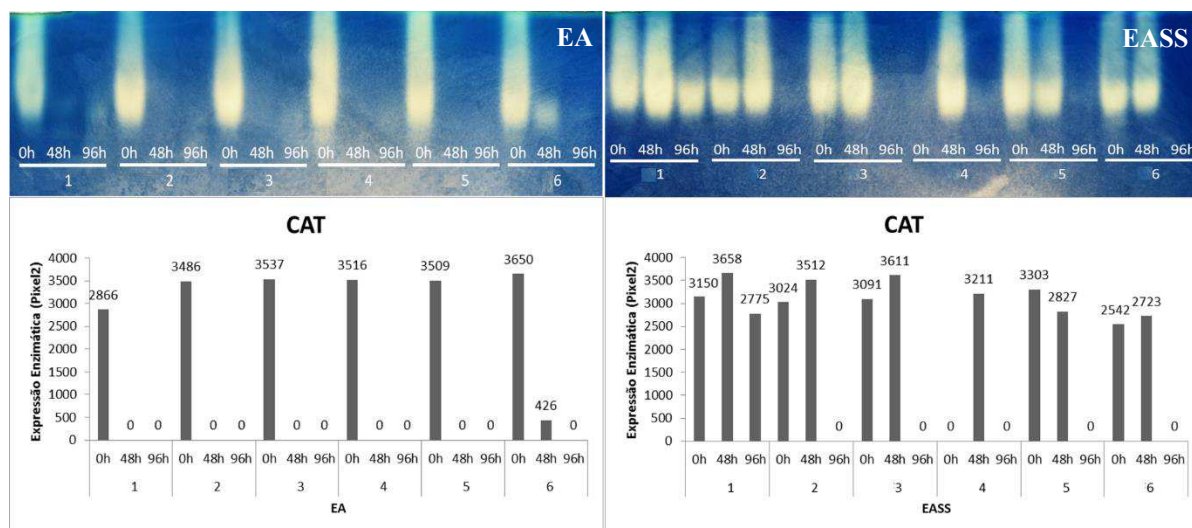
A catalase (CAT) tem a função de consumir o peróxido de oxigênio produzido em condições de estresse, além de ser muito eficiente na remoção de radicais livres; nessa atividade, pode completar a ação da superóxido dismutase (SOD). Sendo assim, a redução na

atividade dessa enzima, poderá resultar na menor capacidade de prevenção de danos oxidativos e a perda da viabilidade é mais rápida (MARCOS-FILHO, 2015; TABATABAEI, 2015).

Na Figura 3, observou-se que no método do envelhecimento acelerado tradicional, a maior expressão da enzima CAT ocorreu no tempo 0 (sementes sem envelhecer) em todas as famílias. Apenas a família 6 apresentou expressão da enzima também no tempo de 48 horas. Este resultado pode indicar o avanço da deterioração das sementes, pois elas são mais sujeitas ao ataque de radicais livres, devido à não expressão da atividade da CAT, o que contribui para a redução drástica na germinação no tempo de 96 horas. Segundo Castro *et al.* (2017), em sementes deterioradas, tem sido observada menor atividade da enzima catalase com menor eficiência dos sistemas removedores de radicais livres.

Além disso, há o consumo do material de reserva da semente para sobreviver às adversidades do teste, aumento da formação de peróxido nas células, e devido ao pequeno tamanho da semente, os danos foram maiores, provocando queda da germinação e do vigor da semente de couve. Isso pode ser confirmado pela redução da germinação com o aumento do tempo de envelhecimento, os quais as sementes foram expostas.

Figura 3. Expressão da enzima catalase (CAT) extraída das sementes de couve das famílias 1, 2, 3, 4, 5 e 6, submetidas ao teste de envelhecimento acelerado tradicional (EA) e com solução saturada de cloreto de sódio (EASS) por diferentes períodos (0, 48 e 96 horas).



No método de envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl, a expressão da enzima CAT foi observada em todos os períodos de envelhecimento para a família 1; nos períodos de 0 e 48 horas para as famílias 2, 3, 5 e 6; e no período de 48 horas para a família 4 (Figura 3), que pode estar relacionado à ação dessa enzima em atuar de forma eficiente na eliminação de espécies reativas de oxigênio, as EROs. Neste método de

envelhecimento, a alta atividade dessa enzima está provavelmente envolvida com o mecanismo de defesa das sementes contra o estresse oxidativo e conseqüentemente resultou em famílias de sementes mais vigorosas.

De acordo com Nery *et al.* (2018) a redução da atividade da catalase foi observada em sementes de gergelim submetidas ao envelhecimento acelerado tradicional quando comparadas ao envelhecimento com solução saturada.

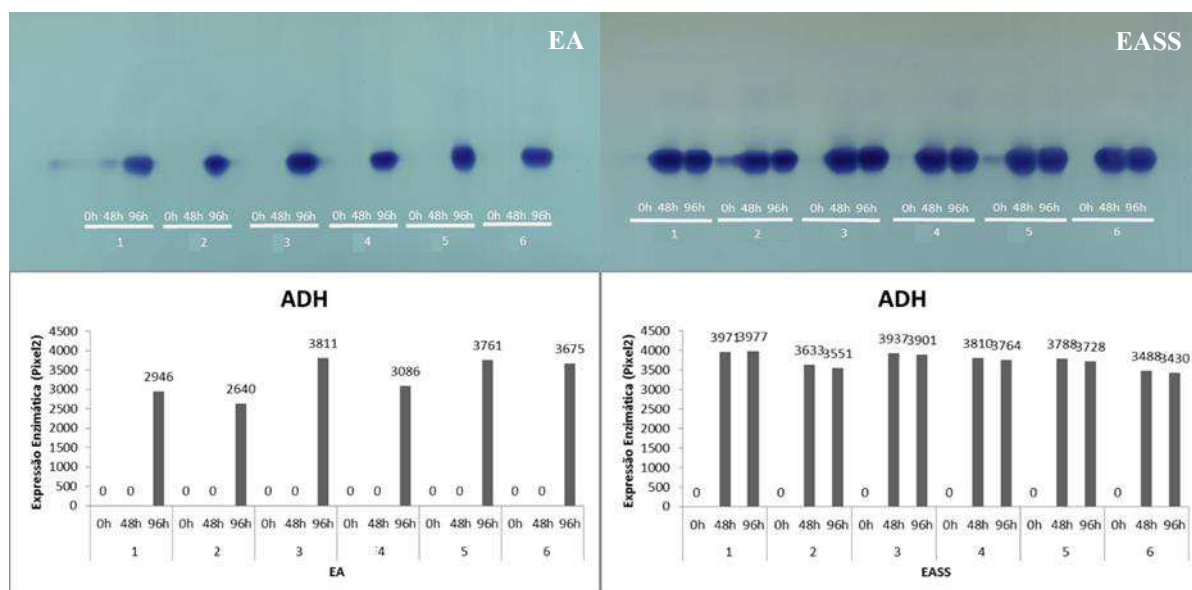
Neste estudo não ficou claro quais são as razões para a redução da atividade da enzima catalase durante a deterioração das sementes de couve no envelhecimento acelerado. De acordo com Mansouri-Far *et al.* (2015), parece possível que a redução da atividade das enzimas antioxidantes se deva a danos na síntese de RNA, que acabam levando à diminuição da síntese de proteínas e inativação de enzimas. O ataque de EROs a todas as enzimas causa peroxidação de lipídios, mudanças na composição dos ácidos graxos, perdas de fosfolipídios e mudanças estruturais, afetando diretamente a estrutura das membranas, o que pode desempenhar um papel significativo na redução da atividade antioxidante (MURTHY *et al.*, 2003; TABATABAEI, 2015; HEBERLE *et al.*, 2019).

Vale ressaltar que, o período que compreendeu a colheita até a realização dos experimentos, pode ter influenciado na alta atividade das enzimas SOD e CAT observadas no tempo zero (sementes sem envelhecer). Provavelmente a atuação dessas enzimas estão relacionados à eliminação de EROs formados durante o armazenamento das sementes.

Quanto à enzima álcool desidrogenase (ADH), com a ausência de oxigênio favorece o início do metabolismo de fermentação; essa enzima catalisa a conversão de acetaldeído em etanol, reduzindo significativamente a possibilidade de acúmulo daquele composto tóxico (LIMA, 2008; MARCOS-FILHO, 2015).

Para o envelhecimento acelerado tradicional, a expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH) foi observada apenas às sementes submetidas ao tempo de 96 horas em todas as famílias (Figura 4). Sementes submetidas a condições de envelhecimento acelerado por 96 horas, ou seja, condições menos favoráveis, indica possíveis acréscimos na produção de acetaldeído e grau mais avançado de deterioração. Em sementes menos deterioradas, a ausência da atividade de ADH refletiu a menor intensidade de respiração anaeróbica.

Figura 4. Expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH) extraída das sementes de couve das famílias 1, 2, 3, 4, 5 e 6, submetidas ao teste de envelhecimento acelerado tradicional (EA) e com solução saturada de cloreto de sódio (EASS) por diferentes períodos (0, 48 e 96 horas).



No método de envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl, as sementes submetidas aos tempos de 48 e 96 horas apresentaram expressão da enzima ADH em todas as famílias, resultando em uma maior proteção, já que a expressão da enzima ADH nestas famílias apresentaram maior expressão das bandas (Figura 4). Este resultado coincide com os resultados de Carvalho *et al.* (2014), onde constataram maiores expressões de ADH em sementes de cultivares de soja que apresentaram melhor qualidade fisiológica.

No tempo 0 (sementes sem envelhecer), em ambos os métodos de envelhecimento as sementes estavam menos deterioradas, a não expressão da enzima ADH refletiu na ausência de respiração anaeróbica. No tempo de 48 horas, apenas no método de envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl foi observado a expressão da enzima ADH. Neste método, as sementes estavam sob condições mais favoráveis e menos deterioradas, logo a atividade da enzima contribuiu na proteção das sementes contra a ação do acetaldeído. Já no tempo de 96 horas, apesar de ambos os métodos apresentarem expressão da enzima ADH, o envelhecimento acelerado tradicional apresentou condições menos favoráveis para as sementes e os possíveis acréscimos na produção de acetaldeído acelerou a deterioração, corroborando com os resultados da porcentagem de plântulas normais (Tabela 3).

O perfil enzimático da ADH corresponde ao potencial das sementes, com base nos testes de germinação após o envelhecimento acelerado.

4 CONCLUSÃO

O teste de envelhecimento acelerado, utilizando método tradicional na combinação de 72 horas a 41°C é adequado para detectar o potencial fisiológico de sementes de diferentes famílias de couve.

As análises isoenzimáticas permitem uma avaliação dos eventos bioquímicos ocorridos durante o envelhecimento acelerado das sementes de famílias de couve.

REFERÊNCIAS

ABDO, M. T. V. N.; PIMENTA, R. S.; PANOBIANCO, M.; VIEIRA, R. D. Testes de vigor para avaliação de sementes de pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 1, p.195-198, 2005.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 627 p. 2006.

AMARO, H. T. R.; DAVID, A. M. S. D. S.; NETA, S.; COSTA, I.; ASSIS, M. D. O.; ARAÚJO, E. F.; ARAÚJO, R. F. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst), cultivar FMS Brilhante. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 202-208, 2014.

ANDRADE, D. B.; SILVA, H. P.; CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, H. O.; COSTA NETA, I. S. Morphological, physiological, and biochemical indicators of quality in tobacco fruits and seeds. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 4, p. 1-16, 2018.

ÁVILA, M. R.; BRACINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; MARTORELLI, D. T.; ALBRECHT, L. P. Testes de laboratório em sementes de canola e a correlação com a emergência das plântulas em campo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 62-76, 2005.

ÁVILA, P. F. V. D. U. F.; VILLELA, F. A. U. F.; ÁVILA, M. S. V. D. U. F. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do potencial fisiológico de sementes de rabanete. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n.1, p.52-58,2006.

AZEVEDO, A. M.; ANDRADE JÚNIOR, V. C.; SANTOS, A. A.; SOUZA JÚNIOR, A. S.; OLIVEIRA, A. J. M.; FERREIRA, M. A. M. Population parameters and selection of kale genotypes using Bayesian inference in a multi-trait linear model. **Acta Scientiarum**, v. 39, n. 1, p. 25-31, 2017.

BARBOSA, R. M.; COSTA, D. S.; SÁ, M. E. Envelhecimento acelerado de sementes de espécies oleráceas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, p. 328-335, 2011.

BOOIJ, R.; STRUIK, P.C. Effects of temperature on leaf and curd initiation in relation to juvenility of cauliflower. **Scientia Horticulturae**, v. 44, p. 201-214, 1990.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 42, de 17 de setembro de 2019. Estabelece as Normas para a Produção e a Comercialização de Sementes e Mudanças de Espécies Olerícolas, Condimentares, Medicinais e Aromáticas e os seus padrões de sementes, com validade em todo o território nacional, visando à garantia de sua qualidade e identidade. Diário Oficial da União. Seção 1, p. 4.

BRITO, O. G. **Estudo genético e seleção de progênies de meios-irmãos de couve de folhas**. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 79 p., 2018.

CARVALHO, E. R.; MAVAIÉ, D. P. R.; OLIVEIRA, J. A.; CARVALHO, M. V.; VIEIRA, A. R. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49 p. 967-976, 2014.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5. ed. Jaboticabal, SP: FUNEP, 2012. 590 p.

CASTRO, D. G. et al. Qualidade fisiológica e expressão enzimática de sementes de soja RR. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 222-235, 2017.

COSTA, C. J.; TRZECIAK, M. B.; VILLELA, F. A. Potencial fisiológico de sementes de brássicas com ênfase no teste de envelhecimento acelerado. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 144-148, 2008.

CRUZ, S. M.; NERY, M. C.; ROCHA, A. D. S.; VON PINHO, É. V. D. R.; ANDRADE, P. C. D. R.; DIAS, D. C. F. D. S. Vigor tests for evaluation of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) seed quality. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 4, p. 485-494, 2013.

GILL, S. S. et al. Superoxide dismutase - mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsbergis, v. 22, n. 14, p. 10375-10394, 2015.

GUIMARÃES, I. P.; PEREIRA, F. E.; TORRES, S. B.; BENEDITO, C. P.; SOUZA, P. S. Emergência e crescimento inicial de plântulas de *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. em função de posições e profundidades de semeadura. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 59, n. 3, p. 288-292, 2016.

HAMPTON J.G.; TEKRONY, D.M. **Handbook of vigour test methods**. Zurich: ISTA.117p. 1995.

HEBERLE, E.; ARAUJO, E. F.; ADÍLIO, F. D. L.; CECON, P. R.; ARAUJO, R. F.; AMARO, H. T. Qualidade fisiológica e atividade enzimática de sementes de milho durante o armazenamento. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 657-665, 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Produção Agrícola Municipal (PAM), Rio de Janeiro: 2017. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>

JIANHUA, Z.; MCDONALD, M. B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, v. 25, n. 1, p. 123-131, 1996.

KIKUTI, A. L. P.; MARCOS FILHO, J. Physiological potential of cauliflower seeds. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 4, p. 374-380, 2008.

KOMBA, C. G.; BRUNTON, B. J.; HAMPTON, J. G. Accelerated ageing vigour testing of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC) seed. **Seed Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 205-208, 2006.

LIMA, M. G. S. **Deteção de genes e expressão enzimática em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) crescidas sob estresse salino**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 93 p., 2008.

LOPES, K. P.; NASCIMENTO, M. G. R.; BARBOSA, R. C. A.; COSTA, C. C. Salinidade na qualidade fisiológica em sementes de *Brassicas oleracea* L. var. *itálica*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, 2014.

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.

MANSOURI-FAR, C.; GOODARZIAN-GHAHFAROKHI, M.; SAEIDI, M.; ABDOLI, M. Antioxidant enzyme activity and germination characteristics of different maize hybrid seeds during ageing. **Environmental and Experimental Biology**, v. 13, p. 177-182, 2015.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina, 2.ed., 660p., 2015.

MARTINS, C. C.; SILVA, N.; MACHADO, C. G. Testes para a seleção de populações de cenoura visando ao vigor e à longevidade das sementes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 5, p. 768-775, 2014.

MARTINS, A. B. N. et al. Accelerated aging test in amaranth ('Amaranthus cruentus' L.) seeds. **Australian Journal of Crop Science**, v. 12, n. 3, p. 444, 2018.

MURTHY, U. N.; KUMAR, P. P.; SUN, W. Q. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. **Journal of experimental botany**, v. 54, n. 384, p. 1057-1067, 2003.

NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M. Testes de vigor para avaliação da qualidade de sementes de nabo forrageiro. **Informativo Abrates**, Londrina, v. 19, n. 1, p. 9-20, 2009.

NERY, M. C.; ROCHA, A. D. S.; PINHO, É. V. D. R. V.; SANTOS, H. O. D.; FIALHO, C. M. T.; NERY, F. C. Accelerated ageing test and behaviour investigation of isoenzymes in sesame seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, p.1-9, 2018.

OLIVEIRA, S. S. C. D.; MARTINS, C. C.; PEREIRA, F. E. C. B.; LOPES, M. T. G., TORRES, S. B. Tests for the selection of forage turnip progeny to order the vigor and longevity of seeds. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 1, p. 230-236, 2017.

PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Envelhecimento acelerado e deterioração controlada em sementes de tomate. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 525- 531, 2001.

PINTO, C. M. F.; DE PADUA, J. G.; CASALI, V. W. D.; CAMPOS, J. P. Produção de mudas, plantio e espaçamento de brássicas. **Informe Science Agropecuário**, v. 9, p. 26-29, 1983.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 97, p. 55-74, 2015.

RADKE, A. K.; REIS, B. B. D.; GEWEHR, É.; TUNES, L. M. D.; VILLELA, F. A. Alternativas metodológicas do teste de envelhecimento acelerado em sementes de coentro. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 95-99, 2016.

RAMOS, N. P.; FLOR, E. P. O.; MENDONÇA, E. D.; MINAMI, K. Envelhecimento acelerado em sementes de rúcula (*Eruca sativa* L.). **Revista Brasileira de sementes**, v. 26, n. 1, p. 98-103, 2004.

RASBAND, W. S. **Image J: Image Processing and Analysis in Java**. Available from the U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Available in: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>, 1997.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2018.<https://www.R-project.org>

TABATABAEI, S. A. The Changes of Germination Characteristics and Enzyme Activity of Barley Seeds under Accelerated Aging. **Cercetari Agronomice in Moldova**, v. 48, n. 2, p. 61-67, 2015.

TESSUTTI, L. S. et al. Measuring the antioxidante capacity of blood plasma using potentiometry. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 441, n. 2, p. 109-114, 2013.

TORRES, S. B.; NEGREIROS, M. Z. Envelhecimento acelerado em sementes de berinjela. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 209-213, 2008.

TRANI, P. E. et al. Couve de folha: do plantio à pós-colheita. **Campinas: Instituto Agrônômico**, n.214, p.36, 2015.

TUNES, L. M. T.; PEDROSO, D. C.; GADOTTI, G. I.; MUNIZ, M. F. B.; BARROS, A. C. S. A; VILLELA, F. A. Accelerated aging to assess parsley seed vigor. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 457-460, 2013.

VEIGA, A. D. et al. Influência do potássio e da calagem na composição química, qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 953-960, 2010.

CAPÍTULO II:
TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SEMENTES
DE COUVE

RESUMO

SALES, T. S **TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SEMENTES DE COUVE**. 2019. 78 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

O teste de tetrazólio tem sido utilizado como opção para a avaliação da qualidade de lotes de sementes e vem sendo adotado para várias espécies na identificação do vigor e viabilidade. Objetivou-se com essa pesquisa desenvolver procedimentos apropriados para a condução do teste de tetrazólio com o intuito de verificar a viabilidade de sementes de famílias de couve. Foram utilizadas quatro famílias de sementes de couve identificadas pelos números: 1, 2, 3, 4. Para caracterização do perfil das famílias realizou-se a determinação do grau de umidade, peso de mil sementes, testes de primeira contagem de germinação, germinação, índice de velocidade de germinação, emergência, estande inicial e índice de velocidade de emergência. Para o teste de tetrazólio, foram realizados testes preliminares e foi definido o pré-condicionamento de 10 horas com remoção total do tegumento. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado para todos os testes. Os dados do teste de tetrazólio foram analisados em esquema fatorial 4x3x3 (4 famílias, 3 concentrações de tetrazólio: 0,075%; 0,2%; 0,5% e 1,0% e 3 períodos de imersão na solução: 2, 4 e 6 horas). Concluiu-se que o pré-condicionamento das sementes entre papel por 10 horas a 20°C, seguido pela remoção total do tegumento e a utilização de solução de tetrazólio na concentração de 0,2% por 4 horas a 30°C é eficiente na avaliação da viabilidade das sementes de couve.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *acephala*; pré-condicionamento; qualidade fisiológica; curva de embebição.

ABSTRACT

SALES, T. S. **TETRAZOLIUM TEST FOR EVALUATING KALE SEEDS QUALITY.** 2019. 78 p. Thesis (Doctoral degree in Vegetable Production) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

The tetrazolium test has been used as an option for seed lot quality evaluation and has been adopted for several species to identify vigor and viability. The objective of this research was to develop appropriate procedures for conducting the tetrazolium test in order to verify the viability of kale seed families. Four families of kale seeds identified by the numbers 1, 2, 3, 4 were used. To characterize the family profile, moisture content, weight of 1,000 seeds, first germination count, germination, germination speed index, emergence, initial stand and emergence velocity index tests were determined. For the tetrazolium test, preliminary tests were performed and a 10-hour preconditioning with total removal of the integument was defined. A completely randomized design was used for all tests. Tetrazolium test data were analyzed in a 4x3x3 factorial design (4 families, 3 tetrazolium concentrations: 0.075%; 0.2%; 0.5% and 1.0% and 3 solution immersion periods: 2, 4 and 6 hours). It was concluded that seed preconditioning between paper for 10 hours at 20°C, followed by total removal of the integument and the use of tetrazolium solution at 0.2% concentration for 4 hours at 30°C is efficient for viability evaluation of kale seeds.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *acephala*; preconditioning; physiological quality; soaking curve.

1 INTRODUÇÃO

A couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*, da família Brassicaceae, se destaca devido ao seu volume de produção, a sua facilidade de propagação, o aumento do seu consumo devido às diversas formas de utilização na culinária e mais recentemente as descobertas da ciência quanto às suas propriedades nutricionais e medicinais (TRANI *et al.*, 2015).

O interesse do melhoramento genético da couve é selecionar genótipos com menor altura, com número reduzido de brotações, maior quantidade de folhas por planta (AZEVEDO *et al.*, 2012) e resistência às principais pragas das brássicas (AZEVEDO *et al.*, 2014). Para se obter sucesso em um programa de melhoramento, além da avaliação do desempenho agrônômico de possíveis genitores, é de fundamental importância a existência de locais que favoreçam a produção e desenvolvimento de sementes de diferentes genótipos.

O setor de Olericultura, localizado no campus JK da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), com altitude de 1387 m e coordenadas 18°12'01"S e 43°34'20"O, apresentou condições propícias para o desenvolvimento das sementes de couve provenientes de famílias de meios-irmãos oriundas do banco de germoplasma da própria universidade. No entanto, as pesquisas ainda são escassas em relação à qualidade dessas sementes, sendo necessários a adequação e desenvolvimento de testes para garantir esses resultados.

Para averiguar a qualidade fisiológica das sementes são realizados testes como o de germinação, o qual é feito em condições ideais e artificiais que permitem a manifestação do máximo potencial de germinação. O teste de germinação é universalmente utilizado em programas de controle de qualidade e dependendo da espécie analisada, a obtenção dos resultados pode consumir uma quantidade considerável de tempo, no caso da couve, esse teste leva 10 dias (BRASIL, 2009).

Durante o processo de germinação, o embrião contido numa semente, retoma as atividades após a embebição sob condições favoráveis e se completa com a protrusão radicular através dos tecidos circundantes como tegumento e endosperma (RAJJOU *et al.*, 2012). Sementes com tegumento permeável geralmente exibem três fases durante a germinação: (I) embebição com intensificação da atividade respiratória; (II) ativação dos processos metabólicos e limitada absorção de água; (III) protrusão da radícula embrionária devido à acentuada atividade mitótica (BEWLEY *et al.*, 2012). Portanto, o estudo da curva de absorção de água pelas sementes além de caracterizar o processo germinativo e pré-condicionamento, auxilia na padronização de testes para avaliação da qualidade fisiológica das sementes.

Como opção para a avaliação da qualidade de sementes, o teste de tetrazólio tem sido utilizado com sucesso nos programas de controle de qualidade, por ser um método rápido que estima a viabilidade de lotes de sementes (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2019). Em geral, para espécies de *Brassica* spp., pode ser concluído em menos de 24 horas (BRASIL, 2009) e possibilita identificar a presença, localização e natureza de eventuais danos nas sementes.

O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases nos processos respiratórios dos tecidos. Durante a respiração, ocorre a liberação de íons hidrogênio, com os quais o sal 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio reage formando uma substância de cor vermelha e insolúvel, denominada de formazan, nos tecidos vivos da semente (ABBADE; TAKAKI, 2014; MARCOS-FILHO, 2015).

Para realizar o teste de tetrazólio, é necessário o desenvolvimento de um método adaptado para cada espécie, de modo a definir as condições apropriadas de pré-condicionamento, como temperatura e duração de embebição, concentração da solução de 2, 3, 5trifenil cloreto de tetrazólio, método de exposição das sementes à coloração e a avaliação das sementes.

Pesquisas relacionadas à ajustes nas metodologias para o uso do teste de tetrazólio já tem sido realizadas para várias espécies e para algumas pertencentes à família Brassicaceae como nabo forrageiro (NERY *et al.*, 2015), crambe (REZENDE *et al.*, 2015) e canola (FLORES *et al.*, 2015).

Diante da escassez de informações sobre a utilização desse método de análise para sementes de couve, objetivou-se com essa pesquisa desenvolver procedimentos apropriados para a condução do teste de tetrazólio com o intuito de verificar a viabilidade de sementes de famílias dessa espécie.

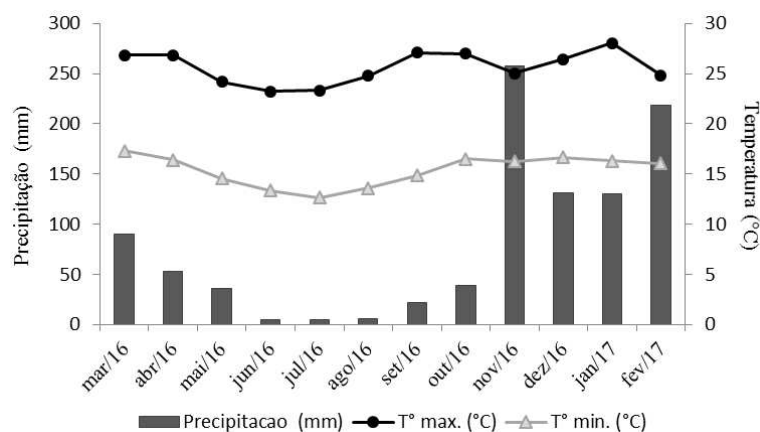
2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sementes do Departamento de Agronomia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) em Diamantina, MG.

As sementes foram obtidas de plantas de progênes de meios-irmãos de couve em experimento montado no Setor de Olericultura da UFVJM (BRITO, 2018), que se situa a 1400 m de altitude, com coordenadas 18° 9' S de latitude e 43° 21' O. As plantas genitoras originais deste trabalho são as do banco de germoplasma de couve da UFVJM.

O período de colheita das siliquis variou de abril de 2016 a fevereiro de 2017. Os dados de temperatura média e precipitação pluviométrica, referentes ao período de colheita foram coletados da Estação Meteorológica de Diamantina e se encontram na Figura 1.

Figura 1. Dados climáticos correspondentes ao período de colheita. Diamantina – MG, 2016/2017.



Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia – INMET. Estação Climatológica Principal de Diamantina/MG
 Lat: 14°24'00" S Long: 056°27'00" O Alt :1286,3 m

A colheita das sementes foi feita parceladamente, à medida que as siliquis passavam de uma cor verde claro para marrom, estando as sementes no seu interior com a coloração marrom. Em seguida, as sementes foram extraídas das siliquis manualmente. As sementes obtidas de cada planta e em cada época de colheita foram unidas de acordo com as famílias que pertenciam e armazenadas em sacos de papel, sob condições controladas em câmara fria a 10°C e 50% de umidade relativa, até a realização dos experimentos.

Quatro famílias (diferentes das selecionadas para realização dos experimentos do capítulo I), numeradas de 1 a 4 foram selecionadas com base no maior número de sementes produzidas.

A caracterização das sementes das famílias de couve quanto a qualidade fisiológica foi definida pelas seguintes determinações e testes:

O **grau de umidade** foi determinado pelo método da estufa a 105°C por 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 0,3 g de sementes para cada família.

O **peso de mil sementes** foi determinado pela contagem ao acaso de oito repetições de 100 sementes, sendo então pesadas, calculado o desvio padrão e o coeficiente de variação, e os valores expressos em gramas (g) (BRASIL, 2009).

Para o **teste de germinação** a semeadura foi realizada em substrato papel *germitest*, umedecido com uma quantidade de água equivalente 2,5 vezes o peso seco do papel, em caixas tipo gerbox, acondicionadas em câmara de germinação tipo BOD, regulada a temperatura de 20°C, com luz constante (BRASIL, 2009). Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais ao 5º dia (**primeira contagem**), sendo o teste encerrado ao 10º dia (**contagem final**) (BRASIL, 2009). As contagens foram efetuadas diariamente para a determinação do **índice de velocidade de germinação (IVG)**, calculado segundo a fórmula proposta por Maguire (1962), computando-se o número de sementes com protrusão, a partir da emissão de 1 mm de radícula.

O **teste de emergência** foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes por família em bandejas com substrato areia e terra na proporção de 2:1. A umidade do substrato foi ajustada para 60% da capacidade de retenção. Após a semeadura, as bandejas foram mantidas à temperatura de 20°C. A emergência das plântulas foi computada ao 5º dia (**estande inicial**) e ao 10º dia (**estande final**), após a semeadura, avaliando-se o número de plântulas emergidas. Os resultados foram expressos em porcentagens. Para o **índice de velocidade de emergência (IVE)** foram computados, diariamente, o número de plântulas emersas a partir do início da emergência e o cálculo realizado conforme Maguire (1962).

A construção da **curva de embebição** foi elaborada a partir de duas repetições de 50 sementes utilizando dois lotes de sementes. Um corresponde às sementes remanescentes de famílias de meios-irmãos de couve, ou seja, sementes de outras famílias que não atingiram o número suficiente para realização do experimento e o outro às sementes comerciais de couve manteiga da empresa Feltrin®. As sementes foram colocadas para embeber em caixas tipo gerbox entre papel *germitest*, umedecido com quantidade de água destilada igual a 2,5 vezes o peso do papel seco e acondicionadas em câmara tipo BOD, a 20°C. Durante a avaliação as sementes foram retiradas do gerbox, cuidadosamente secadas, com auxílio de papel toalha e pesadas em balança digital com precisão de 0,0001 g (RODRIGUES *et al.*, 2008).

As sementes foram pesadas antes do início da embebição e após intervalos de tempos de 15 minutos com duração de 7 horas, 30 minutos com duração de 3,5 horas, 1 hora com duração de 10,5 horas e 2 horas com duração de 17,5 horas até que houve a estabilização da curva e a protrusão radicular de 50% do total de sementes (SILVA *et al.*, 2019).

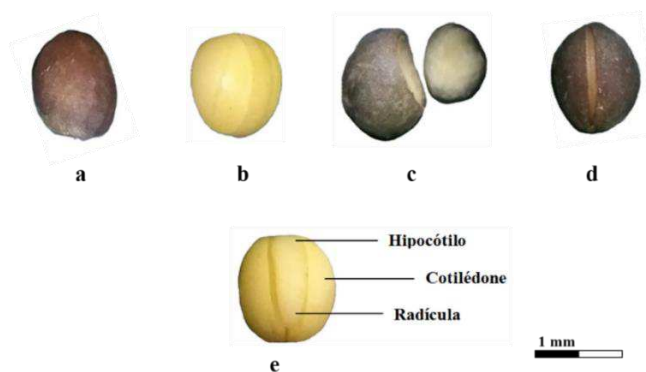
O teor de água absorvida em cada tempo foi calculado pela seguinte expressão: % de água absorvida: $[(Pf - Pi) / Pi] * 100$. Sendo: Pi: peso inicial das sementes em cada intervalo citado; e Pf: peso final das sementes em cada intervalo citado (ARMONDES *et al.*, 2015).

Para definir os procedimentos a serem realizados no teste de tetrazólio, inicialmente foram feitos testes preliminares através de diferentes combinações de tempo de hidratação, formas de preparação e coloração de sementes de couve, de acordo com a descrição da Tabela 1. As sementes foram pré-condicionadas entre papel umedecido por 10 horas e 14 horas a 20°C, testando-se a coloração das sementes intactas, com a remoção total do tegumento, com corte na região distal ao eixo embrionário e com corte longitudinal no maior sentido (Figura 2), em solução de tetrazólio nas concentrações de 0,075%, 0,2%, 0,5% e 1,0% mantidas no escuro à temperatura de 30°C em BOD, por 2 horas; 4 horas e 6 horas.

Tabela 1. Preparo das sementes de couve, submetidas ao pré-condicionamento (horas) e à procedimentos específicos antes da coloração a 20°C e concentração da solução de tetrazólio (%) e tempo (horas) de coloração a 30°C.

Pré-condicionamento entre papel (h) a 20 °C	Coloração	Coloração a 30°C	
	Preparação	Solução de Tetrazólio (%)	Tempo (h)
10 e 14	Sementes intactas	0,075; 0,2; 0,5 e 1	2, 4 e 6
10 e 14	Remoção total do tegumento	0,075; 0,2; 0,5 e 1	2, 4 e 6
10 e 14	Corte na região distal ao eixo embrionário	0,075; 0,2; 0,5 e 1	2, 4 e 6
10 e 14	Corte longitudinal no maior sentido	0,075; 0,2; 0,5 e 1	2, 4 e 6

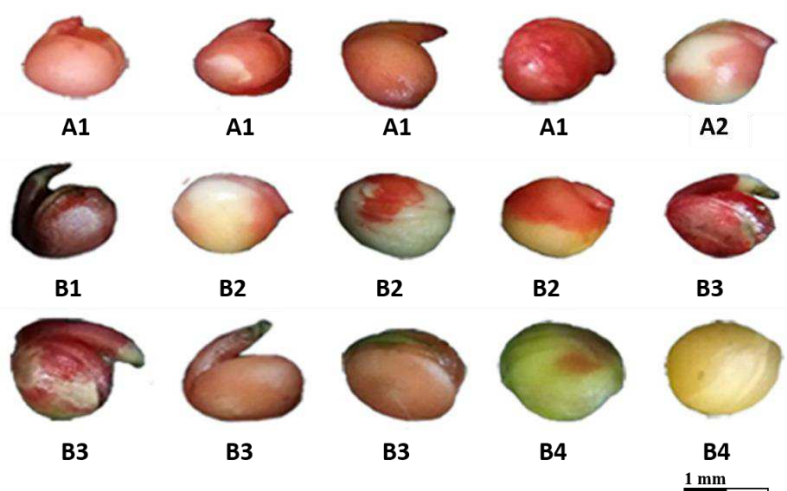
Figura 2. Visualização dos preparos das sementes de couve: (a) semente intacta; (b) remoção total do tegumento; (c) corte distal ao eixo embrionário; (d) corte longitudinal no maior sentido; (e) morfologia da semente.



Para o teste de tetrazólio foi definido o pré-condicionamento de 10 horas com remoção total do tegumento. As sementes foram colocadas para coloração em um béquer de vidro (100 mL), num ambiente escuro por 2, 4 e 6 horas, com concentrações da solução de 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio de 0,075 %, 0,2% e 0,5% a 30°C. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada família.

Após o desenvolvimento da coloração, as sementes foram lavadas em água corrente e deixadas submersas em água até o momento da avaliação. Posteriormente, foram examinadas com a ajuda de um microscópio estereoscópico (BRASIL, 2009), observando principalmente a área vital da semente (eixo embrionário) (Figura 1(e)), e de acordo com a extensão, intensidade dos tons avermelhados, presença de áreas brancas leitosas, aspecto dos tecidos e localização destas colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento. As sementes foram classificadas em Categoria A (viáveis) e Categoria B (inviáveis) (Figura 3). Assim, as que pertencem à Categoria A são subdivididas em: A1 - são aquelas com estruturas embrionárias bem desenvolvidas, intactas e com coloração rosa e A2 - menos de 50% do embrião descolorido, sem atingir o eixo embrionário e tecido com aspecto normal e firme. Já a Categoria B é subdividida em: B1 - embrião com coloração vermelho intenso; B2 - mais de 50% dos cotilédones descoloridos; B3 - região do eixo embrionário descolorido e B4 - embrião completamente descolorido.

Figura 3. Teste de tetrazólio em sementes de couve: Categoria A (viáveis) e Categoria B (inviáveis).



O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado para todos os testes. Apenas os dados do teste de tetrazólio foram analisados em esquema fatorial 4x3x3 (4 famílias, 3 concentrações e 3 períodos de imersão). Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os resultados do teste de germinação e tetrazólio foram submetidos à análise de correlação simples de Pearson (r) e os dados foram interpretados de acordo com o seguinte critério descrito por Figueiredo-Filho e Silva Júnior (2009): $r = 0,10$ a $0,30$ (fraco), $r = 0,40$ a $0,6$

(moderado) e $r = 0,70$ a 1 (forte). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software estatístico “R” (R CORE TEAM, 2018).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se na Tabela 2 os dados obtidos na caracterização do perfil das sementes de famílias de couve. Os resultados do grau de umidade (U) das sementes apresentaram valores similares, com variação dentro do limite máximo tolerável, que deve ser de 2,0 pontos percentuais, para que os resultados expressem o efeito dos tratamentos (MARCOS-FILHO, 2015).

Tabela 2. Grau de umidade - U (%); peso de mil sementes - PMS (g); plântulas normais na primeira contagem - PC (%); germinação - G (%); índice de velocidade de germinação - IVG; plântulas normais no estande inicial - EI (%); emergência - E (%) e índice de velocidade de emergência - IVE obtidos de sementes de couve.

Famílias	Testes							
	U (%)	PMS (g)	PC (%)	G (%)	IVG	EI (%)	E (%)	IVE
1	8,50 a	3,4 b	93 a	93 b	26,75 ab	84 a	86 a	11,30 a
2	8,25 a	3,3 b	98 a	99 a	26,15 ab	89 a	91 a	11,77 a
3	7,95 a	4,1 a	94 a	97 ab	26,92 a	93 a	96 a	12,33 a
4	7,60 a	3,0 b	96 a	97 ab	25,86 b	92 a	94 a	12,79 a
CV%	15,3	9,2	3,9	2,6	1,69	6,8	5,9	7,1

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

O peso de mil sementes (PMS) variou de 7,60g a 8,50g entre as famílias (Tabela 1), sendo classificadas como sementes pequenas por possuírem menos de 200g (Brasil, 2009). As sementes das diferentes famílias diferiram quanto ao peso de mil sementes, sendo que as sementes da família 3 apresentaram peso superior em relação as famílias 1, 2 e 4. Essa diferença pode ser devido ao tamanho das sementes e não ao conteúdo de água que elas apresentaram. O peso das sementes é uma característica de potencial para o desenvolvimento de novos materiais que associem a qualidade das sementes a uma boa produtividade. Como se trata de um trabalho associado ao melhoramento genético, estas diferenças entre famílias podem indicar uma resposta à escolha de materiais.

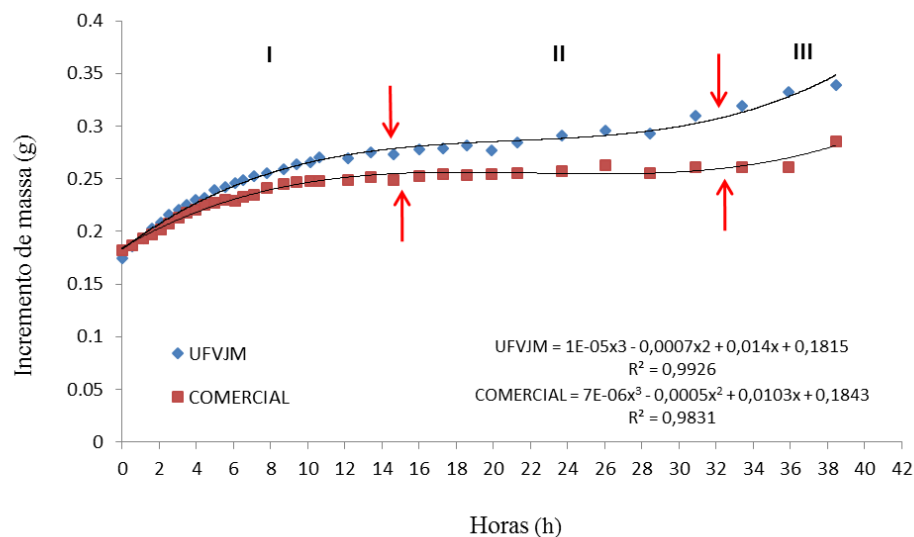
Para a porcentagem de plântulas normais obtidas no teste de primeira contagem (PC), observou-se que não houve diferença significativa entre as famílias (Tabela 2). Já para a porcentagem de germinação (G), podemos observar que a família 2 apresentou maior porcentagem de germinação e diferiu significativamente apenas da família 1. Observa-se também que as porcentagens de germinação das sementes de famílias de couve apresentaram valores superiores ao padrão para a comercialização de sementes estabelecido pela Instrução Normativa n° 42, que estabelece germinação mínima de 80% (BRASIL, 2019).

O índice de velocidade de germinação (IVG), por sua vez, foi maior para a família 3, que diferiu da família 4.

Quanto aos resultados dos testes de vigor relacionados com a emergência (Tabela 1), não houve diferença significativa entre as plântulas normais no estande inicial (EI), emergência (E) e índice de velocidade de emergência (IVE).

Para estabelecimento dos períodos de pré-condicionamento para realização do teste de tetrazólio, foi estabelecida a curva de embebição para dois lotes de sementes de couve (Figura 4).

Figura 4. Incremento de massa (g) de sementes de couve e sementes comerciais de couve manteiga da empresa Feltrin®, ao longo de 38 horas.



O teor de água apresentados pelo lote de sementes produzidas na UFVJM e pelo lote de sementes comercial foram de 7,37% e 6,75 %, respectivamente.

Observa-se pela Figura 4 que as curvas tenderam ao padrão trifásico de embebição proposto por Bewley e Black (1994) para os dois lotes testados. Em ambos os lotes de sementes a fase I ocorreu entre 14 e 15 horas, quando houve maior incremento na massa úmida. A fase

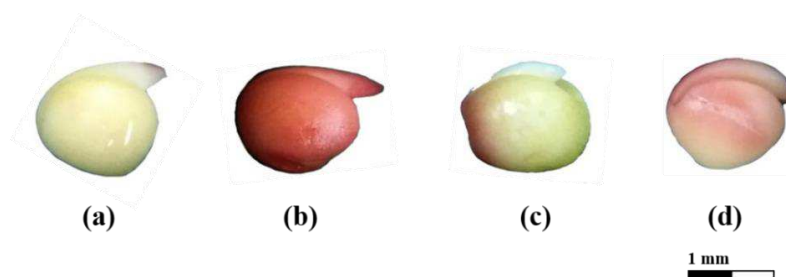
II estendeu-se por aproximadamente 18 horas e foram observados menores incrementos de ganho de massa úmida. E por fim, a fase III ocorreu com o início da protrusão da radícula 32 horas após o início do teste. Resultados semelhantes foram encontrados para sementes de repolho, que atingiram a fase III da curva de absorção de água após 36 horas de embebição (KIKUTI; MARCOS-FILHO, 2009) e em sementes de crambe verificou-se que a protrusão da raiz primária levou 42 horas (SILVA *et al.*, 2019).

Os dados sugeriram que os tempos a serem testados para o pré-condicionamento no teste de tetrazólio deveriam ser inferiores a 14 horas, já que nesse período foi observado que algumas sementes haviam protrundido a radícula.

Em testes preliminares para a realização do teste de tetrazólio (Tabela 1), constatou-se que o pré-condicionamento por 14 horas em água induziu a germinação das sementes e quando combinado com os períodos de coloração, dificultaram a análise visual do teste, uma vez que muitas sementes já estavam com o embrião em estágio avançado de desenvolvimento. Dessa forma, utilizou-se o período de 10 horas em água para o pré-condicionamento, sendo suficiente para facilitar a remoção do tegumento.

Observou-se que, para a preparação das sementes, a remoção total do tegumento apresentou melhores resultados na coloração se comparado aos demais métodos de preparação (Figura 5). O corte longitudinal no maior sentido danificou as sementes, o que mascarou os resultados do teste e a presença do tegumento dificultou a penetração da solução, conferindo às sementes coloração desuniforme ou ausência de coloração. Resultados semelhantes verificando a necessidade de retirada do tegumento das sementes da família Brassicaceae também foram obtidos por Debeaujon *et al.* (2000) para sementes de *Arabidopsis*. Porém, Nery *et al.* (2015) e Flores *et al.* (2015) encontraram resultados diferentes para sementes de nabo forrageiro e canola, respectivamente, em que o corte longitudinal no maior sentido antes da imersão na solução de tetrazólio foi o mais indicado para essas espécies.

Figura 5. Coloração de sementes de couve após exposição à solução de tetrazólio em diferentes métodos de preparação: (a) semente intacta; (b) remoção total do tegumento; (c) corte na região distal ao eixo embrionário; (d) corte longitudinal no maior sentido.



Em relação à coloração, a concentração de solução de tetrazólio de 1,0% não foi eficiente porque apresentou uma tonalidade muito intensa nas sementes, independentemente do tempo de coloração. Quando as sementes foram expostas ao tempo de coloração de 2 horas e 6 horas, apresentaram pigmentação fraca e muito intensa para essa concentração testada, por isso não foi possível fazer a correta visualização dos danos causados na região do eixo embrionário. Sendo assim, tal metodologia foi eliminada dos testes posteriores. Este fato também foi apontado por Gaspar-Oliveira *et al.* (2009) em sementes de mamona, Silva *et al.* (2013) em sementes de girassol e Rezende *et al.* (2015) em sementes de crambe, quando trabalharam com concentração de 1,0%.

No teste de tetrazólio houve interação significativa entre as famílias, concentrações e tempos na solução de tetrazólio (Tabelas 3 e 4). Ambas as tabelas representam a interação tripla e se diferem apenas na forma como foi feito o desdobramento.

A imersão das sementes na solução de tetrazólio por 2 horas permitiu diferenciar as sementes das famílias de couve nas concentrações de 0,075% e 0,2% (Tabela 3). No período de 4 horas foi possível observar a separação das famílias, exceto na concentração de 0,2%. Já com 6 horas, a distinção entre as famílias foi observada para todas as concentrações. Provavelmente, a combinação de tempo e concentração da solução foi menos precisa para distinção da coloração dos tecidos, como a imersão das sementes por 4 horas na concentração de 0,2% e imersão por 2 horas na concentração de 0,5%, apesar que indicou uma coloração mais padronizada e uniforme.

As estimativas dos coeficientes de correlação (r) entre o teste de tetrazólio e o teste de germinação, encontram-se na Tabela 3. Observa-se que a combinação de 4 horas de imersão na concentração de solução de tetrazólio a 0,2% foi a única que apresentou correlação significativa positiva e o coeficiente de correlação ($r = 0,54$) foi considerado moderado. Apesar de não classificar as famílias de maneira semelhante ao teste de germinação (Tabela 2), os resultados encontrados no teste de tetrazólio coincidem, confirmando a alta qualidade fisiológica.

Tabela 3. Porcentagem de sementes viáveis de couve obtida pelo teste de tetrazólio em função das concentrações da solução de TZ (%) e do tempo de imersão em solução de TZ (horas).

Família	Coloração								
	Concentração da solução de TZ								
	0,075%			0,2%			0,5%		
	Tempo de imersão em TZ (30°C)								
	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h
1	100 a	97 ab	99 a	100 a	92 a	68 b	98 a	99 a	100 a
2	95 a	100 a	96 a	91 ab	100 a	84 a	97 a	100 a	92 ab
3	80 b	94 ab	86 b	92 ab	92 a	80 a	97 a	87 b	84 bc
4	81 b	88 b	85 b	84 b	92 a	87 a	95 a	89 b	82 c
CV (%)	5.9								
¹ Pearson	-0,26 ^{ns}	0,23 ^{ns}	-0,43 ^{ns}	-0,43 ^{ns}	0,54*	0,45 ^{ns}	0,15 ^{ns}	-0,40 ^{ns}	-0,26 ^{ns}

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

¹ Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os resultados do teste de tetrazólio e os do teste de germinação.

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t; ^{ns} não significativo.

De acordo com a Tabela 4, apenas para a família 3, na concentração da solução de 0,075% houve diferença entre os períodos de 2 horas e 4 horas. Na concentração da solução de 0,2%, para a família 1 e 3, o período de 6 horas diferiu dos demais períodos e para a família 2, houve diferenças entre os períodos de 4 horas e 6 horas. Já na concentração 0,5%, para a família 3, o período de 2 horas diferiu dos demais e para a família 4, o período de 2 horas diferiu do período de 6 horas.

Observando-se as diferenças entre as concentrações para cada família em cada período de imersão (Tabela 4), no período de 2 horas, para a famílias 3, a concentração de solução de 0,075% diferiu das demais concentrações e para a família 4 a concentração de solução de 0,5% diferiu das demais. No período de 4 horas, não houve diferença significativa entre as concentrações para todas as famílias. E no período de 6 horas, para a família 1, a concentração 0,2% diferiu das demais e para a famílias 2, houve diferença entre as concentrações 0,075% e 0,2%.

Tabela 4. Viabilidade de sementes de couve obtida pelo teste de tetrazólio em função das concentrações da solução de TZ (%) e do tempo de imersão em solução de TZ (horas).

Concentração da solução de TZ	Coloração		
	Família 1		
	Tempo de imersão em TZ (30 °C)		
	2 h	4 h	6 h
0,075%	100 Aa	97 Aa	99 Aa
0,2%	100 Aa	92 Aa	68 Bb
0,5%	98 Aa	99 Aa	100 Aa
Concentração da solução de TZ	Família 2		
	Tempo de imersão em TZ (30 °C)		
	2 h	4 h	6 h
0,075%	95 Aa	100 Aa	96 Aa
0,2%	91 Aab	100 Aa	84 Bb
0,5%	97 Aa	100 Aa	92 ABa
Concentração da solução de TZ	Família 3		
	Tempo de imersão em TZ (30 °C)		
	2 h	4 h	6 h
0,075%	80 Bb	94 Aa	86 Aab
0,2%	92 Aa	92 Aa	80 Ab
0,5%	97 Aa	87 Ab	84 Ab
Concentração da solução de TZ	Família 4		
	Tempo de imersão em TZ (30 °C)		
	2 h	4 h	6 h
0,075%	81 Ba	88 Aa	85 Aa
0,2%	84 Ba	92 Aa	87 Aa
0,5%	94 Aa	89 Aab	82 Ab
CV (%)	5.9		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Vale ressaltar que, durante as observações no teste de tetrazólio, as combinações de menor concentração (0,075%) com o maior período de imersão (6 horas) ou a maior concentração (0,5%) com o menor período de imersão (2 horas) foram mais eficientes na coloração, o que facilitou a análise visual da viabilidade, assim como a combinação intermediária de concentração 0,2% com o período de 4 horas. Tanto a utilização da menor concentração associada ao menor período, como a maior concentração com o maior período, não permitiram análise seguras por apresentarem colorações muito fracas e muito intensas, respectivamente, dificultando a classificação visual e distinção das categorias. Nestas

combinações não foi possível distinguir tecidos saudáveis de tecidos injuriados devida a falta de coloração e/ou intensa coloração, sendo assim, não se recomenda a utilização dessa metodologia na condução do teste de tetrazólio para análise de sementes de couve.

De acordo com Nery *et al.* (2015), a escolha da metodologia adequada para o emprego do teste de tetrazólio deve basear-se na facilidade para a diferenciação de tecidos viáveis e inviáveis e na capacidade de diferenciar lotes de qualidades fisiológicas distintas. Dessa forma, para a indicação da metodologia ideal do teste de tetrazólio de sementes de couve, existe ainda, a necessidade de aprimoramento do teste envolvendo maior número de famílias com níveis de qualidade diferenciados, já que foi observado uma alta qualidade das sementes das famílias estudadas.

Outro fator que deve ser levado em consideração na avaliação da viabilidade de sementes é o tempo de execução do teste. O tempo de pré-condicionamento foi reduzido de 18 horas (BRASIL, 2009) a 10 horas, seguida de mais 4 horas de imersão em solução de tetrazólio para a coloração. Esse resultado contribuiu para uma maior eficiência na análise de rotina de laboratório de sementes, permitindo respostas rápidas sobre a situação dos lotes de sementes durante o manuseio.

4 CONCLUSÃO

O pré-condicionamento das sementes entre papel por 10 horas a 20°C, seguido pela remoção total do tegumento e a utilização de solução de tetrazólio na concentração de 0,2% por 4 horas a 30°C é eficiente na avaliação da viabilidade das sementes de couve.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L. C.; TAKAKI, M. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith - Bignoniaceae, submetidas ao armazenamento. **Revista Árvore**, v. 38, n. 2, p. 233-240, 2014.

ARMONDES, K. A. P.; DIAS, D. C. F. S.; MARTINEZ, P. A. H.; SILVA, L. J.; HILST, P. C. Condicionamento osmótico e desempenho de sementes de repolho com diferentes níveis de vigor. **Horticultura Brasileira**, v. 34, p. 428-434, 2015.

AZEVEDO, A. M.; ANDRADE JÚNIOR, V. C.; PEDROSA, C.E.; FERNANDES, J. S. C.; VALADARES, N. R.; FERREIRA, M. A. M.; MARTINS, R. A. V. Desempenho agrônômico e variabilidade genética em genótipos de couve. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1751-1758, 2012.

AZEVEDO, A. M.; ANDRADE JÚNIOR, V. C.; PEDROSA, C. E.; VALADARES, N. R.; FERNANDES, J. S. C.; FERREIRA, M. R. A.; MARTINS, R. A.V. Divergência genética e importância de caracteres em genótipos de couve. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p.51-57, 2014.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2. ed. New York: Ed. Plenum Press, 1994.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. **Springer Science & Business Media**, 3. ed., 392 p., 2012.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA, 2009. 395 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 42, de 17 de setembro de 2019. Estabelece as Normas para a Produção e a Comercialização de Sementes e Mudas de Espécies Olerícolas, Condimentares, Medicinais e Aromáticas e os seus padrões de sementes, com validade em todo o território nacional, visando à garantia de sua qualidade e identidade. Diário Oficial da União. Seção 1, p. 4.

BRITO, O. G. **Estudo genético e seleção de progênes de meios-irmãos de couve de folhas**. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 79 p., 2018.

DEBEAUJON, I.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M.; KOORNNEEF, M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 403-413, 2000.

FIGUEIREDO-FILHO, D. B.; SILVA-JÚNIOR, J. A. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, Recife, v. 18, n. 1, p. 115-46, 2009.

FLORES, M. F.; GRZYBOWSKI, C. R. S.; PAZOLINI, K.; POSSENTI, J. C.; PANOBIANCO, M. Criteria for implementation of a tetrazolium test in canola seeds. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 4, p. 222-227, 2015.

FRANÇA-NETO, J. D. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Tetrazólio: um teste de importância para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 3, p. 359-366, 2019.

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Concentração da solução de tetrazólio e período de coloração do teste para sementes de mamoneira. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 3, p. 038-047, 2009.

KIKUTI, A. L. P.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes de couve-flor. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 240-245, 2009.

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

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina, 2.ed., 660p., 2015.

NERY, M. C.; NERY, F. C.; PIRES, R. M. O. Tetrazolium test to evaluated the viability of oil radish seeds. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 3, p. 663-671, 2015.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2018. <https://www.R-project.org>

RAJJOU, L. et al. Seed germination and vigor. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 507-533, 2012.

REZENDE, R. G.; JESUS, L. L.; NERY, M. C.; ROCHA, A. S.; CRUZ, S. M.; ANDRADE, P. C. R. Teste de tetrazólio em sementes de crambe. **Semina**, v. 36, n. 4, p. 2539-2544, 2015.

RODRIGUES, A. P. D. A. C.; LAURA, V. A.; CHERMOUTH, K. D. S.; GADUM, J. Absorção de água por semente de salsa, em duas temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 49-54, 2008.

SILVA, R. C.; GRZYBOWSKI, C. R. S.; FRANÇA-NETO, J. B.; PANOBIANCO, M. Adaptação do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de girassol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, n. 1, p. 105-113, 2013.

SILVA, M. F. D.; ARAÚJO, E. F.; SILVA, L. J. D.; AMARO, H. T. R.; DIAS, L. A. D. S.; DIAS, D. C. F. D. S. Tolerance of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) to salinity and water stress during seed germination and initial seedling growth. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, 2019.

TRANI, P. E. et al. Couve de folha: do plantio à pós-colheita. **Campinas: Instituto Agrônômico**, n. 214, p. 36, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não se pode afirmar que as diferenças observadas na qualidade fisiológica de sementes de famílias de meios-irmãos de couve são devido ao fator genético, provavelmente, essas diferenças podem estar relacionadas à maturidade fisiológica desuniforme.

Apesar de não ter sido realizado estudos de variabilidade fenotípica e genética entre as progênes para a produção de semente, os resultados encontrados permitiram selecionar famílias com base na qualidade fisiológica. O teste de envelhecimento acelerado, utilizando o método tradicional na combinação de 72 horas a 41°C é adequado para detectar o potencial fisiológico de sementes de famílias de couve. A viabilidade das sementes de couve pode ser avaliada seguindo o pré-condicionamento das sementes entre papel por 10 horas a 20°C, seguida pela remoção total do tegumento e utilização de solução de tetrazólio na concentração de 0,2% por 4 horas a 30°C.

Existe uma grande carência de informações sobre florescimento, produção e qualidade de sementes na cultura da couve, mesmo sendo uma etapa fundamental para trabalhos de melhoramento genético e haver demanda por novas variedades mais produtivas e resistentes. Dessa forma, os resultados observados são promissores no sentido de selecionar famílias que, dentro das condições de clima da região de Diamantina, floresceram e produziram sementes.

Com isso, espera-se que os dados obtidos neste trabalho amparem estudos futuros de melhoramento genético da couve.